

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE
ET BIOCHIMIE



DOMAINE : SNV
FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES
OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUÉE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par : HIMEUR Amina
CHAREF Zoubida

Intitulé

**Evaluation de l'activité antioxydante des extraits
d'*Ammi visnaga***

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. BENSLAMA Abderrahim	Université de M'sila	Encadreur
Mr. HARRAR Abdenassar	Université de M'sila	Examinateur
Mme. BOUAZIZ Samia	Université de M'sila	Examinatrice

Année universitaire : 2020 /2021

Dédicace

Alhamdoulillah, louange à Allah qui nous a accordé assez de chance et de succès pour atteindre ce niveau.

*Je dédie ce succès à la source de ma joie et mon espoir dans ma vie, ma mère **Noura**.*

*A mon solide pilier et à mon plus grand soutien dans la vie, mon père **Abderrahmane**.*

*Je dédie à mon âme sœur qui a tout fait pour me voir à des niveaux supérieurs, ma sœur **Ahlem**.*

*A mon autre moitié et solide coté qui m'a le plus soutenu durant ma carrière mon frère **Abdel Bakj**.*

*Au gardien de mes secrets, mon âme sœur et ma meilleure amie **Dounia**.*

*Sans oublier **Amina**, ma partenaire qui a géré ma folie toute l'année.*

Zoubida Charef

Dédicace

Il m'est agréable de profiter de cette occasion, pour rendre un hommage particulièrement sincère à travers ce modeste ouvrage, à tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'ont soutenu moralement et matériellement, je profite pour exprimer tous mes gratitudees envers ma famille.

Je dédie donc ce modeste travail :

*A mes très chers parents mon père **Abdelmadjid** et ma mère **Djamila** pour leur patience, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs encouragements, vous avez toujours été là pour moi, que Dieu vous garde.*

*A mes sœurs **Imane** et **Ikram** qui m'ont toujours soutenu et encouragée.*

*Je n'oublie pas **Zoubida**, ma partenaire qui a été à mes coté pendant des mois pour réaliser ce travail.*

Amina Himeur



Remerciement

Tout d'abord, Nous remercions DIEU, de nous avoir aidé et donné la volonté pour arriver à ce stade et réaliser ce modeste travail.

*Nous vifs remerciements sont adressés à notre encadreur **Dr. Benslama Abderrahim**. De vous, nous avons appris que le succès a une valeur et un sens, et à quel point le dévouement et la sincérité dans le travail peuvent être... et avec vous nous croyons qu'il n'y a pas d'impossible sur la voie de la créativité et du progrès ... nous avons donc été obligés de vous honorer et remercier pour vos conseils et vos orientations.*

*Nous remercions tous les enseignants qui ont contribués à notre formation, grand merci pour **Mr. Harrar Abdenassar**, vous êtes digne de remerciements et d'appréciation nous devons donc vous apprécier, donc nous avons tous les éloges et l'appréciation. **Mme. Bouaziz Samia** nous tenions à vous remercier pour votre engagement à nos côtés, pour votre enseignement et votre soutien au cours des dernières années, et **Dr. Sarri Djamel** qui nous aides pour identifier le nom scientifique de la plante, ainsi que tous les employés et les membres de l'équipe des laboratoires du Département de Biochimie.*

Nous remercions toutes nos collègues du deuxième Mastère.

Nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans ce mémoire.

Amina & Zoubida



Liste des figures

Fig.1 : Les enzymes antioxydants et leurs mécanismes de réaction.....	6
Fig.2 : Structure chimique des polyphénols.....	9
Fig.3 : Structure de base de flavonoïde.....	10
Fig.4 : Aspect botanique d' <i>Ammi visnaga</i>	12
Fig.5 : Protocole d'extraction méthanolique.....	16
Fig.6 : Protocole d'extraction aqueux.....	16
Fig.7 : Courbe d'étalonnage de la Quercitine.....	20
Fig.8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	21
Fig.9 : L'activité antiradicalaire d'extrait aqueux, méthanolique, de BHT, Quercitine et l'acide gallique.....	23
Fig.10 : Le pouvoir réducteur des extraits d' <i>Ammi visnaga</i> exprimé et de Quercitine.....	25

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents types des espèces réactives (ROS et RNS).....	3
Tableau 2 : Analyses quantitatives des extraits d' <i>Ammi Visnaga</i>	19

Liste des abréviations

µg EAG/mg E : Microgramme équivalent acide gallique par milligramme d'extrait.

µg EQ/mg E : Microgramme équivalent de Quercitine par milligramme d'extrait.

BHT : Butylhydroxytoluène.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

E.Aq : Extrait aqueux.

E.Meth : Extrait méthanolique.

EC₅₀ : Concentration efficace 50.

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power.

RNS : Espèce réactive d'azote.

ROS : Espèce réactive d'oxygène.

ملخص

تنتمي نبتة *Ammi visnaga* إلى عائلة *Apiaceae (Umbelliferae)* التي تنتشر في شمال أفريقيا، حيث تستعمل في الطب الشعبي كمضادة للالتهابات، علاج للقصور الكلوي، التشنجات البطنية، الدوار، السكري، وأحجار الكلى وغيرها. يهدف هذا العمل الى تحديد محتوى المستخلص الميثانولي (E. Meth)، والمستخلص المائي (E. Aq) من البوليفينولات والفلافونويدات باستخدام طريقة الفولان-سيوكالتو وثلاثي كلوريد الألومنيوم على التوالي، وتقييم نشاطها المضاد للأكسدة من خلال طريقتين: اختبار كسح الجذر DPPH واختبار ارجاع الحديد FRAP.

أظهرت النتائج ان المستخلص الميثانولي كان أكثر مردودا من المستخلص المائي، حيث أكدت أن المستخلص الميثانولي هو أغنى مستخلص في البوليفينولات والفلافونويدات بقيم تبلغ 243.57 ± 0.59 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك (GAE) /مغ مستخلص و 77.15 ± 0.73 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين (QE)/مغ مستخلص، على التوالي، وكلا المستخلصين أظهرتا نشاطا مضادا للأكسدة مرتفعا، حيث في اختبار DPPH تبلغ قيمة EC_{50} : 8.94 ± 0.62 ميكروغرام/مل و 13.47 ± 0.62 ميكروغرام /مل بالنسبة للمستخلص الميثانولي والمستخلص المائي على التوالي، وفي اختبار ارجاع الحديد 230.45 ± 5.15 ميكروغرام من حمض الأسكوربيك/مغ مستخلص، و 137.41 ± 7.20 ميكروغرام من حمض الأسكوربيك/مغ مستخلص، على التوالي. وفي الختام نقول بأن المستخلصين المائي والميثانولي لنبتة *Ammi visnaga* لهما نشاط هام لمكافحة الأكسدة بسبب وجود مركبات فينولية يمكن استغلالها في صناعة الأغذية والمستحضرات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية : *Ammi visnaga*، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، FRAP، DPPH.

Résumé

La plante *Ammi visnaga* appartient à la famille des *Apiacées (Umbelliferae)* d'origine nord d'Afrique. Elle est largement utilisée dans le traitement traditionnel des maladies inflammatoires, des insuffisances rénales, des crampes abdominales et dans le traitement du vertige, du diabète et des calculs rénaux. Le but de ce travail est de déterminer la teneur des extraits méthanolique (E.Meth), aqueux (E.Aq) en composés phénoliques de partie arienne de cette plante, ainsi que d'évaluer leurs activités antioxydante par deux méthodes : piège de DPPH et réduction de fer FRAP.

Le rendement de l'extraction méthanolique par macération, étaient de 9.2%, ceux de l'extraction aqueuse par décoction étaient de 7.2%. Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des deux extraits ont été déterminées en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium respectivement. Les résultats révèlent que l'E.Meth est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes avec des valeurs de 243.57 ± 0.59 μg EAG/mg E et 77.15 ± 0.73 μg EQ/mg E respectivement. Les deux extraits ont exhibé une forte activité antiradicalaire vis-à-vis du radical libre DPPH avec des EC_{50} de 8.94 ± 0.62 et 13.47 ± 0.62 $\mu\text{g/ml}$ pour l'E.Meth et l'E.Aq respectivement. De plus, les deux extraits ont présenté un bon pouvoir réducteur (230.45 ± 5.15 μg eq d'acide ascorbique/mg E et $137,41 \pm 7,20$ μg eq d'acide ascorbique/mg E) respectivement. En conclusion, les extraits aqueux et méthanolique d'*Ammi visnaga* possèdent une activité antioxydante importante due à la présence des composés phénoliques qui peuvent être exploités dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Mots clés : *Ammi visnaga*, polyphénols totaux, activité antioxydante, DPPH, FRAP.

Abstract

The plant *Ammi visnaga* belongs to the family *Apiaceae* (*Umbelliferae*) of northern African origin. It is widely used in the traditional treatment of inflammatory diseases, renal insufficiency, abdominal cramps, and in the treatment of dizziness, diabetes and kidney stones. The purpose of this work is to determine the content of methanolic (E. Meth), aqueous (E. Aq) extracts of phenolic compounds of arien part of this plant, as well as to evaluate their antioxidant activity by two methods scaping DPPH and reducing FRAP iron.

The yield of methanol extraction by maceration was 9.2%, those of aqueous extraction by decoction were 7.2%. The total polyphenol and flavonoid contents of the two extracts were determined using the Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride method respectively. The results show that the methanolic extract is the richest in polyphenols and flavonoids with values of 243.57 ± 0.59 μg EAG/mg E and 77.15 ± 0.73 μg EQ/mg E respectively. The two extracts exhibited strong anti-radicular activity vis-à-vis the free radical DPPH with EC_{50} values of 8.94 ± 0.62 and 13.47 ± 0.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for E.Meth and E.Aq respectively. In addition, both extracts showed good reducing power (230.45 ± 5.15 μg ascorbic acid/mg E and 137.41 ± 7.20 μg eq ascorbic acid/mg E), respectively. In conclusion, the aqueous and methanolic extracts of *Ammi visnaga* have an important antioxidant activity due to the presence of phenolic compounds that can be exploited in the food and pharmaceutical industry.

Keywords : *Ammi visnaga*, polyphenols, antioxidant capacity, DPPH, FRAP.

Table des matières

Dédicace	
Remerciement	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction	1
Chapitre I : Stress oxydatif	
1. Stress oxydatif	2
1.1. Définition de stress oxydatif.....	2
1.2. Conséquences de stress oxydatif	2
2. L'oxydation	2
3. Radicaux libres	3
3.1. Mécanismes de réaction	3
3.2. Source des radicaux libres	4
3.2.1. Sources endogènes.....	4
3.2.2. Sources exogènes.....	4
3.3. Cibles des radicaux libres et conséquences	4
4. Les antioxydants	5
4.1. Mécanisme d'action.....	5
4.2. Classification des antioxydants	6
Chapitre II : Métabolites secondaires	
1. Métabolites secondaires	8
2. Les polyphénols	8
2.1. Structure des polyphénols.....	8
2.2. Classification	9
2.2.1. Les acides phénoliques	9
2.2.2. Les flavonoïdes.....	10
2.2.3. Les tanins.....	10
3. L'effet antioxydant des polyphénols	11
Chapitre III : <i>Ammi visnaga</i>	
1. Généralité.....	12
2. Description botanique	12
3. Habitat.....	13
4. Systématique botanique	13
5. Usages traditionnels	13
Chapitre IV : Matériels et méthodes	
1. Matériel.....	15
1.1. Matériel végétale	15
1.2. Réactifs	15
1.3. Matériels de laboratoire	15
2. Méthode	15
2.1. Extraction	15
2.1.1. Préparation de l'extrait méthanoïque.....	15

2.1.2. Préparation de l'extrait aqueux.....	16
2.2. Dosage	17
2.2.1. Dosage des flavonoïdes	17
2.2.2. Dosage de polyphénols.....	17
2.2.3. Le rendement	17
2.3. Étude de l'activité antioxydant des extraits.....	17
2.3.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.....	17
2.3.2. Test de la réduction (FRAP).....	18

Chapitre V : Résultats et discussion

2. Dosage de polyphénol et flavonoïde.....	20
3. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH	22
4. Test de la réduction (FRAP)	24

Conclusion

Conclusion.....	27
Références bibliographiques	28

Introduction

Les plantes médicinales sont le don de la nature aux êtres humains pour les aider à mener une vie saine sans maladie. Elles sont utilisées comme médicaments par les humains depuis des milliers d'années. La large variété des constitutions chimiques des espèces végétales correspondues à une diversité d'activités biologiques, telles que les activités antibactérien, cytotoxique, antifongique antitumorigenique et propriétés antioxydants (**Jeeb et al., 2016**).

Par ailleurs, les réactions chimiques d'oxydation et de réduction constituent le fondement de tous les processus biochimiques rendant possibles les processus biologiques et la vie elle-même. Il est important pour la fonctionnalité des cellules et de l'organisme que les molécules réductrices et oxydantes soient à peu près en équilibre. C'est ce qu'on appelle l'équilibre redox. Lorsque cet équilibre est perturbé, généralement par une hausse des processus oxydatifs, on parle de stress oxydatif. Si cet état persiste durant une longue période ou se produit de manière répétée, il peut entraîner des modifications de la matière biologique et des troubles fonctionnels préjudiciables pour la santé (**Mevisen et Schürmann, 2021**).

Notre corps possède naturellement un système de défense qui résiste aux activités des radicaux libres, appelés antioxydants. Ils sont d'origine enzymatique (enzymes spécialisées) ou non (antioxydants apportés par les nutriments). Les antioxydants sont des particules qui protègent les fonctions biologiques et éliminent le stress oxydatif en se combinant avec les radicaux libres et en prévenant leurs effets (**Pelletier et Campbell, 2004**).

Les antioxydants naturels sont largement répandus dans les plantes alimentaires et médicinales. Ces antioxydants naturels, en particulier les polyphénols et les caroténoïdes, ont une variété d'effets biologiques (**Nikhade et al., 2019**).

Le présent travail a effectué au niveau de laboratoire pédologique du l'université Mohamed Boudiaf du M'sila, il porte l'étude d'activité antioxydante des extraits du plante médicinale algérienne *Ammi visnaga*. Le plan expérimental de ce travail est le suivant :

- ✓ Préparation des extraits aqueux et méthanolique à partir de la partie aérienne de la plante.
- ✓ Dosages de polyphénols et flavonoïdes totaux.
- ✓ Etude *in vitro* de l'effet antioxydant des extraits préparés, par le test de DPPH et le test de réduction de fer.

Chapitre I :
Stress oxydatif

1. Stress oxydatif

1.1. Définition de stress oxydatif

Le concept de stress oxydatif en tant que déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants et les réponses oxydatives a été initialement formulé en 1985 par Sies et a ensuite été mis à jour (**Surai *et al.*, 2019**).

Le stress oxydatif est caractérisé par une production excessive d'espèces d'oxygène réactives (ROS) et un état d'oxydation-réduction (redox) altéré. Ces événements moléculaires induisent l'oxydation des protéines et la signalisation cellulaire dérégulée, conduisant à l'inflammation, à la prolifération, à l'apoptose, à la migration et à la fibrose, qui sont des processus importants contribuant à l'altération de la fonction vasculaire, au remodelage cardiovasculaire, dysfonction rénale, activation des cellules immunitaires et hypertension du système nerveux sympathique (**Touyz *et al.*, 2020**).

1.2. Conséquences de stress oxydatif

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaît avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la multiplication mitochondriale de radicaux. Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Bidie, 2011**), cataracte, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré. Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme le p53 (**Mezouar *et al.*, 2014**).

2. L'oxydation

L'oxydation représente un processus indispensable dans le métabolisme des cellules aérobies de l'organisme. Elle met en jeu la molécule d'oxygène dont la production par des voies métaboliques non contrôlées engendre la formation d'ROS tels que les radicaux libres superoxyde $O_2^{\cdot-}$, hydroxyl HO^{\cdot} , alkoxy RO^{\cdot} et peroxy RO_2^{\cdot} (**Sarr *et al.*, 2015**).

3. Radicaux libres

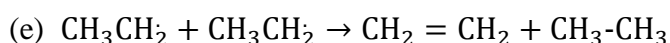
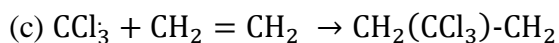
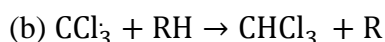
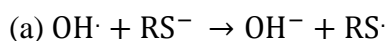
Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé : espèces réactives de l'oxygène (**Tableau 1**) (**Merouane *et al.*, 2014**). Ils dérivent de trois éléments : l'oxygène, l'azote et le soufre, créant ainsi des espèces d'oxygène réactives (ROS), des espèces d'azote réactives (RNS) et des espèces de soufre réactives (RSS).

Tableau 1 : Différents types des espèces réactives (ROS et RNS) (**Fontaine, 2007**).

Espèces radicalaires		Espèces non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	OH^{\bullet}	Peroxyde organique	$ROOH$
Radical peroxyde	ROO^{\bullet}	Acide hypochlorique	$HOCl$
Radical alkoxyde	RO^{\bullet}	Oxygène singulet	O_2
Monoxyde d'azote	NO^{\bullet}	Peroxynitrite	$ONOO^-$

3.1. Mécanismes de réaction

Les radicaux libres ont différents types de mécanismes de réaction, ceux-ci réagissent avec les molécules environnantes par : don d'électrons, réduction des radicaux et acceptation des électrons, oxydation des radicaux (a), abstraction de l'hydrogène (b), réactions d'addition (c), réactions d'auto-élimination (d) et par disproportion (e) (**Carocho et Ferreira, 2013**).



3.2. Source des radicaux libres

3.2.1. Sources endogènes

Le rôle important des mitochondries est de générer de l'énergie cellulaire grâce à un processus appelé phosphorylation oxydative, qui implique le transport de protons (ions hydrogène) à travers la membrane mitochondriale interne à travers la chaîne de transport d'électrons. Ces électrons peuvent réagir avec l'oxygène et former l'un des principaux radicaux libres, l'anion superoxyde (**Al-Dalaen et Al-Qtaitat, 2014 ; Kandola et al., 2015**).

3.2.2. Sources exogènes

L'environnement dans lequel nous vivons ainsi que notre mode de vie sont responsables d'une augmentation de la production de ROS dans notre corps et sont générateurs de stress oxydatif (**Richard, 2013**).

On peut citer :

- L'exposition aux rayons UV, aux ultrasons, aux micro-ondes et à des champs magnétiques.
- L'exposition aux métaux lourds.
- Le contact avec des agents cancérogènes.
- Le tabagisme et l'alcool.
- La prise de médicaments et de la pilule contraceptive.
- La pratique trop intense ou mal gérée d'un sport.
- Le stress intellectuel ou émotionnel.
- La pollution (**Richard, 2013**).

3.3. Cibles des radicaux libres et conséquences

Parmi les molécules cibles, l'attaque de l'ADN va entraîner la modification des bases puriques et pyrimidiques ou des cassures au niveau de la double hélice d'où le rôle mutagène des ROS.

Les protéines sont également largement impactées par les ROS. Les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine), soufrés (méthionine, cystéine) ou aromatiques (phénylalanine, tryptophane, tyrosine) sont particulièrement sensibles aux oxydations. L'oxydation va conduire à la perte d'acides aminés essentiels, notamment par addition de groupements carbonyles. Ces groupements carbonyles peuvent réagir avec des fonctions amines non

oxydées de la lysine pour former des liaisons imines (-HCN-), qui peuvent conduire à l'agrégation des protéines.

Les lipides et principalement les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des cibles privilégiées des ROS en raison de leur richesse en hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est riche en doubles liaisons, plus il est peroxydable, c'est -à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique néfaste pour la cellule (**Durand *et al.*, 2013**).

4. Les antioxydants

Les antioxydants constituent une famille de substance susceptibles de neutraliser les radicaux libres et prévenir ainsi la survenue des maladies associées au stress oxydant (**Sarr *et al.*, 2015**).

Les antioxydants sont définis comme toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, retarde ou inhibe considérablement l'oxydation de ce substrat, mais par la suite sont définies comme toute substance qui retarde prévient ou élimine les dommages oxydatifs à une molécule cible. Une autre propriété qu'un composé devrait avoir été considéré comme un antioxydant est la capacité, après le balayage du radical, de former un nouveau radical qui est stable par liaison intramoléculaire d'hydrogène sur l'oxydation ultérieure (**Carocho et Ferreira, 2013**).

4.1. Mécanisme d'action

Un antioxydant est une substance capable de prévenir ou de ralentir l'oxydation d'autres molécules. Les antioxydants agissent de plusieurs manières. Leur mécanisme d'action peut être direct ou indirect, en tant que partie de la structure d'enzymes et/ou cofacteurs d'enzymes antioxydants (**Mezouar *et al.*, 2014**). Les mécanismes les plus fréquents sont :

- Inhibiteur des réactions d'oxydation des radicaux libres (oxydants préventifs) en inhibant la formation de radicaux lipidiques libres; en interrompant la propagation de la réaction en chaîne d'auto oxydation (anti-oxydants de rupture de chaîne).
- Trempeur d'oxygène simple.
- Agent réducteur qui convertit les hydroperoxydes en composés stables.
- Chélateur des métaux qui convertit les métaux pro-oxydants (dérivés du fer et du cuivre) en produits stables.
- Inhibiteur des enzymes pro-oxydatives (lipooxygénases) (**Carocho et Ferreira, 2013**).

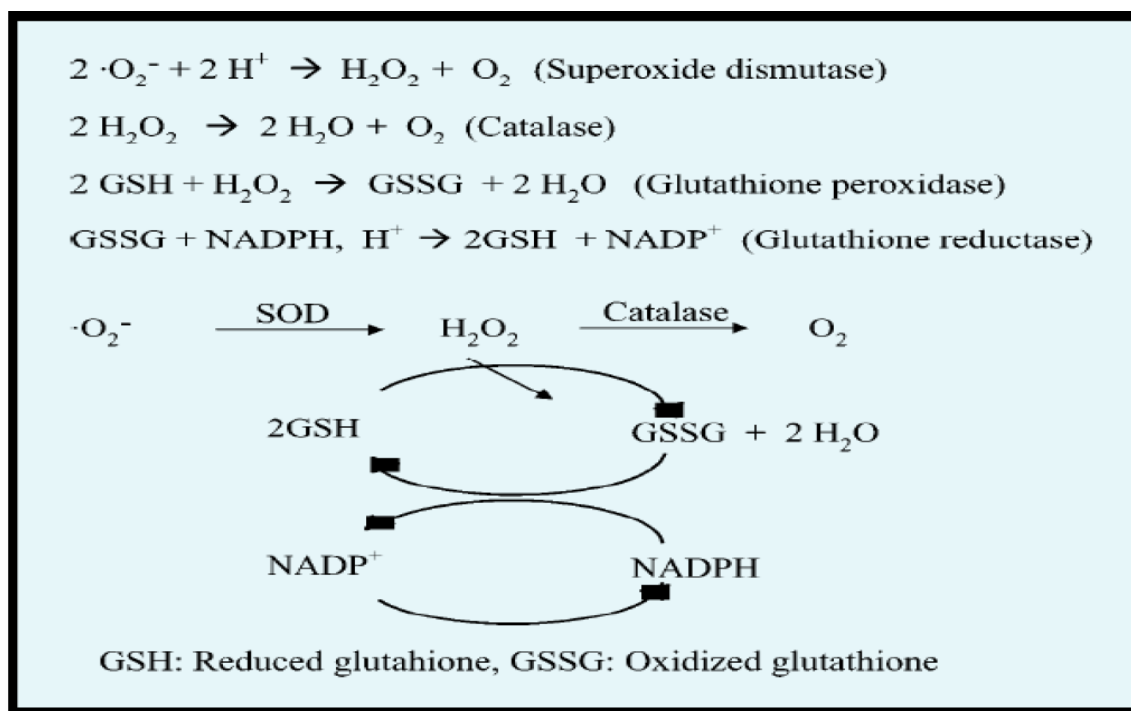


Fig.1 : Les enzymes antioxydants et leurs mécanismes de réaction (Lee *et al.*, 2004)

4.2. Classification des antioxydants

En fonction de leur nature les antioxydants peuvent être classés en :

- **Antioxydants primaires ou naturels**

Les antioxydants qui sont impliqués dans le processus de rupture de chaîne et qui, lorsqu'ils réagissent avec les radicaux lipidiques, les transforment en composants plus stables. Les antioxydants de ce groupe sont principalement phénoliques en configuration. L'absence de ces antioxydants pourrait influencer sur le métabolisme des macromolécules, y compris les glucides, qui sont les cofacteurs des enzymes antioxydantes (Ayoub *et al.*, 2017).

- **Antioxydants secondaires ou synthétiques**

Afin d'avoir un système standard de mesure de l'activité antioxydante pour comparer avec les antioxydants naturels et pour être incorporé-évalué dans les aliments, des antioxydants synthétiques ont été développés (Carocho et Ferreira, 2013). Ces antioxydants sont des composés phénoliques qui jouent un rôle dans la capture des radicaux libres et qui ont stoppé les réactions en chaîne. Les exemples de ce groupe comprennent l'anisole hydroxyle butyle (BHA), l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'hydroquinone butylé tertiaire (TBHQ), le gallate de propyle (PG) et l'agent chélateur de métal (EDTA) et l'acide guarétique nordihydro (NDGA) (Ayoub *et al.*, 2017).

En fonction de leur activité, ils peuvent être classés comme :

- **Des antioxydants enzymatiques**

Sont endogènes, comme les enzymes, les molécules de faible poids moléculaire et les cofacteurs enzymatiques (**Bunaciu et al., 2016**). Agissent en décomposant et en éliminant les radicaux libres. Les enzymes antioxydantes transforment les produits oxydants dangereux en hydrogèneperoxyde (H_2O_2) puis en eau, dans un processus en plusieurs étapes en présence de cofacteurs tels que le cuivre, le zinc, le manganèse, l'andiron, Des exemples d'antioxydants enzymatiques sont le catalase (CAT), le glutathione peroxidase (GSHPx), le superoxyde dismutase (SOD) et la peroxydoxyxine (**Nimse et Pal, 2015**).

- **Des antioxydants non enzymatiques**

Proviennent de sources alimentaires (**Bunaciu et al., 2016**). Agissent en interrompant les réactions en chaîne des radicaux libres. Quelques exemples d'antioxydants non enzymatiques sont la vitamine C, la vitamine E, le polyphénol végétal, les caroténoïdes et le glutathion (**Nimse et Pal, 2015**).

Chapitre II :

Métabolites

secondaires

1. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont de petites molécules de structure complexe et originale et généralement très stables (**Le pogam et al., 2015**). Elles sont dispensables au métabolisme et à la croissance des plantes, alors que la grande variété et la grande diversité des produits secondaires sont des composants clés pour que les plantes interagissent avec l'environnement dans l'adaptation aux conditions de stress biotiques et abiotiques. En raison de leurs activités biologiques remarquables, les métabolites secondaires ont été utilisés comme source importante de médecine traditionnelle active, de parfum et de matières premières industrielles, utilisés comme des composés précieux comme les produits pharmaceutiques, les cosmétiques, les produits chimiques fins. De toute évidence, les métabolites secondaires ont fait une énorme promotion de l'importance et de la valeur commerciales des plantes (**Yang et al., 2018**).

2. Les polyphénols

Les polyphénols sont un groupe de composés phytochimiques d'origine naturelle, qui sont présents en grande quantité dans les fruits, les légumes et les produits naturels. C'est une classe constituée d'environ 8000 composés (**Vauzour, 2014**). Les polyphénols sont connus sous le nom de polyhydroxyphénols. Ils ne sont pas seulement classe de produits chimiques organiques principalement naturels, mais aussi synthétiques ou semi-synthétiques qui sont caractérisées par la présence de grands multiples de phénol structurel (**Abdel-Shafy et Mansour, 2017**). Les polyphénols sont antioxydants, anti-inflammatoires et antinéoplasiques propriétés (**Saric et Sivamani, 2016**).

2.1. Structure des polyphénols

Les polyphénols contiennent au moins un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles en plus des substituants à dents, et ils peuvent être divisés en 15 classes majeures selon leurs structures chimiques (**Xiao et al., 2013**).

La classe polyphénol a été décrite par White–Bate-Smith–Swain–Haslam (WBSSH) comme suit :

- La classe des polyphénols est généralement composée de composés modérément solubles dans l'eau.
- Leur masse moléculaire de 500 à 4000 Da.
- Avec plus de 12 groupes hydroxyles phénoliques.

- Les classes de polyphénols varient de 5 à 7 cycles aromatiques par 1000 Da.

La plupart des polyphénols contiennent des groupements phénoliques répétés de pyrocatechol, de résorcinol, de pyrogallol et de phloroglucinol reliés par des esters (tanins hydrolysables) ou des liaisons C-C plus stables (tanins condensés non hydrolysables). La structure chimique des polyphénols a toujours un substituant hétéroatome autre que les groupes hydroxyles. Les liaisons ester et éther sont courantes, ainsi que divers dérivés d'acide carboxylique (**Abdel-Shafy et Mansour, 2017**).

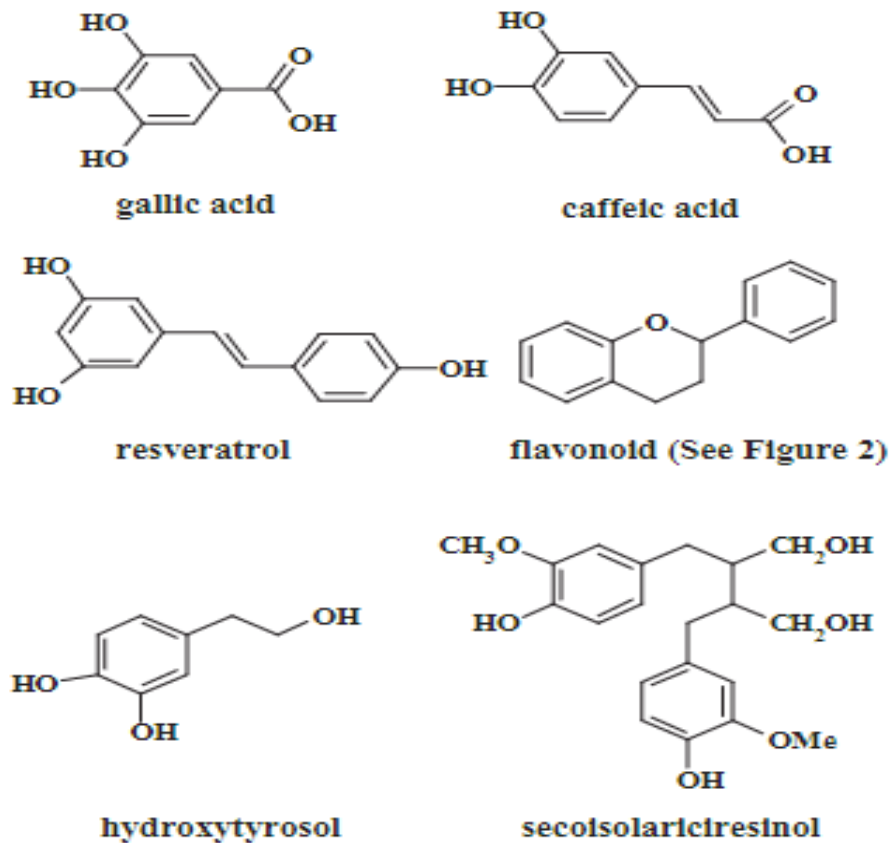


Fig.2 : Structure chimique des polyphénols (**Xiao et al., 2013**).

2.2. Classification

Les phénols les plus courants dans l'alimentation humaine sont les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (**Lima et al., 2014**).

2.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés constitués de groupes benzène, carboxyle et hydroxyle (**Kurek-Górecka et al., 2014**). Les acides phénoliques se composent de deux sous-

groupes : les acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique. Les acides hydroxybenzoïques comprennent l'acide gallique, p-hydroxybenzoïque, protocatéchuic, vanillique et syringique, qui ont en commun la structure C6-C1. Les acides hydroxycinnamiques, par contre, sont des composés aromatiques à chaîne de trois carbones (C6-C3), les acides caféique, férulique, p-coumarique et sinapique étant les plus courants (Ozcan *et al.*, 2014).

2.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe diversifié de métabolites secondaires composés de >10000 structures présentes dans diverses ressources naturelles (Baskar *et al.*, 2018). Ils sont synthétisés par la voie polypropanoïde et le composant de démarrage est la molécule de phénylalanine. Les effets biologiques de ces composés varient. Tous les flavonoïdes partagent le squelette structural de base en C6-C3-C6 composé de deux cycles aromatiques en C6 et d'un hétérocycle qui contient un atome d'oxygène (Ghasemzadeh et Ghasemzadeh, 2011). Les principales sous-classes de ces molécules aromatiques sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (Del Rio *et al.*, 2013).

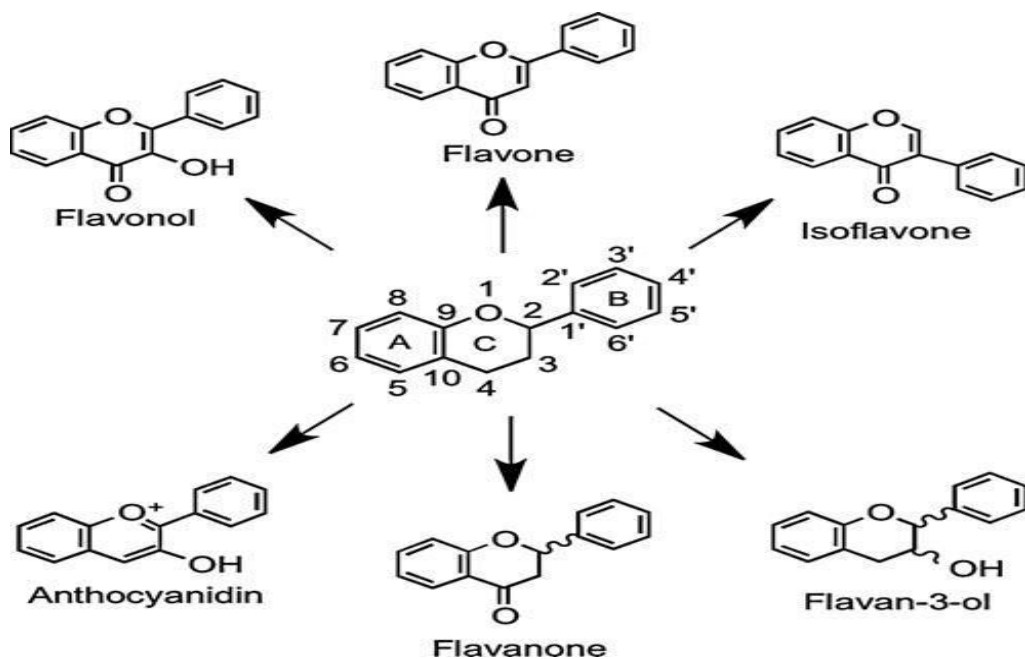


Fig.3 : Structure de base de flavonoïde (Del Rio *et al.*, 2013).

2.2.3. Les tanins

Les tanins, les composés de poids moléculaire relativement élevé que l'on trouve dans des complexes avec des alcaloïdes, des polysaccharides et des protéines, sont un groupe de polyphénols hydrosolubles. Ils peuvent être subdivisés en sous-classes hydrolysables et

condensées. Les tanins hydrolysables sont des esters d'acide gallique, tandis que les tanins condensés (aussi appelés proanthocyanidines) sont des polymères de monomères de polyhydroxyflavan-3-ol. Une troisième sous-division, les phlorotannines entièrement composées de phloroglucinol, a été isolée de plusieurs genres d'algues brunes (**Ozcan et al., 2014**).

3. L'effet antioxydant des polyphénols

La plupart de ces substances sont classées comme antioxydants naturels, ce qui révèle leur importance sous oxydativité. Les composés phénoliques, comme d'autres antioxydants, sont généralement utilisés pour réduire les effets nocifs des substances à fort potentiel oxydatif. Les propriétés antioxydantes des polyphénols sont principalement dues à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et trempers d'oxygène simples. Le potentiel antioxydant des polyphénols est principalement lié à la capacité de ces composés à récupérer les radicaux libres produits par le stress oxydatif (**Lima et al., 2014**). Ils ont de puissantes activités antioxydantes *in vitro*, capables de récupérer une large gamme d'ROS et d'RNS et d'espèces de chlore, telles que les radicaux superoxyde, hydroxyle et peroxyde, ainsi que l'acide peroxyrique et l'acide hypochloreux (**Maqsood et al., 2014**).

Le mécanisme de l'activité antioxydante des polyphénols se compose de :

- ✓ Inhibant l'activité des enzymes et inhibant ainsi l'apparition de ROS.
- ✓ Chélation des ions de métaux impliqués dans le processus de création de radicaux libres.
- ✓ La récupération des ROS, interrompant ainsi la cascade de réactions conduisant à la peroxydation des lipides.
- ✓ Action synergique avec d'autres antioxydants (**Kurek-Górecka et al., 2014**).

Chapitre III :

Ammi visnaga

1. Généralité

La plante *Ammi visnaga* (L) Lam. Connue comme Noukha (en Algérie) ou Khella (dans certaines parties de l'Afrique du Nord) (**Imane et al., 2016**), qui contient d'autres synonymes tels que *Daucus visnaga* L., *Visnaga aucooides* et appartient à la famille des *Apiacées (Umbelliferae)*, qui compte environ 3600 espèces dans le monde (**Chraka et al., 2020**). *Ammi visnaga* L. a été une source d'intérêt pour les chercheurs pendant des décennies, où il s'est avéré être une source vitale de constituants chimiques importants pour la santé et la médecine. La valeur médicinale de la plante est principalement due à sa teneur en γ -pyrone (dérivés de la furanochromone), dont principalement la khelline et la visnagine (**Hashim et al., 2014**). En Algérie *Ammi visnaga* (L) est largement utilisé dans le traitement traditionnel des maladies digestives et culinaires mais pas très bien étudié scientifiquement (**Imane et al., 2016**). Cette plante a une légère odeur aromatique et un goût très amer (**Beltagy et Beltagy, 2015**). Elle pousse de préférence sous haute exposition au soleil dans des sols argileux, bien drainés et rapidement desséchés à la surface, dans les zones bioclimatiques supérieures et subhumides semi-arides (**Travaini et al., 2016**).



Fig.4 : Aspect botanique d'*Ammi visnaga* (**Alaatabi et al., 2020**)

2. Description botanique

Ammi visnaga est une plante annuelle ou bisannuelle qui pousse à partir d'une racine pivotante dressée jusqu'à une hauteur maximale d'environ 1,0 m. La racine est engraissée et ressemble à la racine de la carotte. Les feuilles mesurent jusqu'à 20 cm de long et sont généralement de forme ovale à triangulaire, mais elles sont disséquées en de nombreux petits segments linéaires à en forme de lance. Les tiges sont dressées et fortement ramifiées (**Hashim et al., 2014**). L'inflorescence est une ombelle de fleurs blanches et très enflée à la

base, plus tard elle devient ligneuse et utilisée comme cure-dents (**Alaatabi et al., 2020**). Les fleurs sont pentamères, tétracycliques avec symétrie radiale, portant cinq étamines et un ovaire inférieur composé de deux carpelles unis. Le fruit est une structure ovale comprimée composée de deux mericarpes et d'environ 3 mm de longueur (**Hashim et al., 2014**).

3. Habitat

Noukha est originaire de la région méditerranéenne et est cultivé en Égypte, au Maroc et en Tunisie. Il y a maintenant aussi de grandes plantations en Europe, en Argentine, au Chili, au Mexique, dans les États du sud des États-Unis et dans l'ancienne Union soviétique. En Inde, les plantes sont cultivées au Cachemire, au Jammu, au Pendjab, à Dehradun et maintenant dans le climat chaud de l'Inde du Nord également (**Alam et al., 2018**).

4. Systématique botanique

Selon **Alam et al. (2018)** *Ammi visnaga* appartient au :

- **Règne** : *Plantae*- Plantes.
- **Sous-règne** : *Tracheobionta* – Plantes vasculaires.
- **Sous-division** : *Spermatophyta* – Plantes à graines.
- **Division** : *Magnoliophyta* – Plantes fleuries.
- **Classe** : *Mangoliopsida* – Dicotylédones.
- **Sous-classe** : *Rosidae*.
- **Ordre** : *Apiales*.
- **Famille** : *Apiaceae / Umbelliferae* – Famille de carottes.
- **Genre** : *Ammi L. - ammi*.
- **Espèce** : *Ammi visnaga (L) Lam.* – plante cure-dent.

5. Usages traditionnels

La plante a été traditionnellement utilisée sous forme de poudre pour le traitement des coliques rénales, des symptômes anginaux légers, et des crampes abdominales. Il est également employé comme un traitement de soutien pour l'obstruction légère des voies respiratoires dans l'asthme ou la bronchite spastique, et le traitement postopératoire des conditions associées à la présence de calculs urinaires. La plante et ses extraits sont également populaires dans le traitement du vitiligo et du psoriasis, et sont utilisés comme agent lithotriptique. Il est généralement utilisé pour dilater les bronches, les urinoirs et les

vaisseaux sanguins sans affecter la pression artérielle. Il est également utilisé en interne comme emménagogue pour réguler les règles, comme diurétique, et dans le traitement du vertige, du diabète et des calculs rénaux. Une infusion des parties aériennes a également été utilisée pour traiter les maux de tête (**Khalil et al., 2020**).

Chapitre IV :

Matériels et

méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétale

La plante a été achetée chez un herboriste. Elle a été identifiée par Docteur Sarri Djamel professeur au Département des sciences agronomiques, Faculté des sciences, Université de Mohamed Boudiaf, M'sila.

1.2. Réactifs

Méthanol pur (CH₃OH), L'eau distillée, Quercitine, Chlorure à 2% (AlCl₃), Carbonate de sodium (NaCO₃), Folin-Ciocalteu, L'acide gallique, Acide trichloracétique (TCA), Ferricyanure de potassium(K₃FeCN₆), Chlorure de fer (FeCl₃), Tampon phosphate (pH=6.6), 2, 2 diphényl-1-picryle hydrazyl DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆), butylhydroxytoluene (BHT), L'acide ascorbique.

1.3. Matériels de laboratoire

Bécher, Eprouvette, Erlenmeyer, Mortier, Balance, Plaque chauffante, Rotavapeur, Etuve, Boîtes pétries en verre, Cristalliseur, Entonnoir, Papier filtre, Papier aluminium, Eppendorf, Tube à essai, Balance précise, Spectrophotomètre, Micropipette, Bain marie, Vortex, Centrifugeuse.

2. Méthode

2.1. Extraction

2.1.1. Préparation de l'extrait méthanoïque

L'E.Meth de la plante a été obtenu par macération. Broyer 50 g de plante et tremper dans 600 ml de méthanol à 80%, après recouvert l'erenmeyer avec le papier aluminium, laisser pendant 24h, ensuite filtrer la solution sur un papier filtre Wattman. Le filtrat est évaporé à l'aide d'un Rotavapeur qui permet a éliminé le solvant sous vide, le produit est récupère sur le ballon d'évaporation, puis met dans des boîtes pétries. Le filtrat est séché par étuve à 40°C pendant 24h pour obtenir une poudre, et été stockés à température ambiante jusqu'à utilisation (**Benslama et al., 2017**).

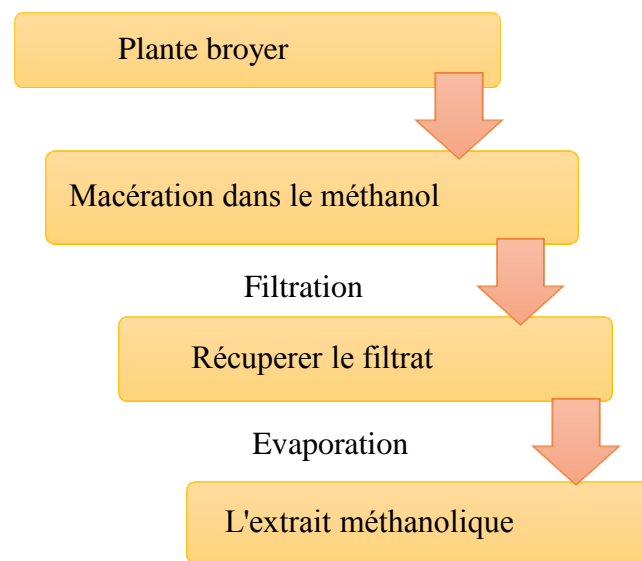


Fig.5 : Protocole d'extraction méthanolique (Benslama *et al.*, 2016)

2.1.2. Préparation de l'extrait aqueux

L'E.Aq de la plante a été obtenu par décoction de 50 g de broyat de la partie aérienne de la plante dans 500 ml d'eau distillée. Laisser la solution obtenir sur la plaque chauffante à 15 minutes, puis refroidissement dépendant 10 min, et flétrie cette solution par papier Wattman. A la fin séchage le filtrat par étuve à 40°C pendant 24h, l'extrait a été stockés à température ambiante jusqu'à utilisation (Benslama *et al.*, 2017).

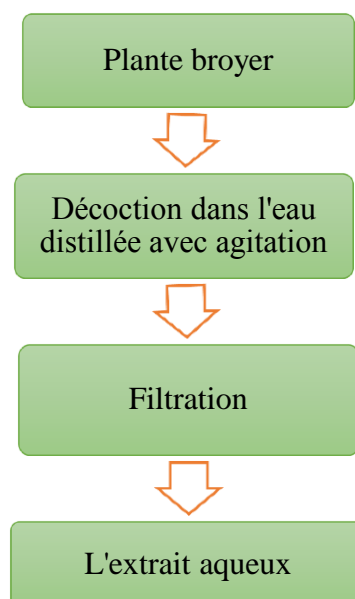


Fig.6 : Protocole d'extraction aqueux (Benslama *et al.*, 2016)

2.2. Dosage

2.2.1. Dosage des flavonoïdes

La teneur de flavonoïdes totaux contenus dans notre extrait a été réalisée par méthode (Benslama et Harrar, 2016).

0.5 ml d'extrait (1 mg/ml) ou quercitrine a été mélangée avec 0.5 ml AlCl₃ (2%). Après incubation à température ambiante pendant 10 min, l'absorbance est lue à 430 nm. Utiliser quercitrine à déférente concentration (2-40 µg/ml) comme standard dans les mêmes conditions que l'extrait.

2.2.2. Dosage de polyphénols

Le dosage de polyphénols totaux dans notre extrait a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu suivant le protocole décrit par (Li *et al.*, 2007).

Mélanger 0.1 ml d'extrait (500 µg/ml) avec 0.5 ml Folin-Ciocalteu (dilue 10 fois dans l'eau distille). Après 4 min 0.4 ml d'une solution de carbonate de Na₂CO₃ (7.5%) a été ajouter au milieu réactionnel. Après 2h du l'incubation à la température ambiante l'absorbance doit mesurer dans 760 nm. La même procédure a été répéter avec le standard acide gallique a déférente concentration (20-200 µg/ml).

2.2.3. Le rendement

Le pourcentage de rendement pour chaque extrait a été calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{R (\%) = M / M_0 \times 100}$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

M₀ : Masse en gramme de matériel végétale à traiter.

2.3. Étude de l'activité antioxydant des extraits

L'évaluation de la capacité antioxydant a été réalisée par deux méthodes :

2.3.1. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à piéger le radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) a été réalisée par méthode (Benslama et Harrar, 2016).

Dissolvant 4 mg du DPPH dans 100 ml du méthanol et incubé pendant 3h, puis préparé une solution mère de chaque extrait (2 mg /ml). Ensuite un volume de 25 µl de différentes concentrations de chaque extrait (0.0625-2 mg/ml) est ajouté à 625 µl de la solution du DPPH. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre après 30 min à la longueur d'onde de 517 nm. L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ activité anti radicalaire} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}) \times 100$$

2.3.2. Test de la réduction (FRAP)

La capacité des extraits à réduire les ions ferriques (Fe^{+3}) était évaluée par la méthode de **(Benslama et Harrar, 2016)**.

0,3 ml d'extrait pour chaque concentration (0.125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml) ont été mélangés avec 0,3 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH = 6,6) et 0,3 ml d'un Ferricyanure de potassium à 1% [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], l'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement des tubes à température ambiante, on ajoute 0,3 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 10%, les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. On prélève 0,4 ml du surnageant auxquels on ajoute 0,4 ml d'eau distillée et on ajoute au mélange 0,08 ml d'une solution de chlorure de fer (FeCl_3) à 0,1%. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience dans les mêmes conditions.

Chapitre V:

Résultats et

discussion

1. L'extraction

L'extraction de la plante médicinale *Ammi visnaga* permet de récupérer des extraits sous forme poudre pour les deux méthodes méthanolique et aqueux.

Après extraction et récupération des extraits, leur rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matière végétale sèche selon la formule suivante :

$$R (\%) = M / M_0 \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M : Masse en gramme de l'extrait sec récupéré.

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal initial.

Les résultats sont représentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Analyses quantitatives des extraits d'*Ammi Visnaga*.

	Rendement (%)	Polyphénol (µg EAG/mg E)	Flavonoïde (µg EQ/mg E)
E. Meth	9.2%	243.57±0.59	77.15±0.73
E. Aq	7.2%	198±0.57	41.74±0.25

Les résultats obtenus (**Tableau 2**) montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'E.Meth d'*Ammi visnaga* (9.2%) suivi par l'E.Aq (7.2%). La différence de rendement entre les extraits est due aux techniques d'extraction utilisées, qui sont totalement différentes et à la composition chimique qui diffère d'un extrait à l'autre.

Selon **Khoddami et al. (2013)** l'utilisation de plantes sous forme de poudre rend l'extraction plus efficace, car l'échantillon devient plus homogène, la surface de contact avec le solvant devient plus grande, la pénétration à l'intérieur des cellules est plus facile. En effet, **Khoddami et al. (2013)** ont montré que le méthanol et l'eau sont les solvants les plus utilisés pour une meilleure récupération de composés phénoliques.

Le rendement d'extraction dépend fortement de la polarité du solvant (**Mohammedi et Atik, 2011**). La préparation de l'extrait de la partie aérienne d'*Ammi visnaga* a été effectuée par l'eau qu'il est un solvant polaire le rendement d'extraction s'augmente par la chaleur cela est

expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2010).

Ces rendements (Tableau 2) donnent des détails et expliquent les composés phénoliques totaux plus élevés lorsque nous avons choisi le solvant organique (méthanol) dont la polarité est modifiée avec l'eau. Ces mélanges deviennent idéaux et sélectifs pour extraire un grand nombre de composés bioactifs dont des composés phénoliques, vue la capacité du méthanol d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires et de faciliter l'extraction d'un grand nombre de composés polaires ainsi que des composés de moyenne et de faible polarité. Alors que l'eau donne plus de rendement, mais n'est bon qu'à extraire les polyphénols (les composés polaires) (Mohammedi et Atik, 2011 ; Seidel, 2006).

2. Dosage de polyphénol et flavonoïde

Le dosage de polyphénols et de flavonoïdes totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), respectivement. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 2. Les courbes étalons de l'acide gallique et Quercitine sont représentées dans les Fig.7 et Fig.8.

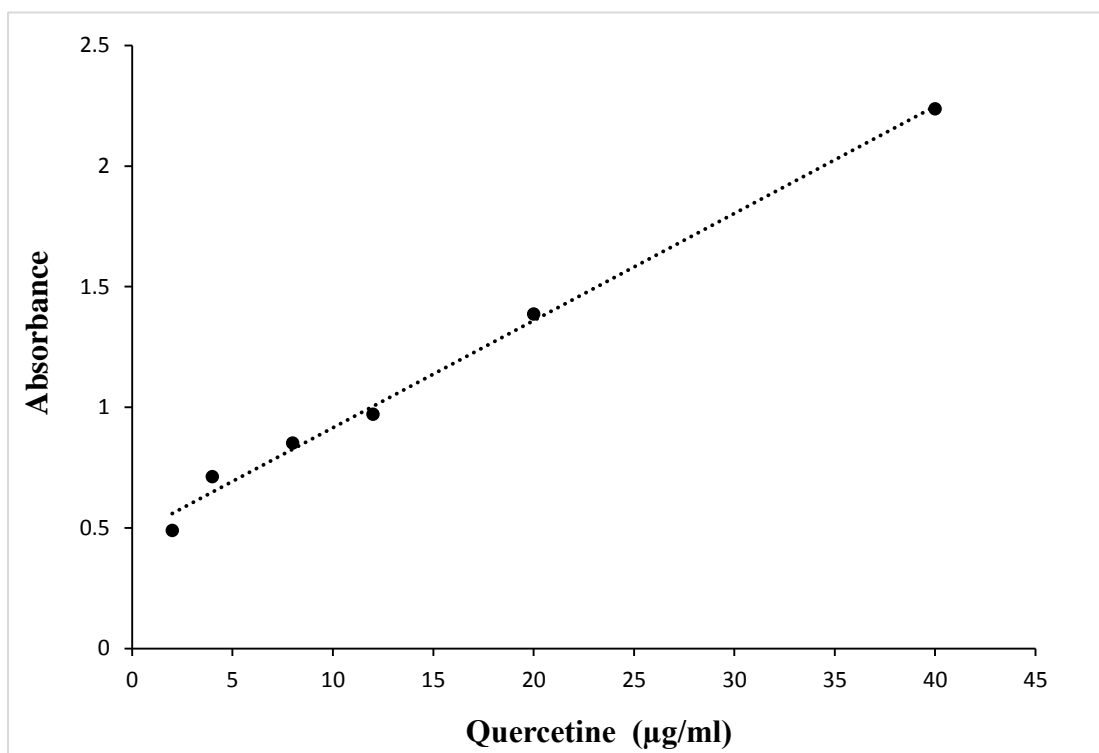


Fig.7 : Courbe d'étalonnage de la Quercitine.

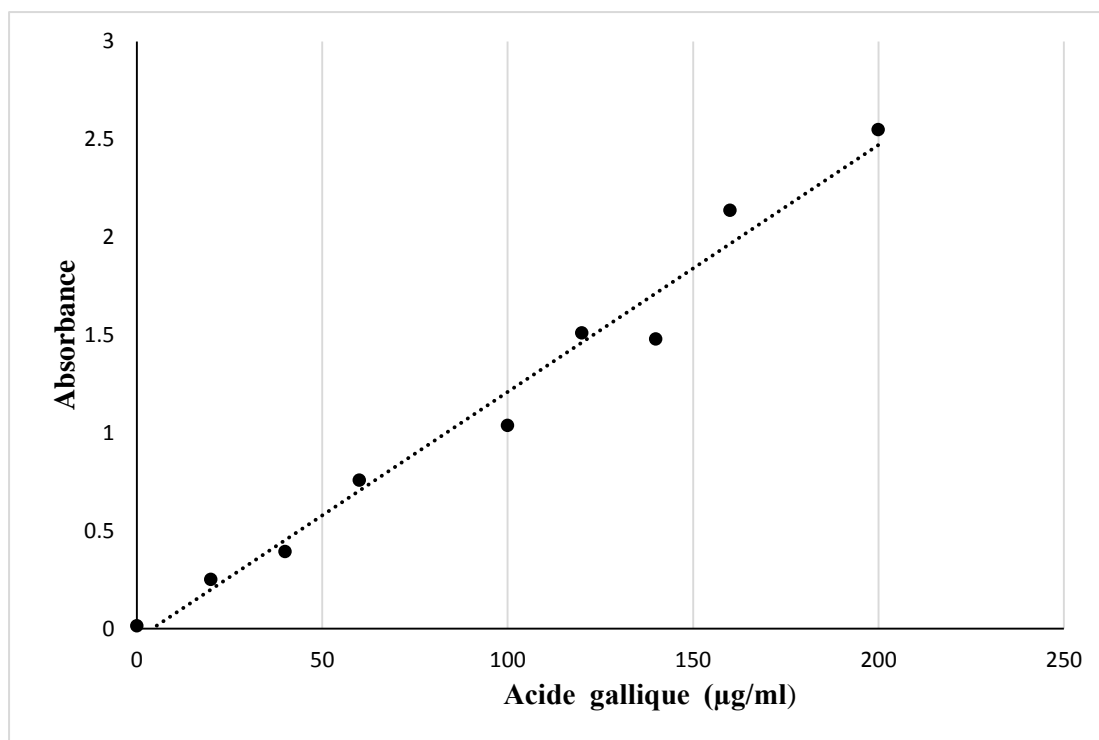


Fig.8 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Selon les résultats du dosage de flavonoïdes et polyphénols totaux on remarque que l'E.Meth renferme un taux élevé (polyphénols $243.57 \pm 0.59 \mu\text{g EAG/mg E}$), (flavonoïdes $77.15 \pm 0.73 \mu\text{g EQ/mg E}$) par rapport l'E.Aq (polyphénols $198 \pm 0.57 \mu\text{g EAG/mg E}$), (flavonoïdes $41.747 \pm 0.258 \mu\text{g EQ/mg E}$).

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante, qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physico-chimiques influençant l'extraction des polyphénols. Entre autres, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé (Mahmoudi *et al.*, 2013).

L'utilisation d'un solvant hydro- alcoolique a permis d'extraire à partir d'une partie arienne d'*Ammi Visnaga*, des composés polaires tels que les polyphénols qui font partie des principaux composants des plantes à activité antioxydante (Dieng *et al.*, 2017).

La quantité des composés phénoliques et des flavonoïdes des extraits de plantes varie d'une plante à l'autre, cela est probablement dû à la localisation géographique, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la maturité de la plante et la durée de conservation (Gheffour *et al.*, 2015).

La teneur des phénoliques et des flavonoïdes varie selon certains paramètres pendant la croissance de la plante telles que: la salinité, sécheresse et exposition solaire qui agissent sur la biosynthèse des métabolites secondaires (**Ghedadba et al., 2014**).

La teneur élevée en polyphénols dans l'E.Meth est liée à la solubilité élevée des phénols dans le méthanol. De ce fait, le méthanol reste le meilleur solvant pour extraire ces composés, cela est dû à la capacité du méthanol à inhiber l'action du polyphénol oxydase qui provoque l'oxydation des polyphénols dans les tissus végétaux (**Yao et al., 2004**).

La concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits (**Ghedadba et al., 2014**).

3. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

Le principe de ce test se résume en la capacité de l'extrait à réduire le radical libre DPPH de couleur violet foncé, qui se transforme en coloration jaunâtre (après réduction). Cette décoloration est mesurable par spectrophotométrie. La décoloration a été comparée à l'ordre de concentration de l'extrait d'échantillon pour calculer les valeurs de l'EC₅₀, qui est la quantité d'échantillon nécessaire pour diminuer l'absorbance de la DPPH de 50%. Plus sa valeur est petite, plus l'activité est grande (**Yaici et al., 2019**). A des fins comparatives, le BHT qui est un antioxydant standard, a une activité antiradicalaire importante avec une valeur d'EC₅₀ de 87.26 µg/ml.

Dans le but de chercher l'effet antioxydant d'*Ammi visnaga* nous avons testé son effet sur la réduction du radical DPPH. Les résultats sont présentés par la **Fig.9**.

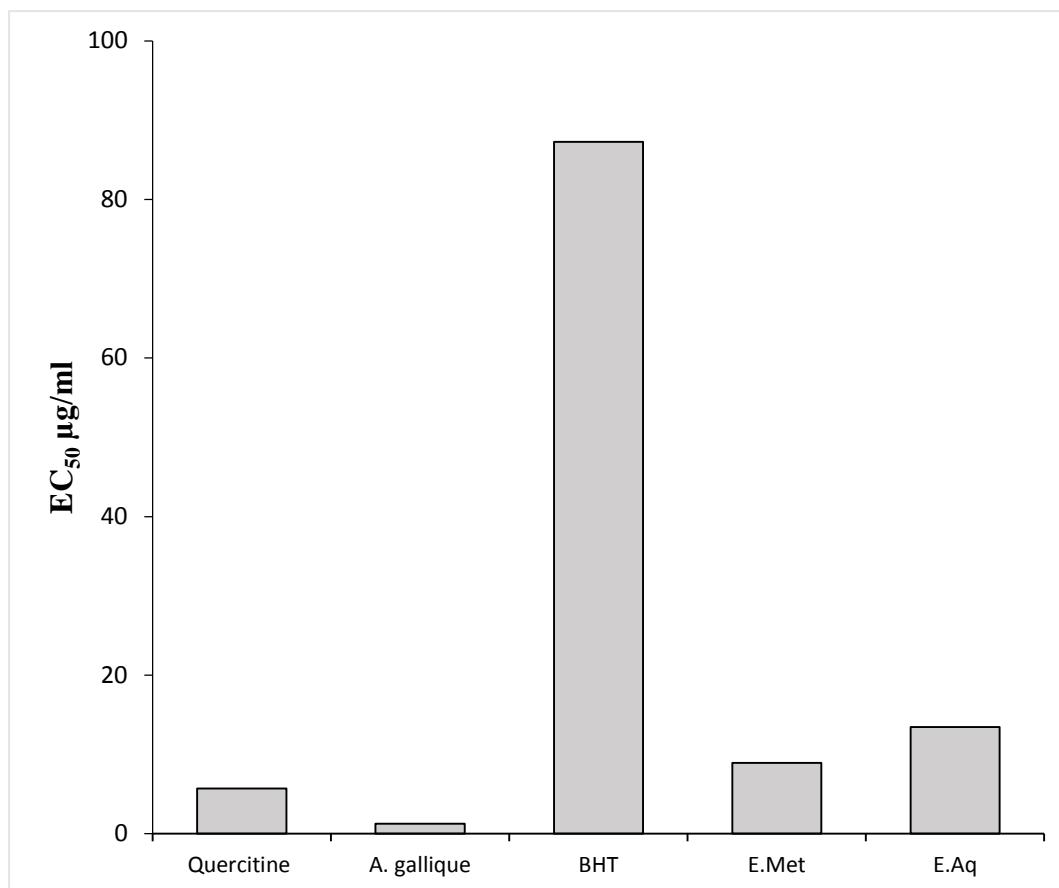


Fig.9 : L'activité antiradicalaire d'extrait aqueux, méthanolique, de BHT, Quercétine et l'acide gallique.

Les résultats indiquent clairement que les extraits aqueux et méthanolique possèdent un effet piègeur remarquable vis-à-vis du radical DPPH•. Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les deux extraits étudiés ont une activité antiradicalaire significative et concentration dépendante (**Fig.9**). En effet, les extraits méthanolique et aqueux montrent un effet piègeur respectivement. Ainsi, l'E.Meth présente une EC₅₀ de 8.94 µg/ml qui correspond à une capacité de piégeage plus efficace par rapport à celle de l'E.Aq (EC₅₀ = 13.47 µg/ml) suivie par le BHT (EC₅₀ = 87.26 µg/ml). Cette activité est supérieure à celle de contrôle positif, le BHT, donc une activité antioxydante plus importante.

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. De nombreuses méthodes sont utilisées actuellement pour évaluer cette activité. Le radical DPPH a été largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés

phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Bentabet et al., 2014**).

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant. Ce dernier réagit avec le radical DPPH en réduisant un nombre égal aux groupements hydroxyles portés par la molécule de l'antioxydant (**Dallali et al., 2018**).

Ces résultats montrent que les extraits riches en molécules antioxydantes (principalement les polyphénols), qui ont la capacité de libérer de l'hydrogène, de sorte qu'elles peuvent réduire et décolorer le DPPH.

Nous notons qu'il y a une corrélation entre la concentration des polyphénols et l'activité antioxydante, ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. En effet, l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait. Généralement, les polyphénols ayant un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent une activité antioxydante très importante (**Fadili et al., 2015**).

Les polyphénols sont des antioxydants font don de H^+ aux radicaux libres formant une oxydation devenant eux-mêmes un radical. Ces radicaux sont stabilisés par la délocalisation par résonance de l'électron dans le cycle aromatique et la formation de structures de quinone (**Maqsood et al., 2014**).

Les flavonoïdes sont une classe de phénols végétaux secondaires ayant des propriétés antioxydantes et chélateurs importantes. L'activité antioxydante des flavonoïdes dépend de la structure et du modèle de substitution des groupes hydroxyles. L'E.Meth d'Ammi *visnaga* a une concentration élevée de polyphénols et de flavonoïdes (**Tableau 2**), ce qui est en corrélation avec l'activité antioxydante intense de cet extrait (**Stankovic et al., 2010**).

4. Test de la réduction (FRAP)

D'après **yadav et al. (2012)** la présence de réducteurs dans les extraits, réduit le Fe^{+3} /complexe ferricyanide à la forme ferreuse Fe^{2+} . Par conséquent, le Fe^{+2} peut être évalué en suivant l'augmentation de l'intensité de la couleur qui est fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié. Les résultats sont représentés dans **Fig.10**.

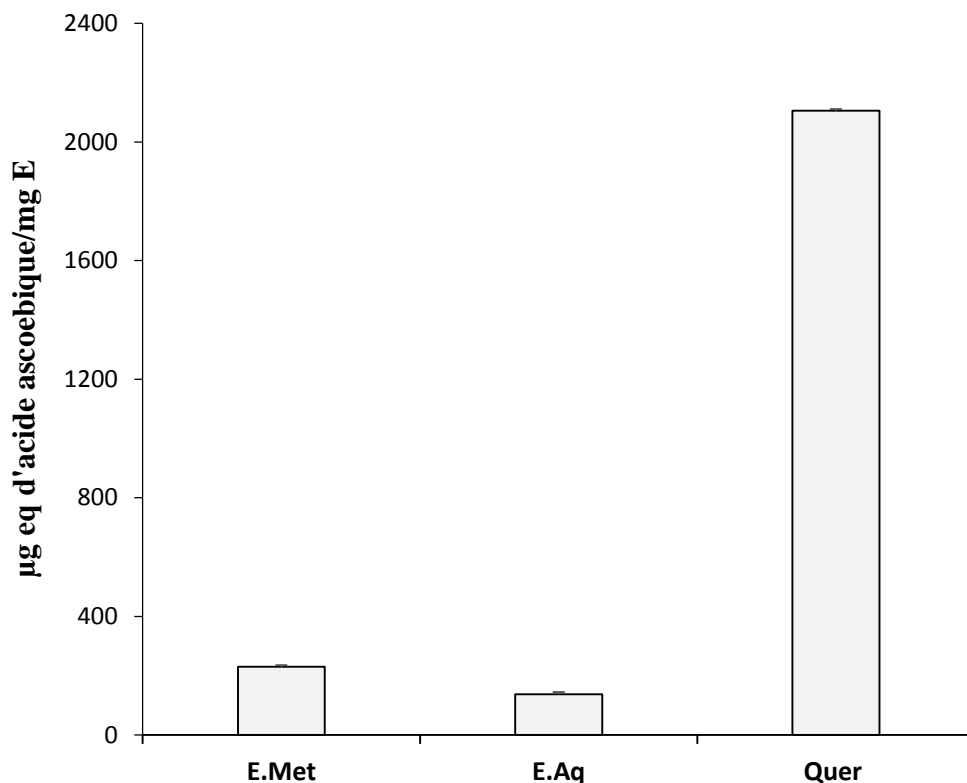


Fig.10 : Le pouvoir réducteur des extraits d'*Ammi visnaga* exprimé et de Quercitine.

Les résultats montrent que les deux extraits d'*Ammi visnaga* possèdent un pouvoir réducteur. En effet, l'E.Meth a montré un pouvoir réducteur meilleur que celui de l'E.Aq (230.45±5.15 µg eq d'acide ascorbique/mg E et 137.41±7.20 µg eq d'acide ascorbique/mg E, respectivement). On utilise la Quercitine comme une référence (2105±6.2 µg eq d'acide ascorbique/mg E).

Nous remarquons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits.

Le pouvoir réducteur est souvent utilisé pour évaluer la capacité de l'antioxydant à donner des électrons (**Haida et Hakiman, 2019**).

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle. Beaucoup de publications actuelles ont indiqué qu'il y a une relation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (**Bentabet et al., 2014**).

En d'autres termes, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination semi-quantitative des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction redox (**Bougandoura *et al.*, 2013**).

Ces études sur le genre *Ammi* montrer qu'il possède une activité réductrice, cela démontre leur propriété de donation d'électrons et par conséquent leur capacité de neutraliser les radicaux libres (**Caceres *et al.*, 2020**).

Le pouvoir réducteur de l'espèce *Ammi visnaga* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Bougandoura *et al.*, 2013**).

Cependant, ces différences entre les capacités antioxydantes globales pourraient non seulement dépendre de la quantité de polyphénols et flavonoïdes, mais aussi de la variabilité de leurs structures et de leurs interactions dans les extraits (**Megdiche-Ksouri *et al.*, 2015**).

Conclusion

Conclusion

Pendant des centaines d'années, les plantes médicinales ont été utilisées comme méthodes de traitement pour diverses maladies humaines. Le pouvoir de guérison de ces plantes est dû aux substances dites actives qu'elles contiennent. Ces substances naturelles aux propriétés phénoliques sont populaires en phytothérapie en raison des effets secondaires des médicaments et des séquelles nocives des antioxydants synthétiques.

L'objectif primordial assigné par cette étude afin d'évaluer les propriétés antioxydantes de la plante *Ammi visnaga*. L'extraction de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés et la méthode d'extraction. Les résultats obtenus montrent que le rendement le plus élevé est celui de l'E.Meth (9.2%) suivi par l'E.Aq (7.2%).

La quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu, en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium, en utilisant l'acide gallique et la Quercitine comme standard. Nos résultats montrent que les extraits d'*Ammi visnaga* riche en polyphénols et flavonoïdes avec la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes la plus élevée revient à l'E.Meth (243.57±0.59 µg EAG/mg E, 77.15±0.73 µg EQ/mg E, respectivement) et la plus faible valeur revient à l'E.Aq (198±0.57 µg EAG/mg E, 41.74±0.25 µg EQ/mg E, respectivement).

L'activité antioxydante des différents extraits d'*Ammi visnaga* a été évaluée par deux méthodes : le test de réduction de radical libre DPPH et le test de réduction de fer (FRAP). Pour le premier test les résultats ont montré que les deux extraits méthanolique et aqueux ont la capacité de piéger le DPPH (EC₅₀= 8.94±0.62 µg/ml et 13.47±0.62 µg/ml, respectivement). Pour le test de réduction du fer les résultats montrent que les deux extraits méthanolique et aqueux possèdent une activité réductrice puissant (230.45±5.15 µg eq d'acide ascorbique/mg E et 137.41± 7.20 µg eq d'acide ascorbique/mg E, respectivement).

Notre étude expérimentale nous a permis de déduire que la plante *Ammi visnaga* présente une bonne activité antioxydante qui pourrait être utilisée dans le domaine pharmaceutique.

Tous ces résultats obtenus *in vitro* ne constituent que la première étape à la recherche de substances d'origine naturelle à activité biologique, une étude *in vivo* est nous espère avoir une meilleure compréhension de l'activité antioxydante de cette plante.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2017). Polyphenols: properties, occurrence, content in food, potential effects. *Toxicology*, 6, 232-261.
- Alam, S., Anjum, N., Akhtar, J., & Bashir, F. (2018). Pharmacological investigation on Khella (*Ammi visnaga* L.). *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(13), 212-224.
- Albano, S. M., & Miguel, M. G. (2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 338-343.
- Al-Dalaen S. M., & Al-Qtaitat A. I. (2014). Oxidative stress versus antioxidants. *American journal of bioscience and bioengineering*, 2(5), 60.
- Ayoub, Z., Mehta, A., Mishra, S. K., & Ahirwal, L. (2017). Medicinal plants as natural antioxidants: A review. *Journal of botanical society*, 48.
- Baskar, V., Venkatesh, R., & Ramalingam, S. (2018). Flavonoids (antioxidants systems) in higher plants and their response to stresses. In *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants* (pp. 253-268). Springer, Cham.
- Beltagy, A. M., & Beltagy, D. M. (2015). Chemical composition of *Ammi visnaga* L. and new cytotoxic activity of its constituents khellin and visnagin. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(6), 285.
- Benslama, A., & Harrar, A. (2016). Free radicals scavenging activity and reducing power of two Algerian Sahara medicinal plants extracts. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(6), 158-161.
- Benslama, A., Harrar, A., Gul, F., & Demirtas, I. (2017). Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of *Zizyphus lotus* L. leaves extracts. *The natural products journal*, 7(4), 316-322.
- Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.
- Bidie, A. P., N'Guessan, B. B., Yapo, A. F., N'Guessan, J. D., & Djaman, A. J. (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*, 8(1-2), 1-12.
- Bougandoura, N., & Bendimerad, N. (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*, (9), 14.
- Bunaciu, A. A., Danet, A. F., Fleschin, Ş., & Aboul-Enein, H. Y. (2016). Recent applications for *in vitro* antioxydant activity assay. *Critical reviews in analytical chemistry*, 46(5), 389-399.
- Caceres, A., pinales-tabor, S.A., Ramos-medina, M.M., marroquín, M.N., Cruz, S (2020). Alternative use of coffee beans and leaves from seven regions of Guatemala for their antioxidant activity and chemical composition. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*,7(1),5.

- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Chraka, A., Raissouni, I., Benseddik, N., Khayar, S., Mansour, A. I., Belcadi, H., ... & Bouchta, D. (2020). Aging time effect of *Ammi visnaga* (L.) lam essential oil on the chemical composition and corrosion inhibition of brass in 3% NaCl medium. Experimental and theoretical studies. *Materials today: proceedings*, 22, 83-88.
- Dallali, S., Aloui, F., Selmi, H., & Sebei, H. (2018). Comparison of the chemical composition and the antioxidant activity of the leaves of Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) collected in three sites of Djebel Zaghouan (Tunisia). *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, CIRS (21)*, 3429-3438.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892.
- Dieng, S. I. M., Fall, A. D., Diatta-Badji, K., Sarr, A., Sene, M., Sene, M., ... & Bassene, E. (2017). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits hydro-ethanoliques des feuilles et écorces de *Piliostigma thonningii* Schumach. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(2), 768-776.
- Durand, D., Damon, M., & Gobert, M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(5), 218-224.
- Fadili, K., Amalich, S., N'dedianhoua, S. K., Bouachrine, M., Mahjoubi, M., El Hilali, F., & Zair, T. (2015). Teneurs en polyphénols et évaluation de l'activité antioxydante des extraits de deux espèces du Haut Atlas du Maroc: *Rosmarinus Officinalis* et *Thymus Satureioides* [Polyphenols content and antioxidant activity of two species from Moroccan High Atlas: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus satureioides*]. *Int J Innov Sci Res ISSN*, 17, 2351-8014
- Fontaine E, (2007). Radicaux libres. In : *Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Springer-Verlag France. Pp 251-257.*
- Ghasemzadeh, A., & Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of medicinal plants research*, 5(31), 6697-6703.
- Gheffour, K., Boucherit, K., and Boucherit-Otmani, Z. (2015). Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Echinops spinosus*. *Phytothérapie*, 13(5), 288-294.
- Haida Z. & Hakiman M. (2019). A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Sci Nutr*. 7(5): 1555-1563.
- Hashim, S., Jan, A., Marwat, K. B., & Khan, M. A. (2014). Phytochemistry and medicinal properties of *Ammi visnaga* (Apiaceae). *Pak J Bot*, 46(3), 861-7.
- Imane, B., Ouafa, R., & Rachid, D. (2016). Antimicrobial and antioxidant activity of *Ammi visnaga* (L) phenolic extracts and their effects on planktonic and biofilm growth of food spoilage *Bacillus cereus*.

- Jeeb, S. A., Mohammed, M. S., Fathelrahman, A. E., & Wadah, J. (2016). Bioactivity-guided isolation of two sesquiterpenes with potential anti-fungal activity from *Citrullus colocynthis* L. (Schard). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(6), 422-425.
- Kandola, K., Bowman, A., & Birch-Machin, M. A. (2015). Oxidative stress—a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 37, 1-8.
- Khalil, N., Bishr, M., Desouky, S., & Salama, O. (2020). *Ammi Visnaga* L., a Potential Medicinal Plant: A Review. *Molecules*, 25(2), 301.
- Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375.
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., & Świerczek-Zięba, G. (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19(1), 78-101.
- Le Pogam, P., Chollet-Krugler, M., & Boustie, J. (2015). Présentation des métabolites secondaires lichéniques: de leur biosynthèse à leur rôle au sein du thalle lichénique. *Lichénologie*, 40.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.
- Li, M., Cha, D. J., Lai, Y., Villaruz, A. E., Sturdevant, D. E., & Otto, M. (2007). The antimicrobial peptide-sensing system aps of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 66(5), 1136-114.
- Lima, G. P. P., Vianello, F., Corrêa, C. R., Campos, R. A. D. S., & Borguini, M. G. (2014). Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food and Nutrition sciences*, 1065-1082.
- Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
- Maqsood, S., Benjakul, S., Abushelaibi, A., & Alam, A. (2014). Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: A detailed review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1125-1140.
- Megdiche-Ksouri, W., Trabelsi, N., Mkadmini, K., Bourgou, S., Noumi, A., Snoussi, M., & Ksouri, R. (2015). *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, 63, 104-113.
- Merouane, A., Noui, A., Ali, K. N. B., & Saadi, A. (2014). Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *International journal of biological and chemical sciences*, 8(4), 1865-1870.
- Mevissen, M., & Schürmann, D. (2021). Les champs électromagnétiques induisent-ils du stress oxydatif?. *Newsletter. Édition spéciale*.
- Mezouar, D., Lahfa, F. B., Djaziri, R., & Boucherit-Otmani, Z. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante de *Berberis vulgaris* L. *Phytothérapie*, 12(5), 297-301.
- Mohammedi, Z., & Atik, F. (2011). Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst.

- Nikhade, N., Telrandhe, R., & Ansari, M. (2019). A Review of Natural Antioxidants in Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, 11-15.
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35), 27986-28006.
- Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., Yılmaz-Ersan, L., & Delikanlı, B. (2014). Phenolics in human health. *International Journal of chemical engineering and applications*, 5(5), 393.
- Pelletier, É., & Campbell, P. G. (2004). *Écotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement*. PUQ.
- Richard, W. (2013). *Nouvelle stratégie de fonctionnalisation de surfaces d'électrodes à base de sels de diazonium : application aux capteurs à antioxydants* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Saric, S., & Sivamani, R. K. (2016). Polyphenols and sunburn. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1521.
- Sarr, S. O., Fall, A. D., Gueye, R., Diop, A., Diatta, K., Diop, N., ... & Diop, Y. M. (2015). Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3), 1263-1269.
- Seidel, V. (2006). Initial and bulk extraction. In *Natural products isolation* (pp. 27-46). Humana press.
- Stankovic, M. S., Topuzovic, M., Solujic, S., & Mihailovic, V. (2010). Antioxidant activity and concentration of phenols and flavonoids in the whole plant and plant parts of *Teucrium chamaerdys* L. var. *glanduliferum* Haussk. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(20), 2092-2098.
- Surai, P. F., Kochish, I. I., Fisinin, V. I., & Kidd, M. T. (2019). Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. *Antioxidants*, 8(7), 235.
- Tanins Lima, G. P. P., Vianello, F., Corrêa, C. R., Campos, R. A. D. S., & Borguini, M. G. (2014). Polyphenols in fruits and vegetables and its effect on human health. *Food and Nutrition sciences*, 1065-1082.
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., & Montezano, A. C. (2020). Oxidative stress: a unifying paradigm in hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*, 36(5), 659-670.
- Travaini, M. L., Sosa, G. M., Ceccarelli, E. A., Walter, H., Cantrell, C. L., Carrillo, N. J., ... & Duke, S. O. (2016). Khellin and visnagin, furanochromones from *Ammi visnaga* (L.) Lam., as potential bioherbicides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(50), 9475-9487.
- Vauzour, D. (2014). Polyphénols et neuroprotection : où en sommes-nous aujourd'hui ? *Cahiers de nutrition et de diététique*, 49(4), 181-187.
- Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S., & Xu, X. (2013). A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(11), 2751-2756.

- Xiao, J., Kai, G., Yamamoto, K., & Chen, X. (2013). Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: a review on structure-activity relationship aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8), 818-836.
- Xiao, J., Ni, X., Kai, G., & Chen, X. (2013). A review on structure–activity relationship of dietary polyphenols inhibiting α -amylase. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 497-506.
- Yadav, S.A., Raj, A.J., Sathishkumar, R (2012). *In vitro* antioxidant activity of *Barleria noctiflora* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S716-S722.
- Yaici, K., Dahamna, S., Moualek, I., Belhadj, H., & Houali, K. (2019). Évaluation de la teneur des composés phénoliques, des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de l'espèce *Erica arborea* L. (*Ericaceae*) dans la médecine traditionnelle du Tell sétifien dans l'Est Algérien. *Phytothérapie*.
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Yao, H. W., Li, J., Chen, J. Q., & Xu, S. Y. (2004). Inhibitory effect of leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), 915-920.