

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955 - سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée
Intitulé :

Étude comparative des substances bioactives et de l'activité
antioxydante de différentes parties de la plante *Aster squamatus*
(Spreng.) Hieron.

Présenté Par :

BOUMEDIENE Gamra

BATTAZE Hadjer

NEMMOUR Moukim

Soutenu publiquement le 25 Juin 2023

Membres de Jury :

Dr. NASSAR Meriem (MCA)

Président

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Dr. BOULECHFAR Safia (MAA)

Promoteur

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Dr. NADJI Safia (MCB)

Examineur

Univ. du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

REMERCIEMENTS

Avant toute chose nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force et les moyens afin de pouvoir réaliser ce travail.

Au terme de ce travail nous adressons tout d'abord nos sincères remerciements à :

Dr Boulechfar Safia ; pour ses précieux conseils et son soutien à tous les instants. Sa gentillesse, ses grandes qualités scientifiques et humaines ont contribué au bon déroulement de ce travail. Ses critiques et sa compétence ont été un solide appui et un réconfort.

Dr Nassar ; notre chère enseignante, pour la qualité de son enseignement. On a l'honneur que vous soyez le président de ce jury, trouvez ici l'expression de nos reconnaissances.

Dr Nadji ; pour avoir bien voulu faire partie de cet honorable jury, et pour accepter d'examiner notre travail, trouvez ici l'expression de nos reconnaissances.

Dr Ayadi ; Parce qu'il est l'un des rares enseignants qui cherche à aider tous les étudiants s'ils ne connaissent pas, merci beaucoup pour vos conseil monsieur.

Ainsi à tous les personnes qui ont contribué pour transmettre le savoir scientifique durant toute la durée de nous études universitaires.

DÉDICACE

Je dédie ce travail à :

À *mon père Hocine* ❤️, vous êtes toujours mon héros. Votre sacrifice, force et votre soutien tout au long de ma vie sont la motivation qui me pousse à vouloir réaliser le meilleur dans ma vie.

Je t'aime papa et je vous promets de te rendre fier chaque jour.

À *Ma mère Messaouda* ❤️, pour vos soutiens constants dans les moments difficiles de ma vie, pour avoir soutenu mes études, prié pour moi à chaque prière, et pour l'amour que vous me portez sans fin. Vous avez toujours été ma force. Je t'aime maman.

À *Mon frère Hichem*, merci d'être un modèle pour moi et de me guider toujours sur le bon chemin. Vos leçons, enseignements et valeurs ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui, je t'aime. Aux plus beaux anges de ma vie « *Allaa, Djana et Aya* » votre présence éclaire ma vie, je t'adore mes petites.

À *Mon fiancé Yassin*, ton amour et ton soutien ont toujours été présents dans mes rêves et mes objectifs. Tu as été une force motrice pour accomplir ce que je suis aujourd'hui. Je t'aime.

À *ma grande sœur Hassiba*, son mari *Nour addine* et ses enfants « *Ilyas, Loudjain et Qais* », merci beaucoup pour votre présence dans ma vie. Je t'aime mes chères.

À *Mon cher binôme Hadjer*, tu as été une source constante de soutien et d'inspiration pour moi. Des sessions d'étude tardives aux aventures amusantes que nous avons partagées, tu as toujours été là pour moi, et pour cela, je suis éternellement reconnaissante et je suis tellement chanceuse de t'avoir dans ma vie.

À toute la famille, *ma tante Razika, Chaima, Nawal, Yasmine et Amina*.

À mes merveilleuses amies que soutiennent dans l'études, le crime et l'aventure : *Sana, Yasmine, Amel et Boutheyna*, Merci pour la vie qui m'a présenté à vous.



Ganra

DÉDICACE

Je dédie ce modeste fruit d'étude :

À ce lui qui fait l'impossible pour me donner le bonheur mon père **Rabah** ♥ ; ainsi pour tous ses sacrifices, sa tendresse. Aucun mot, aucune expression exprimer mes sentiments, Allah yahfdak Baba.

À ma chère amie, ma sœur, à mon âme, la plus belle personne dans ma vie ma mère

Hadraia ♥ , pour leur amour et leur soutien, qu'Allah la protéger

À ma sœur **Ouissal**, la moitié de mon âme qui est proche de moi en tout temps, pour leur soutien, amour et pour sa folie qui orne ma vie, Allah la protège.

À mon petit prince, le plus gentil frère du monde **Youcef**, je t'aime plus que ma vie, Allah ykhalik liya.

À ma grande sœur **Ilhem** et son mari **Fares** merci pour votre soutien et votre présence dans ma vie ; Allah yhfadkm.

Aux dons que Allah m'a accordés ; **Yasmine** ma compagne sur le chemin, un morceau de mon cœur, je t'aime, et **Boutheyna**, tous les mots n'expriment pas mon amour pour elle, pour leur soutien et la beauté de son cœur et son âme, je t'aime « my 3oyoun ».

À **Gamra**, mon partenaire, mon amie, qui m'a soutenu dans mes moments de faiblesse, j'aime l'université qui m'a présenté le meilleur du l'univers, Allah la protège.

À **Sérin**, ma sœur qui me manque tant, **Amel**, l'amie de l'enfance, la personne qui je ne lasse jamais de sa conversation, je t'aime mes chères.

À tous ceux que j'aime.



Hadjer

DÉDICACE

Je dédie ce travail

À ***Ma mère*** ❤️ qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. Allah yahfadha.

À ***Mes frères*** ❤️ et ma famille qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotions lors de la réalisation de ce travail, ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

À ***Mes proches amis*** ❤️ qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.



Mokim

SOMMAIRE

Première partie : Synthèse Bibliographique

| | |
|---|----|
| Introduction | 01 |
| Chapitre I : Les radicaux libres et les antioxydants | |
| I. Les radicaux libres et les antioxydants..... | 02 |
| I.1. Les radicaux libres | 02 |
| I.1.1. Stress oxydatif..... | 02 |
| I.1.2. Les maladies lie au stress | 02 |
| I.2. Les antioxydants | 03 |
| I.2.1. Définition | 03 |
| I.2.2. Les catégories des antioxydants..... | 03 |
| I.2.3. Le système antioxydant endogène | 04 |
| I.2.3.1. Les antioxydants enzymatiques..... | 04 |
| a. Le superoxyde dismutase..... | 05 |
| b. La catalase | 05 |
| c. La glutathion peroxydase..... | 06 |
| I.2.3.2. Les antioxydants non enzymatiques..... | 06 |
| a. Le glutathion | 06 |
| b. Le β -carotène..... | 07 |
| c. Acide urique | 07 |
| I.2.4. Le système antioxydant exogène | 07 |
| I.2.4.1. Les vitamines..... | 07 |
| a. Vitamine C | 07 |
| b. Vitamine E | 08 |
| I.2.4.2. Les polyphénols..... | 08 |
| I.2.4.3. Les flavonoïdes..... | 09 |
| I.2.5. Mécanismes d'action..... | 10 |

Chapitre II : La plante médicinale *Aster squamatus* (Spreng) Hieron

| | |
|---|----|
| II. La plante médicinale sélectionnée..... | 12 |
| II.1. Généralités..... | 12 |
| II.2. La plante <i>Aster squamatus</i> (Spreng.) Hieron | 12 |
| II.2.1. Le genre <i>Aster</i> | 12 |
| II.2.2. L'espèce <i>Aster squamatus</i> (Spreng) Hieron | 13 |
| II.2.2.1. Classification..... | 13 |
| II.2.2.2. Aire géographique..... | 13 |
| II.3. Description botanique..... | 13 |
| II.4. La composition chimique | 14 |
| II.5. Propriété biologique | 14 |

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthode

| | |
|---|----|
| I. Étude phytochimique | 15 |
| I.1. Récolte du matériel végétal | 15 |
| I.2. Extraction..... | 15 |
| I.3. Détermination des teneurs en substances bioactives | 15 |
| I.3.1. Dosage des polyphénols totaux..... | 15 |
| I.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux..... | 16 |
| I.3.3. Dosage des chlorophylles totaux et caroténoïdes | 17 |
| I.4. Activité antioxydante..... | 17 |
| I.4.1. Test au DPPH..... | 17 |
| II. Analyse statistique..... | 18 |

Chapitre II : Résultats et discussion

| | |
|---|----|
| II. Étude phytochimique..... | 19 |
| II.1. Rendement d'extraction | 19 |
| II.2. Teneur en composés phénoliques | 19 |
| II.3. Teneur en flavonoïdes | 21 |
| II.4. Teneur en chlorophylles totaux et caroténoïdes totaux | 22 |
| II.5. Activité antioxydante | 24 |

| | |
|--|-----------|
| Conclusion..... | 27 |
| Références bibliographiques | 28 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 01 : Les trois conditions de stress oxydant..... | 02 |
| Figure 02 : Mécanismes d'action des antioxydants..... | 04 |
| Figure 03 : Structure de flavonoïde..... | 09 |
| Figure 04 : <i>Aster squamatus</i> (Speng.) Hieron..... | 13 |
| Figure 05 : Les différentes parties de la plante <i>Aster squamatus</i> | 14 |
| Figure 06 : Méthode de la macération..... | 15 |
| Figure 07 : Réduction du radical DPPH par un antioxydante..... | 17 |
| Figure 08 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique..... | 19 |
| Figure 09 : Teneur en composés phénoliques des extraits de la plante <i>Aster squamatus</i> | 20 |
| Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la quercétine..... | 21 |
| Figure 11 : Teneur en flavonoïdes totaux des extraits de la plante <i>Aster squamatus</i> | 22 |
| Figure 12 : Chlorophylles totaux..... | 23 |
| Figure 13 : Caroténoïdes totaux..... | 23 |
| Figure 14 : L'activité antioxydante des extraits à différentes concentrations..... | 25 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 01 : Exemples des pathologies liées aux stress oxydatif..... | 03 |
| Tableau 02 : Classification des composés phénoliques en fonction du nombre d'atomes de carbone et des exemples de leurs sources..... | 08 |
| Tableau 03 : Structures et classification des flavonoïdes..... | 10 |
| Tableau 04 : Mécanismes d'action des antioxydants | 10 |
| Tableau 05 : Description des différentes parties de la plante <i>Aster squamatus</i> | 13 |
| Tableau 06 : Les propriétés biologiques de la plant <i>Aster squamatus</i> | 14 |
| Tableau 07 : Le rendement d'extraction..... | 19 |
| Tableau 08 : Valeurs d'IC ₅₀ des extraits..... | 26 |

LISTE DES ABREVIATIONS

AcOET : Acétate d'éthyle.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AlCl₃ : Trichlorure d'Aluminium.

ARN : Acide ribonucléique.

Cm : Centimètre

DPPH : 1,1 -diphényl-2-picrylhydrazyl.

E : Extrait.

EE : Extrait éthanolique.

EEFE : Extrait éthanolique de feuille.

EEFL : Extrait éthanolique de fleur.

EEPA : Extrait éthanolique de la partie aérienne.

EET : Extrait éthanolique de tige.

EQ : Équivalent de quercétine.

g : Gramme.

GSH : Glutathion.

GSHPX : Glutathion peroxydase.

GSSG : Disulfure de glutathion.

H₂O : Eau.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

l : Litre.

m : Mètre.

Me-OH : Méthanol.

mg : Milligramme.

mm : Millimètre.

NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.

***n*-BuOH** : n-Butanol.

nm : Nanomètre.

O₂ : L'oxygène

R : Radicaux.

RL : Radicaux libre.

ROS : Espèce réactive oxygénée.

SOD : Superoxyde dismutase.

µg : Microgramme.

µL : Microlitre.

UV : Ultraviolet.

V : Volume.

Résumé

L'objectif du présent travail était l'évaluation de la teneur en polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes et chlorophylles de différentes parties de la plante *Aster squamatus* ainsi que leur propriété antioxydante. Le contenu en polyphénols totaux a été évalué selon la procédure de Folin-Ciocalteu. La teneur la plus élevée a été obtenue par l'extrait éthanolique des fleurs avec une valeur de $157,97 \pm 3,11 \mu\text{g EAG/mg E}$. Alors que, la teneur la plus élevée en flavonoïdes, estimée par la méthode AlCl_3 , a été trouvée par l'extrait éthanolique de la partie aérienne avec une valeur de $15,46 \pm 0,37 \mu\text{g EQ/mg E}$. Ainsi, les résultats ont montré que la teneur la plus élevée en caroténoïdes et chlorophylles a été obtenus par l'extrait éthanolique de la partie aérienne. L'évaluation de l'activité antioxydante des quatre extraits contre le radical DPPH a montré que les extraits éthanoliques des feuilles et des fleurs possèdent le pouvoir le plus puissant avec un IC_{50} de $32,17 \pm 0,39 \mu\text{g/mL}$ et $32,70 \pm 3,26 \mu\text{g/mL}$, respectivement.

Les mots clés : *Aster squamatus*, polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes, chlorophylles, antioxydant.

Abstract

The aim of the present work was the evaluation of polyphenols, flavonoids, carotenoids and chlorophylls content of different parts of the plant *Aster squamatus* as well as their antioxidant property. The total polyphenol content was evaluated according to Follin-Ciocalteu procedure. The highest content was obtained by flowers ethanolic extract with a value of 157.97 ± 3.11 $\mu\text{g EAG/mg E}$. However, the highest flavonoid content, estimated by the AlCl_3 method, was found in aerial part ethanolic extract with a value of 15.46 ± 0.37 $\mu\text{g EQ/mg E}$. The results showed also that the highest carotenoid and chlorophyll content was obtained by aerial part ethanolic extract. The evaluation of the antioxidant activity of the four extracts against DPPH radical showed that ethanolic extracts of leaves and flowers possess the most potent effect with IC_{50} of 32.17 ± 0.39 $\mu\text{g/mL}$ and 32.70 ± 3.26 , respectively.

Keywords: *Aster squamatus*, polyphenols, flavonoids, carotenoids, chlorophylls, antioxidant.

ملخص:

هدف عملنا على تحديد محتوى البوليفينول، الفلافونويد، الكاروتينات والكلوروفيل في أجزاء مختلفة من نبات استر سكوماتوس، بالإضافة الى خصائصها المضادة للأكسدة. تم تقييم محتوى البوليفينول الكلي وفقا لإجراء Follin-Ciocalteu، ثم الحصول على أعلى محتوى في المستخلص الايثانولي للزهور بقيمة $3,11 \pm 157,97$ ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك /ملغ من المستخلص، بينما تم العثور على أعلى محتوى من الفلافونويد، المقدر بواسطة طريقة $AlCl_3$ في المستخلص الايثانولي للجزء الهوائي بقيمة $0,37 \pm 15,46$ ميكروغرام مكافئ الكرسيتين/ملغ من المستخلص. كما أظهرت النتائج ان أعلى محتوى من الكاروتينات والكلوروفيل تم الحصول عليه في المستخلص الايثانولي للجزء الهوائي. اظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الأربعة ضد جذور DPPH ان المستخلصات الايثانولية للأوراق و الازهار تمتلك اقوى قوة ب IC_{50} تساوي $0,39 \pm 32,17$ ميكروغرام / ملل و $3,26 \pm 32,70$ ميكروغرام / ملل, على التوالي.

الكلمات المفتاحية: استر سكوماتوس، بوليفينول، الفلافونويد، الكاروتينات والكلوروفيل، المضادة للأكسدة.

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'homme a utilisé les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner des maladies (**Sango, 2006**).

La phytothérapie est l'une des vieilles médecines du monde. Elle représente une alternative intéressante pour traiter et soigner sans créer de nouvelles maladies. Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, l'intérêt populaire pour la phytothérapie n'a jamais cessé d'évoluer. De nos jours ces deux types de médication se retrouvent intimement liés puisque le modèle moléculaire de la plupart des médicaments mis sur le marché, ont pour origine la plante (**Shu, 1998**).

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme les plantes médicinales, aliments pour des buts thérapeutiques (**Millogo et al., 2005**).

Les plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire. Les plantes produisent déjà 70% de nos médicaments, déjà environ 170000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes (**Chaabi, 2008**).

C'est pourquoi ce travail vise à étudier la plante *Aster squamatus*, une plante Algérienne de la région d'Oum el Bouaghi, qui est dotée de plusieurs activités biologiques.

L'objectif du présent travail est de démontrer la richesse de cette plante en substances bioactives et évaluer *in – vitro* ses propriétés biologiques.

Notre travail sera donc réparti en deux parties :

- Une partie est consacrée à l'étude biologique, basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques, flavonoïdes, chlorophylles et caroténoïdes.
- Une autre partie est consacrée à l'évaluation de l'activité antioxydante.

Première Partie
Synthèse Bibliographique

Chapitre I

Les Radicaux Libres et Les Antioxydants

I. Les radicaux libres et les antioxydants

I.1. Les radicaux libres

Un radical libre est une molécule ou un atome qui possède un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (**Merouane et al., 2014**). En fait, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable, il diminue donc en oxydant un autre composé (**Goudable & Favier, 1996**).

I.1.1. Le stress oxydatif

C'est un état de déséquilibre entre la production d'espèces réactives et les défenses de l'organisme.

Le stress oxydant existe lorsqu'au moins une des trois conditions suivantes est présente :

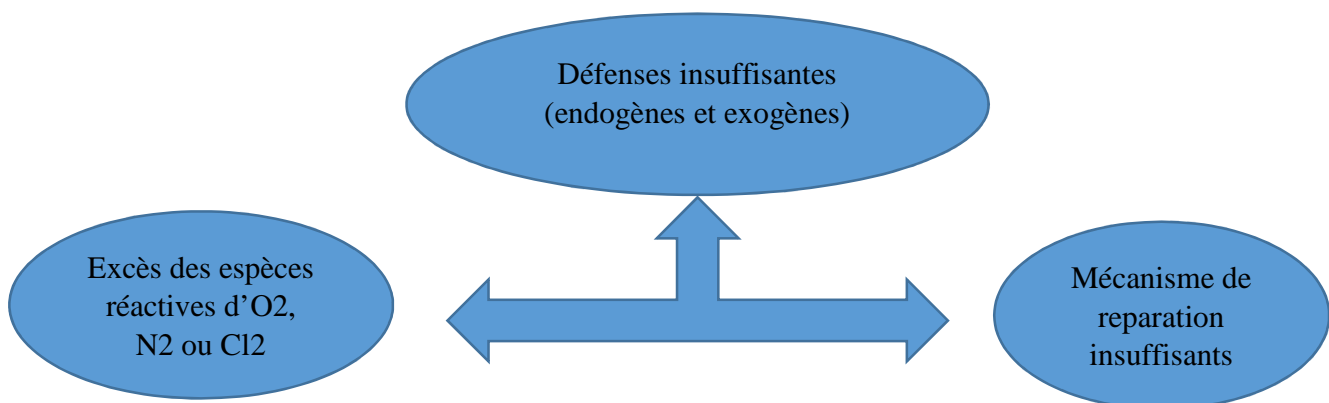


Figure 01 : Les trois conditions de stress oxydant (**Mercan, 2010**).

I.1.2. Les maladies lie au stress

Le stress oxydatif affecte négativement la santé de la population en générale et de certains groupes de patients atteints de maladies chroniques et aiguës (**Chrestelle, 2006**).

Tableau 01 : Exemples des pathologies liées aux stress oxydatif (**Bensakhria, 2018**).

| Maladies dans lesquelles le stress oxydatif est une cause précurseur | Maladie dans lesquelles le stress oxydatif est un déclencheur | Troubles conduisent à un stress oxydatif secondaire |
|--|---|---|
| -Auto-immunité -Cataracte -Cancers | -Asthmes -Athéromes -Maladie d'Alzheimer -Stérilité masculin | -Diabète -Maladie de Parkinson -Insuffisance rénale |

1.2. Les antioxydants

1.2.1. Définition :

Un antioxydant est toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celles d'un substrat oxydable, retarde ou empêche considérablement l'oxydation de ce sous-traité (**Halliwell & Barry, 1991**).

Le terme "substrat oxydable" comprend presque tout ce qui se trouve dans les cellules vivantes, y compris protéines, lipides, glucides et ADN (**Halliwell & Barry, 1991**).

Un antioxydant est aussi une substance produite par l'organisme ou apportée par l'alimentation qui s'oppose à l'effet dévastateur des radicaux libres (**Claire, 2002**).

1.2.2. Les catégories des antioxydants

Ils sont fabriqués par notre corps et appartiennent à l'une de ces trois catégories :

- Les agents de prévention pour le rôle d'annihiler les molécules d'origine endogène ou exogène responsables de la production de radicaux libres.
- Les agents de détoxification active sont trois enzymes spécifiques : Le superoxyde dismutase, qui inhibe les réactions en chaîne, la catalase, et le glutathion peroxydase, qui prend en charge la détoxification des agents cancérigènes.
- Les agents de détoxification passive, d'origine exogène qu'éliminent une partie des radicaux libres ayant résisté aux deux premières défenses (agents de prévention et agents de détoxification active).

Les plus connus sont le bêta-carotène et les vitamines C et E. On peut les trouver dans la plupart des fruits et des légumes, ou dans les huiles végétales (Claire, 2002).

Antioxydants

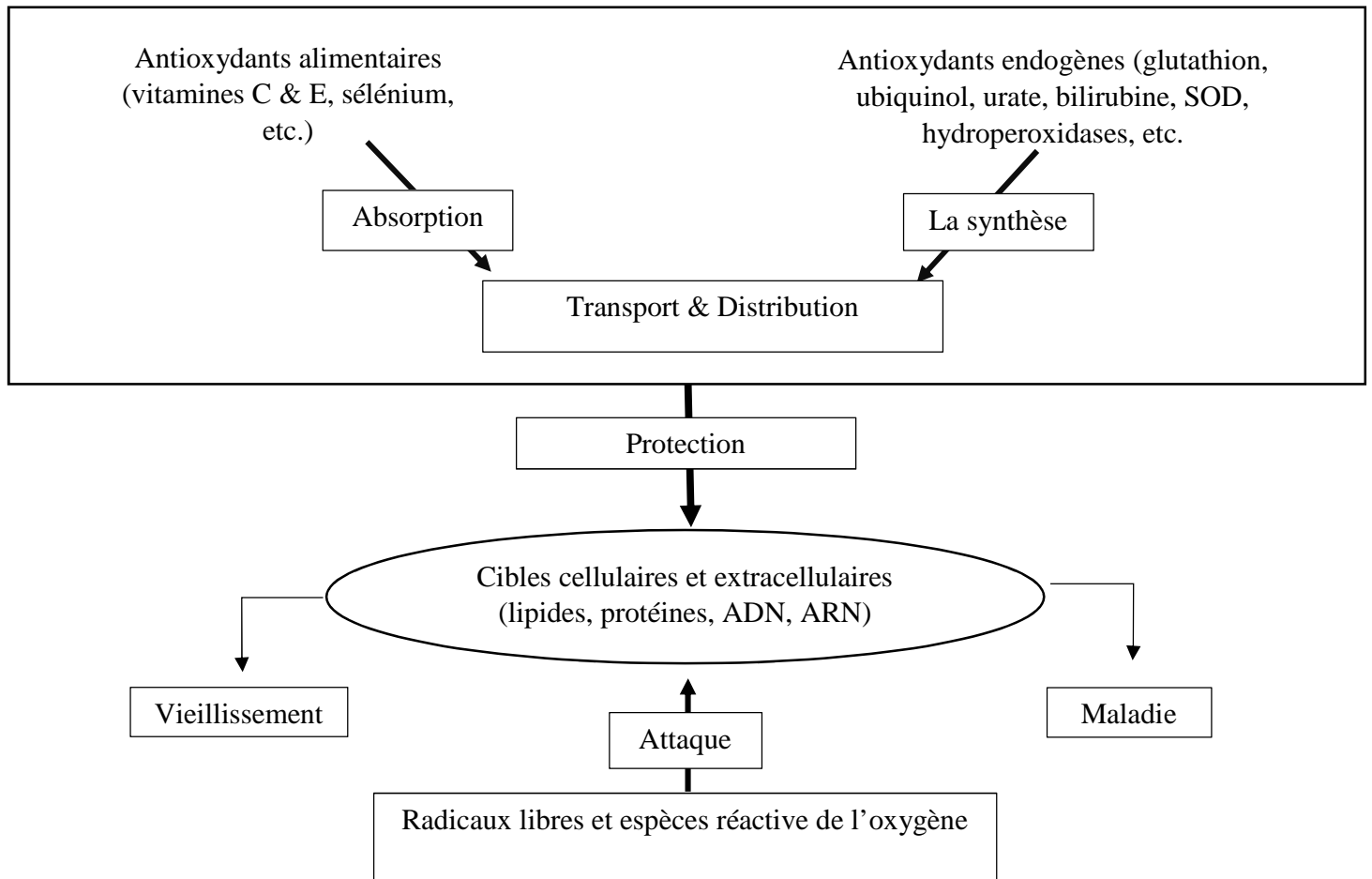


Figure 02 : Mécanismes d'action des antioxydants (Culter et al., 1995).

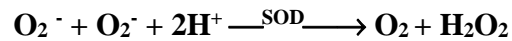
1.2.3. Le système antioxydant endogène

1.2.3.1. Les antioxydants enzymatiques

Sont trois enzymes spécifiques forment la clé de voute de ce système antioxydant : le superoxyde dismutase, la catalase, et le glutathion peroxydase (Claire, 2002).

A. Le superoxyde dismutase

Une première ligne de défense contre les ROS comprend le superoxyde dismutase (SOD) qui est un métallo-enzyme qui catalyse la dismutation des ions superoxydes en oxygènes moléculaires et peroxydes d'hydrogène selon la réaction suivante :

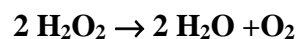


La SOD existe sous trois formes qui diffèrent par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique :

- Une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD) représente 90% de l'activité totale de la SOD.
- Une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) considérée comme le principal moyen de protection contre le superoxyde mitochondrial.
- Une forme extracellulaire (EC-SOD) (**Lori et al., 2001**).

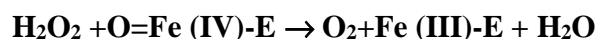
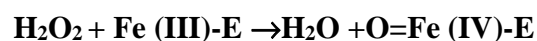
B. La catalase :

La plupart des cellules aérobies contiennent une activité catalase, bien que quelques-unes n'en aient pas. L'activité catalase des tissus animaux et végétaux largement localisée dans organes subcellulaires délimités par une seule membrane et appelés peroxysomes (**Martyn & John, 1998**). Elle catalyse la dismutation de peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (**Marian et al., 2006**).



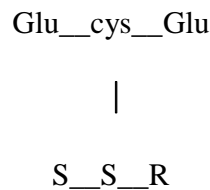
Il a été démontré que la plupart des catalases purifiées sont constituées de quatre sous-unités protéiques, chacune contenant un groupe hème (Fe- protoporphyrine) lié à son site actif. Chaque sous-unité contient également une molécule de NADPH qui lui est liée, ce qui aide à stabiliser l'enzyme. La dissociation de la catalase en ses sous-unités, qui se produit facilement lors du stockage, de la lyophilisation ou de l'exposition de l'enzyme à un acide ou à un alcali, entraîne une perte d'activité de la catalase (**Martyn & John, 1998**).

Le mécanisme de dismutation du peroxyde d'hydrogène est le suivant :

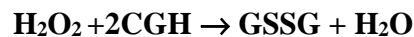


C. La glutathion peroxydase :

L'enzyme glutathion peroxydase a été découverte dans les tissus animaux en 1957 par G.C. Mills aux États-Unis. La plupart du glutathion libre *in vivo* est présent sous forme de GSH plutôt que de GSSG. Mais jusqu'à un tiers du glutathion cellulaire total peut être sous forme de « disulfures mixtes » avec d'autres composés contenant du __SH groupes comme la cystéine, la coenzyme A et les résidus cystéine __SH de plusieurs protéines. Si l'on utilise R-SH pour représenter ces autres molécules, les disulfures mixtes ont la formule générale :



La glutathion peroxydase catalyse l'oxydation du GSH en GSSG au détriment du peroxyde d'hydrogène.



Il est présent à un niveau d'activité élevé dans le foie, à un niveau d'activité modéré dans le cœur, les poumons et le cerveau, et à un niveau d'activité faible dans les muscles (**Halliwell & John, 1985**).

L'enzyme est spécifique du GSH comme donneur d'hydrogène mais accepte d'autres peroxydes comme ainsi le peroxyde d'hydrogène. Elle est constituée de quatre sous-unités protéines, chacune contenant un atome de l'élément sélénium dans son site actif (**Halliwell & John, 1985**).

Cependant, les rapports GSH /GSSG dans les cellules normales sont maintenus à un niveau élevé pour cela il doit y avoir un mécanisme de réduction des GSSG en GSH. Ce mécanisme est réalisé par les enzymes glutathion réductase, qui catalysent la réaction (**Halliwell & John, 1985**).



1.2.3.2. Les antioxydants non-enzymatiques

A. Le glutathion (γ -Glutamyl-cystéinyl-glycine ou GSH)

Le rôle majeur de glutathion est de protéger les lipides, les protéines et les acides nucléiques contre l'oxydation (**Stamler & Slivka, 1996**). En cas de stress oxydant, son rôle de coenzyme de la GSHPX le

rend indispensable pour protéger et détoxifier. Il interagit également de manière synergique avec d'autres composants du système de protection anti-oxydante tels que la vitamine C, la vitamine E, et les superoxyde dismutases (**Gérard & Chaudière, 1996**).

B. Le β -carotène

L'alimentation apporte le β -carotène qui possède diverses capacités : il est un précurseur de la vitamine A, il est capable de capturer l'oxygène singulet à faible pression d'oxygène et associé à d'autres caroténoïdes, il peut arrêter les réactions en chaîne lipoperoxydation. Le β -carotène joue un rôle important dans la protection des structures cellulaires contre les agressions oxydantes en s'opposant à la cyto- et à la génotoxicité de nombreux agents (**Allard et al., 1994**).

C. Acide urique

L'acide urique est également un puissant piègeur d'ozone et d'acide hypochloreux, un agent oxydant produit par la myéloperoxydase. La réaction d' OH avec l'acide urique produit une série de radicaux libres qui réagissent principalement avec O pour générer des radicaux peroxyurates. Ces radicaux dérivés d'urates, bien que beaucoup moins actifs que OH, ne sont pas complètement libres et nocif, par exemple, ils peuvent inactiver l'alcool déshydrogénase (de la levure) et l'alpha-antiprotéinase humaine. Par conséquent, l'acide urique, comme le GSH ou l'acide ascorbique, n'est pas toujours un antioxydant "parfait" (**Halliwell & John, 1985**).

1.2.4. Le système antioxydant exogène

1.2.4.1. Les vitamines

A. Vitamine C

Du corps. Le tocophérol est un composant essentiel de la membrane cellulaire et protège les cellules contre les dommages oxydatifs. Cependant, lorsqu'il est exposé à un stress oxydatif, il se convertit en tocophéroxyle, qui est un radical libre. C'est là que la vitamine C intervient. Cependant, une fois qu'il a neutralisé les radicaux libres, le tocophérol lui-même devient un radical tocophéroxyle instable. C'est là que la vitamine C intervient en régénérant le tocophérol à partir de ce radical tocophéroxyle, permettant ainsi à ce dernier de continuer à protéger les membranes cellulaires (**Bendich et al., 1986**).

La vitamine C présente également d'autres avantages pour la santé, tels que le renforcement du système immunitaire, la synthèse du collagène, la cicatrisation des plaies et l'absorption du fer. Cependant, il est important de noter que la vitamine C est une vitamine hydrosoluble, ce qui signifie qu'elle est facilement excrétée par l'organisme. Il est donc important de s'assurer de consommer suffisamment de vitamine C

par le biais de l'alimentation ou de compléments alimentaires pour soutenir une bonne santé (**Gabin et al., 2015**).

B. Vitamin E

La vitamine E est une vitamine liposoluble qui est en fait composée de deux familles des composés : les tocophérols (alpha, bêta, gamma, et delta) et les tocotriénols (alpha, bêta, gamma et delta) (**Stephanie , 2001**).

Alpha-tocophérol est l'une des huit types de vitamine E synthétise par les plantes, et la seule qui réponde aux besoins de l'homme. IL est piège les radicaux peroxy au cours de la propagation de la peroxydation lipidique. On l'appelle un antioxydant briseur de chaine car il empêche la réaction en chaine de la peroxydation lipidique. Mais n'empêche pas la formation des radicaux libres lipidiques peroxyes initiaux (**Katie & Maret, 2013**).

1.2.4.2. Les Polyphénols

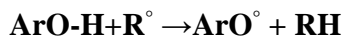
Les polyphénols sont le groupe le plus important d'antioxydants naturels, ils sont largement présents dans le règne végétal et donc dans notre alimentation. Ils contribuent aux qualités organoleptiques et nutritionnelles des fruits et légumes.

Tableau 02 : Classification des composés phénoliques en fonction du nombre d'atomes de carbone et des exemples de leurs sources (**Guardado et al., 2012**).

| Les Types | Les nombres d'atomes de carbone | Sources |
|-------------------------------|---------------------------------|------------------|
| Les phenols simple | C6 | Gayuba |
| Les acides hydroxybenzoiques | C6-C1 | Vin blanc |
| Les acides hydroxycinnamique | C6-C3 | Pomme, vin rouge |
| Flavonoïdes et isoflavonoïdes | C6-C3-C6 | Olive |

Les polyphénols et les composés phénoliques présentent un intérêt particulier car ils protègent l'organisme du stress oxydatif, qui contribue à de nombreuses maladies, dont le cancer, le vieillissement et les maladies cardiovasculaires (**Shahidul et al., 2002**).

Le radical libre est réduit par le transfert d'atome d'hydrogène d'antioxydant (ArO-H) vers le radical (R).



1.2.4.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe de composés naturels ayant des structures phénoliques variables et que l'on trouve dans les plantes (**Shashank & Abhay, 2013**). Le rôle principal des flavonoïdes dans les plantes est de donner aux fleurs une couleur attrayant pour les pollinisateurs. Dans les cellules des feuilles, ils jouent un rôle protecteur contre les rayons UV et les agents pathogènes (**Parcheta et al., 2021**). Chimiquement, les flavonoïdes reposent sur un squelette à quinze atomes de carbone, composé de deux anneaux benzéniques (A et B,) reliés par un anneau hétérocyclique de pyrane (C) (**Shashank & Abhay, 2013**).

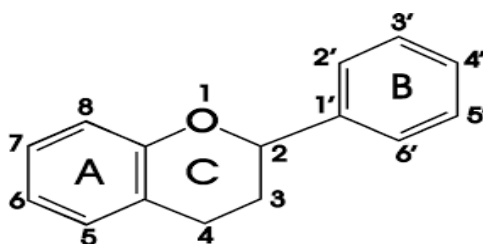
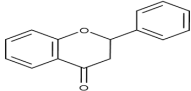
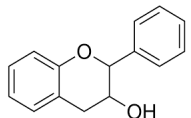
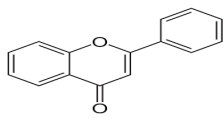
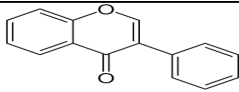


Figure 03 : Structure de flavonoïde (Site web N°1).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes selon leur origine biosynthétique, telles que les flavones, les flavonols, les flavanones, et d'autres encore, dont leurs structures générales sont présentées dans le (tableau 03) (**Shashank & Abhay, 2013**).

Figure 03 : Structures et classification des flavonoïdes

| Groupe de flavonoïdes | Structures | Exemples | Références |
|-----------------------|---|--|-----------------------------|
| Flavanones |  | L'hespérétine La naringénine Catéchine | Parcheta et al.,2021 |
| Flavonoles |  | Quercétine, Kaempférol, Myricétine Fisétine | Parcheta et al.,2021 |
| Flavones |  | Chryisine L'apigénine La lutéoline | Parcheta et al.,2021 |
| Isoflavones |  | Genistein Daidzein | Parcheta et al.,2021 |

1.2.5. Mécanismes d'action

Les mécanismes les plus fréquents sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 04 : Mécanismes d'action des antioxydants

| Substance | Mode d'action | Références |
|------------|---|---|
| Vitamine C | -Inhibe la peroxydation des lipides -Élimine l'oxygène moléculaire -Donneur d'hydrogène aux radicaux lipidique et aux radicaux tocophéroxyles pour régénérer le tocophérol. | Gabin et al.,2015 ; Cillard et al., 2006 |
| Vitamine E | -Protège les parties grasses des cellules du corps contre les attaques des radicaux libres en excès. | Katie et al., 2013 |

| | | |
|-----------------|---|-----------------------------|
| | <ul style="list-style-type: none"> -Empêche le cholestérol de prendre sa forme « oxydée » ou d'obstruction des artères. -Empêche la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique | |
| Les Polyphénols | <ul style="list-style-type: none"> -Interagissent avec les métaux de transition, en particulier le fer et le cuivre. La réduction d'O₂ conduit à la formation de radicaux superoxydes, peroxyde d'hydrogène et oxygène (réaction de Fenton). -Forment de complexes de chélation stables et inertes. -Piègent des radicaux libres par le transfert d'atomes d'hydrogène. | Moran et al.,1997 |
| Les flavonoïdes | <ul style="list-style-type: none"> -Chélateurs des métaux. -Piègent d'anion superoxyde et donneurs d'hydrogène. -Piègent directement des radicaux libres. -Inhibent la peroxydation lipidique. -Inhibent les enzymes responsables de la production des E.O.R. | Cillard et al., 2006 |

Chapitre II

La plante Aster squamatus

(Spreng.) Hieron

II. La plante médicinale sélectionnée

II.1. Généralités

Le mot grec "*Aster*" signifie étoile, il est lié à la forme de la fleur (**Harkati, 2011 ; Mezache, 2010**). C'est un terme inventé par le botaniste *Ivan Ivanovic Martinov* en 1820. Les Astéracées (*Asteraceae*), anciennement appelée *Compositae*, sont une grande famille des plantes dicotylédones (**De Brogli et al., 2016**) qui comprend plus de 1 500 genres et 25 000 espèces, dont 750 sont endémiques. En Algérie cette famille est la plus importante avec 109 genres et 408 espèces (**Quezel & Santa., 1969**).

Bien que tous les types biologiques présents chez les composées : arbres, lianes, arbustes, plantes succulentes, épiphytes, plantes aquatiques, etc.... la plupart des espèces sont principalement des herbacées vivaces ou annuelles (**Bremer et al., 1994**).

L'une des propriétés typiques des plantes composées est leur richesse en divers composés naturels (**Harborne & Swain., 1969**).

II.2. La plante *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron.

II.2.1. Le genre *Aster*

Les *Asters* appartiennent à la famille des *Asteraceae*, tribu *Astereae* (**Corea et al., 2004**). Ce grand genre est originaire des régions tempérées de l'hémisphère nord et principalement d'Amérique du Nord (**Burnie et al., 2006**), dont environ 500 espèces indigènes américaines, plus de 100 espèces réparties en Chine sont originaires d'Europe, d'Asie et d'Afrique du Sud (**Oren et al., 2000 ; Liu et al., 2010**).

Les espèces de ce genre sont des plantes herbacées vivaces et caduques ou de sous-arbrisseaux persistants, variant en taille de la miniature pour rocaille à la géante, de 2 m de hauteur. Les *Asters* ont des feuilles simples, généralement avec des bords lisses assez petit, parfois pubescent. Les plantes se revêtent, généralement en fin d'été ou en automne, de capitules voyants dans une vaste gamme de coloris dans le bleu, violet, pourpre, rose, rouge et blanc, présentant toujours un disque central jaune ou violet (**Burnie et al., 2006**).

II.2.2. L'espèce *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron

II.2.2.1. Classification

Règne : Plantae

Embranchement : Angiospermae

Classe : Dicotylédonae

Sous classe : Astéridae

Ordre : Astérale

Famille : Asteraceae

Tribu : Astereae

Sous-tribu : Asterinae

Genre : *Aster*

Espèce : *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron.

II.2.2.2. Aire géographique

Aster squamatus est une plante d'automne annuelle halophile originaire d'Amérique du Sud et trouvée dans des oasis aussi éloignées que le désert du Sahara (Quezel & Santa, 1963).

II.3. Description botanique

Aster squamatus est caractérisé par les aspects morphologiques mentionnés dans le **tableau 05**.

Tableau 05 : Description des différents parties de la plante *Aster squamatus*

| Parties | Descriptions | Références |
|---------------|--|----------------------|
| Les tiges | Sont très fins, rougeâtre de 40 à 80 cm | Quezel & Santa, 1963 |
| Les feuilles | Possède des feuilles premières ovales et entières, les inférieures glabres, alternes, charnues et très étroites entières | Quezel & Santa, 1963 |
| Les capitules | Sont petits (6-7 mm de diam) | Quezel & Santa, 1963 |
| Les akènes | Sont fusiformes et très petits (2 mm env) | Quezel & Santa, 1963 |



Figure 04 : *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron (Site Web N°2).



Figure 05 : Les différentes parties de la plante *Aster squamatus* (Site Web N°3).

II.4. La composition chimique

La littérature sur la composition chimique de la plante *Aster squamatus* indique la présence d'acides caféique, cinnamique et sinapinique dans des fractions solubles d'extraits aqueux des feuilles, des tiges et des racines de cette plante. Par conséquent, une variété des flavonoïdes a été isolés des fleurs de la plante telles que : squamatine, ternatine, ramnetime, kaempférol, baicaleine, lutéoline-7-méthyletherleter et quercétine (El-Sayed & Ross, 1987 ; Sperotto et al., 2002).

II.5. Propriétés biologiques

La plante *Aster squamatus* est douée de plusieurs propriétés biologiques (Tableau 06).

Tableau 06 : Les propriétés biologiques de la plant *Aster squamatus*

| Activités Biologique | Références |
|---|--|
| Effet antioxydant | Ghedani et al., 2002 ; Boulechfar et al., 2014 |
| Anti ulcérogène | Ghedani et al., 2002 |
| Inhibition de la sécrétion de l'acide gastrique | Ghedani & Almeida, 2007 |
| Effet anti-diarrhéique | Ghedani & Almeida, 2007 |
| Réduction de la propulsion gastro-intestinale | Ghedani et al., 2002 |
| Effet anti néoplasique | Ghedani & Almeida, 2007 |
| Effet cicatrisant | Ghedani & Almeida, 2007 |
| Activité anti bactérienne | Boulechfar et al., 2014 |

Deuxième Partie

Étude Expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I. Étude phytochimique

I.1. Récolte du matériel végétal

La plante *Aster squamatus* a été récoltée de la région d'Oum el Bouaghi à la fin du mois de septembre 2019 (stade de floraison). Après séchage dans un endroit sec à l'abri des rayons solaires, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, la plante a été divisée en 4 parties (feuilles, fleurs, tiges et partie aérienne) puis les différentes parties ont été coupées en petits morceaux et broyées dans un moulin électrique puis pesées.

I.2. Extraction

L'extraction a été effectuée par macération à froide. 20 g de poudre végétale est laissé macérer pendant 3 jours dans un mélange hydroalcoolique (Éthanol/eau) (70/30 : v/v). La macération a été répétée 4 fois jusqu'à l'épuisement du matériel végétal. Les extraits ont ensuite été filtrés par papier filtre et soumis à une évaporation dans un étuve à 37° C.

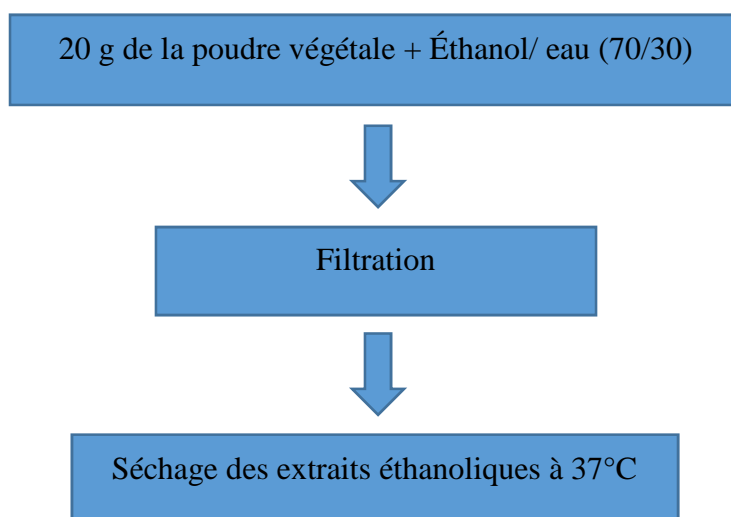


Figure 06 : Méthode de la macération

I.3. Détermination des teneurs en substances bioactives

I.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux de nos extraits a été effectué selon la méthode du réactif Folin-Ciocalteu décrite par (Wong et al., 2006).

❖ Principe

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols dans un milieu

basique, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (**Robbins, 2003**). La coloration bleue ainsi produite est proportionnelle aux taux de composés phénoliques et possède une absorption maximum aux environs de 750-765 nm.

❖ *Mode opératoire :*

Il consiste à mélanger 200 μ L de chaque extrait (0.5 mg d'extrait dilué dans 1 mL méthanol) avec 1mL de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois diluée dans l'eau distillé). Les solutions ont été mélangées et incubées pendant 4 minutes. Après l'incubation, 800 μ L de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (75 g/L) a été ajoutée. Le développement d'une couleur bleue est obtenu après incubation à l'obscurité et à température ambiante pendant 2h. Après incubation, l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm. Le blanc de la réaction ne contenant pas des polyphénols est réalisé et considéré comme le point 0 en mg/mL.

❖ *Expression des résultats*

La concentration en polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (10-200 μ g/mL) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg E).

1.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) cité par (**Djeridane et al., 2006**) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits.

❖ *Principe*

Cette technique est basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Lagnika, 2005**).

❖ *Mode opératoire :*

1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.

❖ *Expression des résultats*

La concentration en flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon la quercétine et exprimée en microgrammes d'équivalents quercétine par milligrammes d'extrait (2.5-30 μ g EQ/mg d'E).

1.3.3. Dosage des chlorophylles totaux et caroténoïdes

Ce test est réalisé comme suit : 1mg d'extrait a été dissous dans 1ml d'eau distillée. L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre à différentes longueurs d'ondes (450 nm, 645 nm, 663 nm). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'extrait (**Hartmut & Alan, 1983**).

La teneur en chlorophylles totaux et caroténoïdes est estimée selon les formules suivantes :

$$\text{Chlorophylle a} = 12,7 * A_{663} - 2,69 * A_{645}$$

$$\text{Chlorophylle b} = 22,9 * A_{645} - 4,68 * A_{663}$$

$$\text{Chlorophylle totaux} = 20,2 * A_{645} + 8,02 * A_{663}$$

$$\text{Caroténoïdes totaux} = 4,07 * A_{450} - [(0,0435 * \text{Chlorophylle a}) + (0,367 * \text{chlorophylle b})]$$

A : Absorbance

1.4. Activité antioxydante

1.4.1. Test au DPPH

L'activité anti-radicalaire de différents extraits a été déterminée par une méthode spectrophotométrique en utilisant le radical libre, 2,2-diphényl-1-picryl-hydrate (DPPH) selon le protocole de **Blois (1958)**. L'acide ascorbique (vitamine C) a été utilisé comme standard antioxydant.

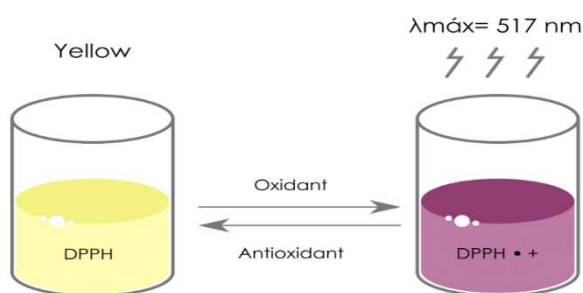


Figure 07 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant (**Site web N°4**).

❖ Le Principe

L'activité antiradicalaire est mesurée par la dégradation du DPPH : 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl, qui est un radical synthétique présentant une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturée en contact d'antioxydants des extraits ou le standard, ce qui explique la

disparition de sa coloration. Cette décoloration explique le pouvoir de l'extrait de la plante à piéger ce radical, qu'on peut détecter par un spectrophotomètre-UV.

❖ *Mode opératoire*

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de DPPH dans le méthanol. Puis 1600 µL de mélange DPPH ont été ajoutés à 400 µL de chaque extrait. Après agitation vigoureuse du mélange, il est conservé au repos pendant 30 min à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre-UV visible.

Le pouvoir d'inhibition du radical DPPH est estimé selon la formule suivante :

$$\% \text{ D'activité anti radicalaire} = [A_0 - A_1] / A_0 * 100$$

A₀ : Absorbance du Blanc.

A₁ : Absorbance de l'extrait.

Où en calculant l'IC₅₀ qui est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH.

II. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été faites en triples et les résultats sont exprimés en moyenne ± écartype. Les résultats sont analysés par une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) suivie d'un test de Tukey à l'aide de GraphPad Prism (version 6.0.1). Les résultats sont considérés comme significativement différents à p<0.05.

Chapitre II

Résultats et Discussion

II. Étude phytochimique

II.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est le rapport entre le poids des fractions obtenu et le poids de la plante.

Tableau 07 : Le rendement d'extraction.

| L'extrait | Le rendement |
|-----------|--------------|
| EEFE | 24,433% |
| EEFL | 12,995% |
| EET | 3,618% |
| EEPA | 17,019% |

Abréviation : EEFE : Extrait éthanoliques de feuilles, EEFL : Extrait éthanoliques de fleurs, EET : Extrait éthanolique de tige, EEPA : Extrait éthanolique de partie aérienne.

Les résultats obtenus montrent que les rendements d'extraction varient entre eux, dont EEFL représente le rendement le plus élevé (24,433%) et le plus faible l'EET par un rendement de (3,618%).

II.2. Teneur en composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en microgrammes équivalent acide gallique par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg E}$), en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

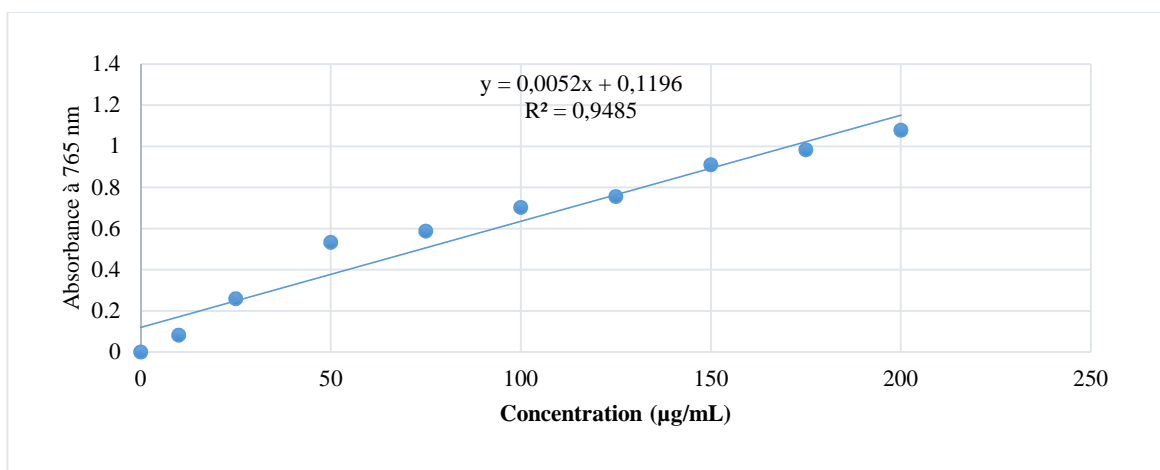


Figure 08 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les résultats du dosage des polyphénols totaux présentés dans la **figure 08** indiquent qu'il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre l'EEFL et les autres parties, par contre il n'y a pas une différence significative ($p > 0,05$) entre l'EEPA et les autres parties.

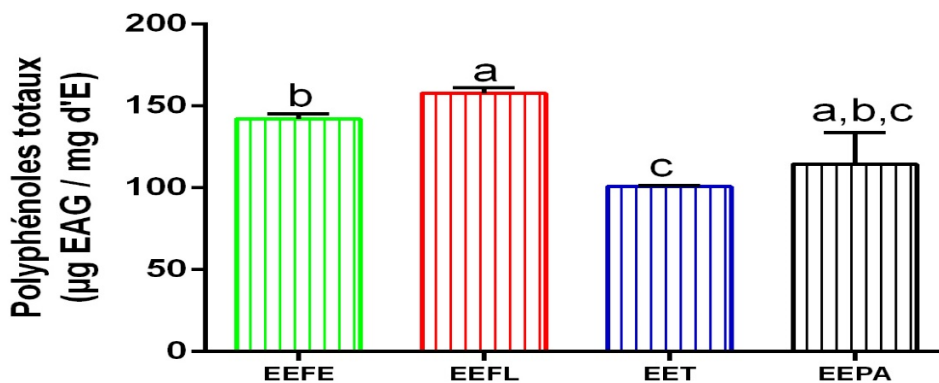


Figure 09 : Teneur en composés phénoliques des extraits de la plante *Aster squamatus*

Les colonnes avec des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$). Les barres verticales représentent l'écart type.

Ainsi, l'EEFL d'*A. squamatus* représente la teneur la plus élevée en polyphénols avec une teneur de $157,97 \pm 3,11$ µg EAG/mg E, tandis que l'EEFE en 2^{ème} position avec une teneur de $142,33 \pm 2,89$ µg EAG/mg E, en 3^{ème} position l'EEPA avec une teneur $114,64 \pm 19,10$ µg EAG/mg E, en dernière position l'EET avec une teneur $100,97 \pm 0,56$. Ces résultats confirment la richesse des fleurs d'*A. squamatus* en substances polyphénoliques.

L'étude menée par Boulebrachene et *al.* (2021) sur l'extrait éthanolique des feuilles d'*A. squamatus*, ont indiqué que l'extrait éthanolique des feuilles a une teneur de $402,10 \pm 0,89$ µg EAG/mg E qui est supérieure en comparant avec nos résultats. Les travaux menés par Dib et *al.* (2022) sur la fraction *n*-BuOH d'extrait éthanolique des feuilles d'*A. squamates*, ont indiqué une teneur en polyphénols totaux de $118 \pm 1,54$ µg EAG/ mg E, qui est proche à nos résultats. Les résultats de Boulechfar et *al.* (2014) sur les fractions *n*-BuOH et AcOEt de l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. squamatus* ont montré des teneurs de $19,82 \pm 1,61$ µg EAG/mg d'E et $8,86 \pm 1,31$ µg EAG/ mg d'E, respectivement, sont inférieures par rapport à nos résultats.

En général, la teneur en polyphénols des extraits dépend de la méthode d'extraction utilisée, de la nature du solvant, le matériel végétal utilisé (Hayouni et al., 2007), ainsi que les conditions de stockage (Falleh et al., 2008 ; Podsdek, 2007).

II.3. Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été déterminée par la méthode au trichlorure d'Aluminium (AlCl_3) et exprimé en μg équivalent de quercétine/mg d'extrait, en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine.

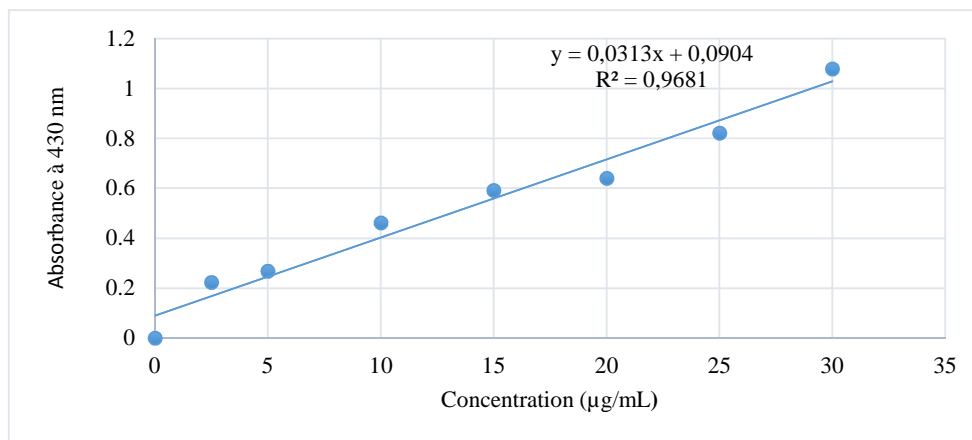


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les résultats obtenus du dosage des flavonoïdes totaux présentés dans la **figure 10** montrent que la teneur en flavonoïdes totaux varie entre les différents extraits de $7,20 \pm 0,24 \mu\text{g EQ/mg E}$ à $15,46 \pm 0,37 \mu\text{g EQ/mg E}$.

Cependant, il n'existe pas une différence significative ($p > 0,05$) entre l'EEFE et l'EEFL, alors qu'il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre l'EEPA, l'EET et les autres extraits.

La teneur la plus élevée est obtenue par l'EEPA, tandis que la plus faible teneur est présentée par l'EET.

Il est important de noter que le genre *Aster* est riche en flavonoïdes. Ces derniers sont largement distribués chez les espèces de ce genre (El-Sayed et al., 1987 ; Allen, 1988).

En comparant les teneurs en flavonoïdes à celles des polyphénols dans tous les extraits, nous observons qu'elles sont toutes plus faibles, ce qui montre que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques que celles des flavonoïdes.

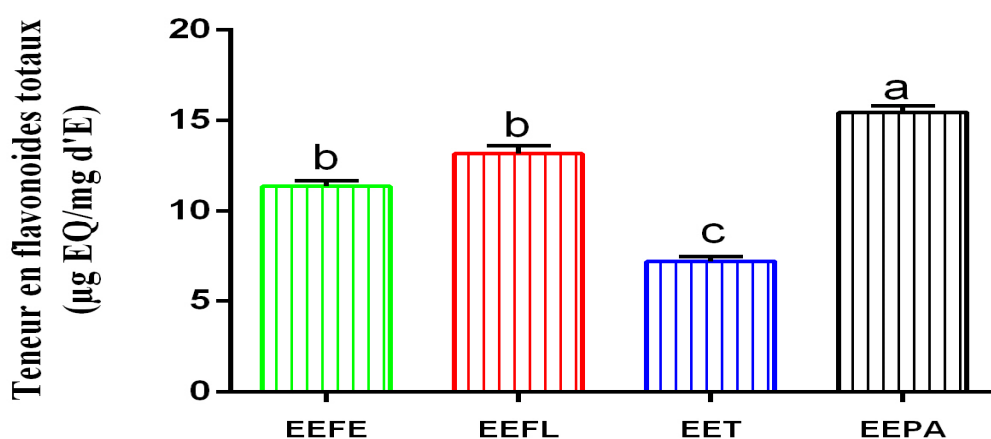


Figure 11 : Teneur en flavonoïdes totaux des extraits de la plante *Aster squamatus*.

Les colonnes avec des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$). Les barres verticales représentent l'écart type.

Nos travaux sont supérieurs à ceux trouvés par Boulebrachene et *al.* (2021) qui ont montré des teneurs en flavonoïdes totaux de l'ordre de $10,45 \pm 0,29$ et $9,35 \pm 0,97$ µg EQ/mg E pour l'extrait éthanolique et l'extrait acétonique des feuilles d'*A. squamatus*. L'étude de Dib et *al.* (2022) sur les fractions butanolique, acétate d'éthyle et chloroformique ont montré des teneurs en flavonoïdes totaux de l'ordre de $24,23 \pm 2,36$ µg EQ/mg E, $19,87 \pm 2,25$ µg EQ/mg E et $12,03 \pm 0,63$ µg EQ/mg E, respectivement qui sont proches de nos résultats. Cependant, nos résultats ne sont pas en agrément avec ceux de Boulechfar et *al.* (2014), qui ont montré des contenus en flavonoïdes totaux des fractions *n*-BuOH et AcOEt de $58,53 \pm 5,10$ µg EQ/mg E et $47,11 \pm 2,82$ µg EQ/mg E.

Il est à noter que la concentration des flavonoïdes dans les extraits des plantes dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits (Marco, 1968).

II.4. Teneur en chlorophylles totaux et caroténoïdes totaux

Les résultats de l'analyse quantitative des chlorophylles et caroténoïdes totaux de différents extraits sont présentés dans les **figures 12** et **13**.

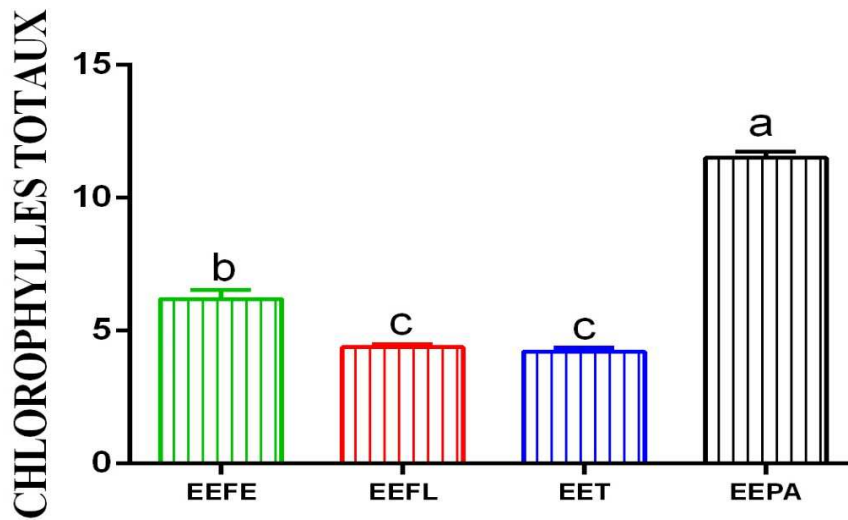


Figure 12 : Chlorophylles totaux

Les colonnes avec des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$). Les barres verticales représentent l'écart type

D'après la **figure 12**, la teneur en chlorophylle totaux variée entre $4,21 \pm 0,15 \mu\text{g/mg E}$ et $11,50 \pm 0,24 \mu\text{g/mg E}$. Cependant, il n'existe pas une différence statistique significative ($p > 0,05$) entre EEFL et EET. La teneur la plus élevée est obtenue par EEPA, tandis que la plus faible teneur est présentée par EET.

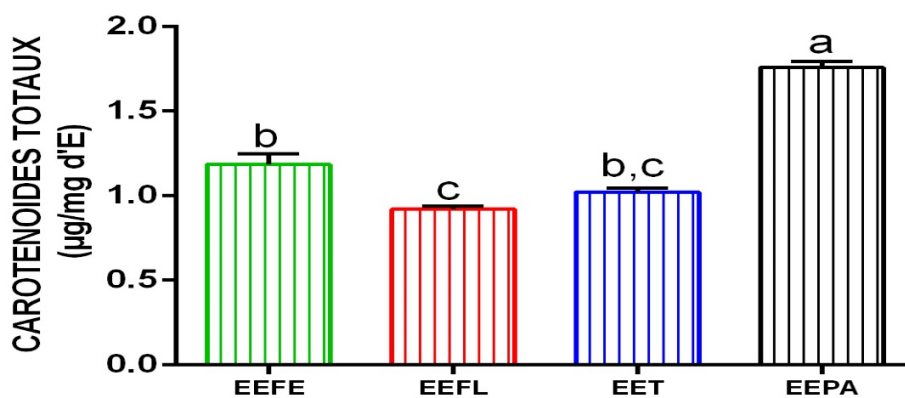


Figure 13 : Caroténoïdes totaux

Les colonnes avec des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$). Les barres verticales représentent l'écart type

Les résultats du dosage de caroténoïdes totaux présentés dans la **figure 13** ont montré des teneurs variables de $0,92 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg E}$ à $1,76 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg E}$ dont la teneur la plus élevée est obtenue par EEPA, alors que la teneur la plus faible est trouvée dans EEFL.

Il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre EEPA et les autres extraits. Par contre, il n'existe pas une différence significative ($p > 0,05$) entre EET et les deux extraits EEFL et EEFE.

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Chebab (2012)** qui a indiqué la richesse d'extrait d'*Artemisia herba alba* (plante de la famille Asteraceae) en substances chlorophylliennes. Par contre, nos résultats de dosage des caroténoïdes totaux sont supérieurs à ceux trouvés dans d'*Artemisia herba alba* ($3,46 \pm 0,27 \mu\text{g}/\text{g}$) (**Chebab, 2012**).

Il est à noter que l'augmentation des teneurs en chlorophylle totale est la conséquence de la réduction de la taille des cellules foliaires sous l'effet d'un stress hydrique qui engendre une plus grande concentration (**Siakhène, 1984**). Par contre, la chute des teneurs en chlorophylle est la conséquence de la réduction de l'ouverture des stomates visant à limiter les pertes en eau par évapotranspiration et par augmentation de la résistance à l'entrée du CO_2 atmosphérique nécessaire à la photosynthèse (**Bousba et al., 2009**).

Ainsi, la teneur en chlorophylle peut être influencée par beaucoup de facteurs tels que l'âge des feuilles, la position des feuilles, et les facteurs environnementaux tel que la lumière, la température et la disponibilité en eau (**Hikosaka et al., 2006**).

II.5. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des quatre extraits a été évaluée par le test au DPPH. Ce test nous a permis de déterminer la capacité de nos extraits à neutraliser le radical libre DPPH présent dans le milieu réactionnel. L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par le calcul de la valeur IC_{50} qui indique la concentration nécessaire de l'extrait qui inhibe 50% du radical libre DPPH. Il est à noter que l'extrait qui présente la valeur d' IC_{50} la plus faible, est l'extrait le plus puissant (**Mghezzi Habellah et al., 2016**).

En général, on observe qu'il y a une augmentation de l'activité antioxydante avec l'augmentation de la concentration des extraits (**la figure 14**) et que tous les extraits étaient capables de piéger le radical DPPH libre.

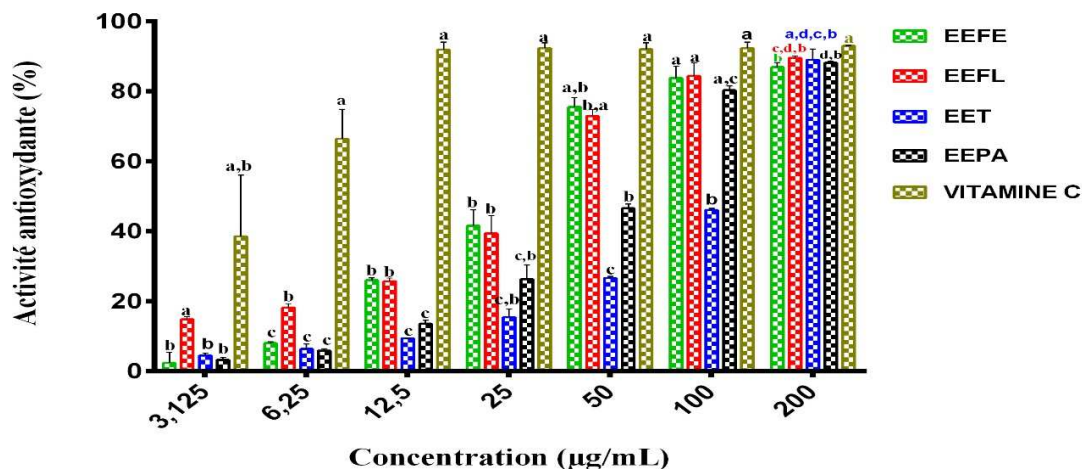


Figure 14 : L’activité antioxydante des extraits à différentes concentrations

Les colonnes avec des lettres différentes indiquent des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$). Les barres verticales représentent l’écart type.

A une concentration finale de 200 µg/mL, tous les extraits ont montré une activité antiradicalaire très puissante contre le DPPH avec des valeurs de $89,55 \pm 0,57\%$ par EEFL, $89,00 \pm 3,05\%$ par EET, $88,12 \pm 0,39\%$ par EEPA et $86,87 \pm 1,19\%$ par EEFE. Cependant, aucun extrait n’a montré une activité comparable à celle du standard vitamine C ($93,00 \pm 0,07\%$).

D’après le **tableau 08**, le IC_{50} obtenue variée entre $3,51 \pm 0,41$ µg/mL E et $109,17 \pm 1,56$ µg/mL E. Cependant, il n’existe pas une différence significative ($p > 0,05$) entre EEFL et les deux extraits EEFE et EEPA. Par contre il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre EET et les autres extraits.

La valeur d’ IC_{50} la plus élevée est obtenue par l’EET, tandis que la valeur la plus faible est présentée par le standard vitamine C.

Tableau 08 : Valeurs d'IC₅₀ des extraits

| Les Extraits | EEFE | EEFL | EET | EEPA | Vitamine C |
|----------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| IC ₅₀ (µg/mL E) | 32,17±0,45 ^b | 32,70±3,26 ^{c, b} | 109,17±1,56 ^d | 55,09±1,84 ^c | 3,51±0,41 ^a |

Note : Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD des trois mesures. Les valeurs avec des lettre différent (a, b, c ou d) dans la même ligne sont significativement différentes (p < 0,05).

Abréviation : EEFE : Extrait éthanoliques de feuilles, EEFL : Extrait éthanoliques de fleurs, EET : Extrait éthanolique de tige, EEPA : Extrait éthanolique de partie aérienne.

En effet, l'efficacité des extraits à piéger le radical DPPH peut être classé selon leur IC₅₀ dans l'ordre suivant : Vitamine C > EEFE > EEFL > EEPA > EET (**tableau 08**). On remarque aussi que EEFL et EEFE sont les extraits les plus puissants parmi les extraits de la plante *A. squamatus* et ceci peut être expliqué par leur forte teneur en polyphénols et flavonoïdes.

Nos résultats sont supérieurs à ceux de Dib et *al.* (2022) qui ont montré des IC₅₀ de l'ordre de 3,125 µg/mL, et inférieurs à ceux de Boulechfar et *al.* (2014) qui ont montré des IC₅₀ de l'ordre de 351,06 µg/mL et 571,44 µg/mL des fractions *n*-BuOH et AcOEt, respectivement. Nos résultats sont aussi supérieurs à ceux obtenus par Boulebrachene et *al.* (2021) (IC₅₀ de l'ordre de 42,71±0,88 µg/mL et 40,81±7,87 µg/mL pour l'extrait éthanolique et l'extrait acétonique, respectivement).

Conclusion

La croissance de l'industrie et le développement incessant de nouveaux produits médicaux synthétiques et biologiques plus efficaces n'a diminué l'importance des plantes médicinales dans beaucoup de sociétés (OMS, 1998).

Aujourd'hui, à l'aide des plantes les usages médicinaux des herbes présentent un grand intérêt pour la recherche biomédicale et deviennent plus important que la chimiothérapie. Une partie de ce nouvel intérêt vient des plantes médicinales qui sont une source inépuisable de substances et des composés naturels biologiquement actif, et d'autre part, il est nécessaire de rechercher un meilleur traitement médical avec des traitements plus doux sans effets indésirables.

Notre étude a été menée pour évaluer la teneur en substances bioactives et le potentiel antioxydant de différents extraits de la plante *Aster squamatus* de la région d'Oum el Bouaghi. Tous les résultats obtenus nous amènent à conclure que cette plante est une source potentielle des polyphénols, flavonoïdes, chlorophylles et caroténoïdes aux propriétés antioxydantes. C'est une source naturelle qui a prouvé son utilisation traditionnelle dans de nombreux soins des maladies associées aux stress oxydatif.

Partant de ces résultats, il est nécessaire de :

- Approfondir l'étude phytochimique en utilisant des techniques plus performantes (comme l'HPLC, LC/MS...) pour une meilleure identification des molécules bioactifs,
- Établir d'autres tests *in vitro* pour confirmer le pouvoir antioxydant,
- Établir des tests *in vivo* pour confirmer l'efficacité de cette dernière, afin de l'utiliser pour l'intérêt de la santé humaine.

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Allard J.P., Royall D., Kurian R., Muggli R. & Jeejeebhoy K.N.** (1994). Effects of beta-carotene supplementation on lipid peroxidation in humans. *Am J Clin Nutr*, 40-884. doi:10.1093/ajcn/59.4.884.
- Allen G.A.** (1988). Flavonoids of *Aster bracteolatus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16(2) :139-141.

B

- Bendich A., Machlin L.J. & Scandurra O.** (1986). The antioxidant Role of Vitamin C. 1986, 2, 419-444. Département of Vitamins and Clinical Nutrition, Hoffmann-LaRoch Nutley, NJ, Canada: Pergamon Journals Ltd.
- Bensakhria A.** (2018). Toxicologie générale, le stress oxydatif, 70-86
- Blois M.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.
- Bremer K., Gordon P. & Dewolf J.** (1994). *Asteraceae cladistics and classification*. Portland
- Boulebrachene I., Chelli N. & Souames A.** (2021). Etude in-vitro des activités antioxydante et photoprotectrice des feuilles de la plante *Aster squamatus* (Spreng.) Hieron. Mémoire master II en biochimie appliquée. Université de 20 aout 1955 Skikda.
- Boulechfar S., Zellagui A. & Gherraf N.** (2014). Total phenolic and flavonoid content and in vitro antioxidant and antibacterial activity of *Aster squamatus* Hier. *There pharmacia lettre*, 6 (5) :112-115.
- Bousba R., Ykhlef N. & Djekoun A.** (2009). Water use efficiency and flag leaf photosynthetic in response to water deficit of durum wheat (*Triticum durum* Desf). *World Journal of Agricultural Sciences* 5. 5. 609 -616p.
- Burnie G., Forresster S., Greig D., Guest S., Harmmony M., Hobley S., . . . Silk J.** (2006). *Botanic, Encyclopédie de botanique et d'horticulture*. Editions places des victoires. Paris.

C

- Chaabi M.** (2008). Etude phytochimique et bioogique d'espèces végétales africaines: *Euphorbia stenoclaBail.* (Euphorbiaceae), *Anogeissuslio carpusGuill.* Etperr. (Combrétaceae). *Limoniastrum feei*(Girard) Batt. (Plumbaginaceae). . Thèse de doctrat en pharmaco chimie . Université Louis Pasteur et Université MENTOURI de Constantine (Alger).
- Chebab H.**(2012).Étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques d'*artimisia herba alba*.Memoire de magister,universite saad dahleb de blida.
- Chrestelle K.R.** (2006 novembre 22). Oxygène, stress oxydant et supplémentatin antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. 20(4), 165-177.
- Cillard J. & Cillard P.** (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydation. OCL-Oleagineux Corps Gras Lipides, 13(1),24-29.
- Claire P.** (2002). 150 recettes antioxydantes. French: Marbout Paris.
- Corea G., Iorizzi M., Lanzotti V., Cammareri M., Conicella C., Laezzad C. & Bifulco M.** (2004). Astersedifolioside A–C, three new oleane-type saponins with antiproliferative activity. *Bioorganic et Medicinal Chemistry* ,12 : 4909–4915.
- Culter R.G., Packer L., Bertram J. & Mori A.** (1995). *Oxydative Stress And Aging*. Basel. Boston. Berlin: National Institutes of health nih library.

D

- De Brogli G., Dotoli G., Carrène d'Encausse H. & Selvaggio M.**(2016). Dictionnaire de l'acadimie francaise.
- Dib R., Ghedied K., Khouder Y. & Mordjah R.** (2022). Etude du potentiel antioxydant des fractions phénoliques de la plante *Aster squamatus* (Spreng.) Heiron. Mémoire master 2 en biochimie appliquée. Université de Skikda.
- Djeridane A., Yous M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. & Vidal N.** (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.

E

El-Sayed H. & Ross A. (1987). Bulletin of Pharmaceutical Sciences.

F

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. & Abdely C. (2008) Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*. 331(5) : 372-379.

G

Gabin F., Bayach I., Berka K., Paloncyova M., Starok M., Rossi C., . . . Trouillas P. (2015). Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular association in biomembranes. The royal Society of Chemistry.

Gérard M.D. & Chaudiere J. (1996). Métabolisme et fonction antioxydante du glutation. *Path Biol*, 44(N°1), 77-85.

Ghedani P., Esteves C., Burger M., Bauermann L., Magni D. & Borgmann S. (2002). Preliminary Studies of anti-Ulcerogenic Effect of *Aster squamatus* Leaves Hydroalcoholic Extract on Various Ulcer Models in Rats. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 165-168.

Ghedini P. & Almeida C.E. (2007). Butanolic Extract of *Aster squamatus* Aerial parts is the active fraction responsible to the antiulcer and gastric acid antsecretory effects. *Latin American Journal of pharmacy*(6), 92-889.

Goudable J. & Favier A. (1996, décembre 20). Radicaux libre oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin*(11), 20-150. doi:[http://doi.org/10.1016/S0985-0562\(97\)80058-1](http://doi.org/10.1016/S0985-0562(97)80058-1)

Guardado E.Y., Enrique M.P., Maria J.M. & Eugenio U.V. (2012). Antioxidant and pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. 26-27. Cuba Spain, University of Santiago de Compostella.

H

Halliwell. & Barry. (1991 Septembre 30). Reactive Oxygen Species in living systems:Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. *The American journal of Medicine*, 91, 3_19. doi:[http://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90279-7](http://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90279-7)

- Halliwell B. & John M.** (1985). Free Radicals in biology and medicine. London: Oxford university press.
- Harborne J.B. & Swain T.** (1969). Perspectives in Phytochemistry. Academic Press, London , New York.
- Harkati B.** (2011). Valorisation et identification structurale de principes de la plante de la famille Asteraceae: *Scorzonera undulata*. . Université de Mentouri Constantine, Constantine .
- Hartmut L.K. & Alan W.R.** (1983). Determinatio, of total carotenoids and chlorophylls a and b in different solvents. Biochemical Society tranactions 11(5),591-592,1983.
- Hayouni E., Abedrabba M., Bouix M. & Hamdi M.** (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Chimie alimentaire*105(3) : 1126-1134. <https://identify.pl@ntnet.org/fr/the-plant-list/species>.
- Hikosaka K., Ishikawa K., Borjigidai A., Muller O. & Onoda Y.**(2006). Temperature acclimation of photosynthesis.mechanisms involved in the changes in temperaturedependence of photosynthetic rate.*J. Exp. Bot.* 57:291-302.

K

- Katie M.L. & Maret G.T.** (2013). Interaction between alpha-tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.freediomed.2013.07.039>

L

- Lagnika L.** (2005). "Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises" Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 2005, page:249.
- Lori A.S., Diekert K. & Laran T.J.** (2001 aout 10). A fraction of yeast Cu/Zn superoxide dismutase and its metalochaperon,CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria: a physiological rol for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. pp. 02-13. doi:Doi:10.1074/jbc.M105296200
- Liu Z., Liu Y., Zhao L., Xu J. & Tian X.** (2010). The phenylpropanoids of Aster.

M

Marco G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants, 45 :594 –598.

Marian V., Dieter L., Jan M., Mark T.D.C., Milan M. & Joshua T. (2006). Free radicals and antioxydants in normal physiological function and human disease. the international journal of biochemistry & Cell Biology. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

Martyn C.R. & John M.C. (1998). Free radicals and iron:chemistry,bioogy,and Medicine. New York: Oxford University Press.

Mercan D. (2010). Le terme stress oxydatif est un anglicisme. Récupéré sur Campus Numérique: <http://elearn.univ-tlemcen.dz>

Merouane A., Noui A., Medjahed H., Nedjari B. K. & Saadi A. (2014). Activité antioxydante des composées phénoliques d'huile d'olive extrait par méthode traditionnelle. International Journal of biological and chemical science(8(4)), 1865-1870.

Mezache N. (2010). Détermination structurale et évaluation biologique de substances naturelles de quelques espèces de la famille asteraceae. 4-5. Constantine, Université Mentouri Constantine: Senecio giganteus Desf.

Mghezzi Habellah R., Karoune S., Kechebar M.S.A. & Bounab H. (2016). Etude des composés phénoliques et des activités antioxydantes de l'Acacia ehrenbergiana de la région de Tindouf.

Millogo J., Nacoulma O., Meda A., Lamien C. & Romito M. (2005). Détermination des teneurs totales en phénols, flavonoides et proline dans le miel du Burkina Faso, ainsi leur activité de piégeage des radicaux. Chimie alimentaire.

Moran J.F., Klucas R.V., Grauer R.J., Abian J. & Becana M. (1997). Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: peroxidant and antioxidant properietes . Free radic Biol Med, 70-861.

O

OMS. (1998). Réglementation des médicaments à base de plantes La situation dans le monde, Genève: 1-49.

Oren-Shamir M., Shaked-Sachray L., Nissim-Levi A. & Weiss D. (2000). Effect of growth temperature on Aster development. Hortscience.

P

Parcheta M., Renata S., Sylwia O., Monika A., Renata C. & Woldzimierz L. (2021). Recent Developments in Effective Antioxidants : The Structure And antioxidant Properties. pp. 8-24.

Podsdek A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. LWT-Food and Science Technology, 40, (1) :1-11.

Q

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

R

Robbins R. J. (2003). "Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology."Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(10): 2866-2887.

S

Sanago R. (2006). Le role des plantes médicinales en médecine traditionnelle . Université Bamako.

Shahidul I., Makoto Y., Shoji Y., Shigenori O., Koji I. & Osamu Y. (2002). Identification and Characterization of foliar Polyphenolic composition in sweetpotato (Ipomoea batatas L.) Genotypes. Agricultural and food chemistry, 3718-3722.

Shashank K. & Abhay K. P. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal, 0-16. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750

Shu Y. (1998). Recent natural products based drug development : a pharmaceutical industry perspective . Journal of Natural Products , 1053-1071.

Siakhène N. (1984). Effet du stress hydrique Sur quelques espèces de luzerne Annuelle. Mémoire ing Agr. INA. El Harrach : 90 p.

Site Web N°1: https://www.researchgate.net/figure/structure-chimique-de-base-des-flavonoides-Structure-chimique-de-base-des-flavonoides_fig3_313309648 [accessed 9 Jul 2023].

Site Web N°2: <https://herbierdicietdailleurs.eklablog.com/symphotrichum-squamatum-aster-squamatus-aster-ecailleux-a132409900>.

Site web N°3: https://dryades.units.it/floritaly/index.php?procedure=taxon_page&tipo=all&id=5421

Site Web N°4: <https://libios.fr/solutions-analytiques/stress-oxydatif-capacite-anti-oxydante/kits-dosage-stress-oxydatif-brcapacite-antioxydante/dpph-capacite-antioxydante>.

Sperotto J., Bialeski N., Savegnago L., Heinzmann B., Karnikowski M. & Baldisserotto B. (2002). Effect on gastrointestinal propulsion and preliminary phytochemical analysis of *Aster squamatus* (Asteraceae).

Stamler J.S. & Slivka A. (1996). Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascularrelated disease. *Nutr Rev*, 1-30. doi:10.1111/j.1753-4887.1996.tb03770.x

Stephanie P. (2001). Vitamine E anti-aging antioxidant. LONDON: A DORLING KINDERSLEY BOOK.

W

Wong C., Li H., Cheng K. & Chen F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97 : 705-711.