



République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de
l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Université Abou
Bekr Belkaïd -Tlemcen-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers Département de Biologie



Mémoire de Master

Biologie

Option

Biochimie : molécules bioactives

Présenté par

BEN AHMED IKRAM

**Activité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique
et ses fraction des racines de l'*Arbutus unedo***

Devant le Jury :

Président: M^{elle} BENARIBA N.

M.C.A Tlemcen

Examineur: M^r RAHMOUN N.

M.C.A Tlemcen

Encadreur : M^{me} BELAID MEDJDOUB H.

M.C.B Tlemcen

Année universitaire 2016/2017

Dédicace

Je dédie ce travail

À ma famille, et en particulier, à ma mère pour tout ce qu'elle a fait durant mes années d'étude que j'honore ce succès, et à mon père pour son soutien

À ma sœur que j'adore

À mes deux frères

À ma grande mère

À mes cousins et cousines.

À tous mes amis de l'université et d'ailleurs

Ikram

Remerciements

*Avant tout, je remercie **DIEU**, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience afin de réaliser ce travail.*

*Mes premières remerciements vont à **Mme MEDJDOUB H.**, maitre de conférences B, Département de biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et Sciences de la terre et de l'univers, université Aboubekr Belkaide de Tlemcen, d'avoir accepté d'encadrer et de diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, pour ses encouragements et ses conseils judicieux tout le long de la réalisation de ce mémoire.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **Melle BENARIB N.** Maitre de conférences A au département de biologie, d'avoir accepté de présider le jury de ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à **Mr RAHMOUNE N.** Maitre de conférence A au département de biologie Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, qui ma fait l'honneur d'examiner mon travail.*

*Mes remerciement à tous **mes professeurs** qui m'ont transmis leur savoir faire durant mon cursus universitaire.*

*Aux membres du laboratoire de recherche sur les substances naturelles et bioactives (LASNABIO) pour leur aide et leur accueil spécialement à **Mme MEHYAOUI K.** ingénieur de laboratoire.*

A toutes les personnes dont les noms ne sont pas cités mais qui se reconnaîtront, je leur adresse un hommage pour tous ses encouragements

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale *Arbutus unedo* de la famille des Ericaceae, largement rependu dans la région de Tlemcen.

L'activité antioxydante de l'*Arbutus unedo* a été évaluée par le test de DPPH, réduction du fer (FRAP) et le blanchissement du β -carotène. Pour la première et la deuxième technique les résultats montrent que la fraction acétate d'éthyle présente l'activité la plus élevée suivi de l'extrait hydro-éthanolique et la fraction aqueuse.

Pour le test de blanchissement du β -carotène la fraction acétate d'éthyle a montré l'activité la plus élevée suivie par la fraction aqueuse et l'extrait hydro-éthanolique.

Pour le blanchissement du β -carotène, la plante a donné un résultat meilleur par rapport au témoin. Il ressort de cette étude que l'arbousier est doué d'un pouvoir antioxydant remarquable.

Mots clés : racine d'*Arbutus unedo*, DPPH, FRAP, blanchissement du β -carotène.

Abstract

Our work deals with the study of the antioxidant activity of a medicinal plant *Arbutus unedo* (Ericaceae), widely spread in the region of Tlemcen.

The antioxidant activity of *Arbutus unedo* was evaluated by the DPPH, iron reduction (FRAP) and bleaching of β -carotene tests. For the first and second techniques the results show that the ethyl acetate fraction exhibits the highest activity followed by the hydro-ethanolic extract and the aqueous fraction.

For the β -carotene bleaching test, the ethyl acetate fraction showed the highest activity followed by the aqueous fraction and the hydro-ethanolic extract.

In addition and for bleaching of β -carotene, the plant gave a better result compared to the control. It is clear from this study that the strawberry tree is endowed with a remarkable antioxidant power.

Keywords: *Arbutus unedo* root, DPPH, FRAP, β -carotene bleaching.

ملخص

يركز عملنا على دراسة النشاط المضاد للأكسدة من النباتات الطبية قطلب أونيدو من عائلة (Ericaceae) و التي توجد على نطاق واسع في منطقة تلمسان

تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة في قطلب أونيدو بواسطة اختبار DPPH ، و إرجاع الحديد (FRAP) وتبييض β كاروتين. بالنسبة للاختبار الأول والثاني تبين أن جزء خلاص الإيثيل لديه النشاط العالي يليه المستخلص المائي الكحولي والجزء المائي.

بالنسبة لاختبار تبييض β كاروتين اظهر جزء خلاص الإيثيل أعلى نشاط يليه الجزء المائي والمستخلص المائي-الكحولي، وقدم النبات نتيجة أفضل مقارنة بمادة BHT. ويتضح من هذه الدراسة أن شجرة القطلب لها قوة مضادة للأكسدة ملحوظة.

كلمات البحث: جذو القطلب , DPPH , ارجاع الحديد , تبييض β كاروتين

Liste des abréviations

% : Pourcentage

ADN : l'acide désoxyribonucléique

AGPI : Acide gras polyinsaturé

BHT : butyl hydroxy toluène

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

Fe²⁺ : Ions ferreux

Fe³⁺ : Ions ferriques

FeCl₃ : Chlorure ferrique

FRAP : Ferric reducing antioxidant power

GPX : Glutathion peroxydase

H₂O₂ : Le peroxyde d'hydrogène

HO• : Le radical hydroxyle

K₃Fe(CN)₆ : ferricyanure de potassium

NO : Oxyde d'azote

NO• : Monoxyde d'azote

O₂•- : Le radical superoxyde

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

ONOO• : Peroxynitrite

ROO• : Le radical peroxyde

SOD : Superoxyde dismutase.

UV : Ultra- violet

Liste des figures

Figure 1 : Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène.....	3
Figure 2 : Réaction par la Glutathion peroxydase.....	7
Figure 3 : Structure chimique de l'acide ascorbique.....	8
Figure 4 : Structure du noyau phénol.....	9
Figure 5 : Structure chimique des flavonoïdes.....	12
Figure 6 : structure chimique de l'acide gallique et l'acide ellagique	13
Figure 7 : arbousier à l'automne couvert de fleurs et de fruits dans différent états de maturité.....	15
Figure 8 : formule chimique de l'arbutine	16
Figure 9 : Montage d'extraction sous-reflux	18
Figure 10 : séchage de l'extrait à 50°C	18
Figure 11 : Montage de dispositif d'extraction liquide –liquide.....	18
Figure 12 : schéma du protocole expérimental	19
Figure 13 : Structure chimique du radical libre DPPH	20
Figure 14 : Piégeage du radical libre DPPH [•]	20
Figure 15 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydro-éthanolique	24
Figure 16 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de la fraction aqueuse.....	25
Figure 17 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle	25
Figure 18 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.....	26

Figure 19 : Pouvoir réducteur de l'extrait hydro-éthanolique et ses fractions par la méthode FRAP.....	27
Figure 20 : Pourcentages d'inhibition du blanchissement du β -carotène en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydro-éthanolique.....	28
Figure 21 : Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β -carotène en fonction des différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle	29
Figure 22 : Pourcentages d'inhibition de blanchiment du β -carotène en fonction des différentes concentrations de la fraction aqueuse	29
Figure 23 : Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β -carotène en fonction des différentes concentrations de BHT.....	30

Liste des tableaux

Tableau 1 : Valeurs des IC ₅₀ des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> .L.....	26
Tableau 2 : valeur des IC ₅₀ des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> .L.....	30

Table de matière

Première partie : synthèse bibliographique

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Chapitre I : Stress oxydatif

1. Stress oxydatif.....	2
1.1. Espèces réactives de l'oxygène.....	2
1.2. Effets des espèces réactives de l'oxygène.....	3
1.2.1. Effet sur l'acide désoxyribonucléique ou ADN.....	4
1.2.2. Effet sur les protéines.....	4
1.2.3. Effet sur les lipides membranaires.....	4
1.3. Origine de production des espèces réactives de l'oxygène.....	4
1.4. Conséquences du stress oxydatif.....	5
1.5. Les Antioxydants.....	5
1.5.1. Mécanisme d'action des antioxydants.....	6
1.5.2. Principaux antioxydants.....	6
1.5.3. Défenses enzymatiques.....	6
➤ Les superoxydes dismutases.....	6
➤ Les Catalases.....	6
➤ La glutathion peroxydase.....	7
1.5.4. Défenses non enzymatiques.....	8
a. La vitamine C.....	8
b. La vitamine E.....	8
c. Les caroténoïdes.....	9

d. Les polyphénols.....	9
1.5.5. Les oligo-éléments.....	9
1. Sélénium.....	9
2. Le cuivre.....	10
3. Le zinc.....	10
1.5.6. Les antioxydants de synthèse.....	10

Chapitre II : plante et métabolites secondaires

Introduction.....	11
1. Les métabolites secondaires.....	11
1.2. Les composés phénoliques.....	11
a) Les flavonoïdes.....	11
b) Les tanins.....	12
c) Les coumarines.....	13
d) Les anthocyanosides.....	13
1.3. Les alcaloïdes.....	14
2. <i>L'Arbutus unedo. L</i>	14
2.1. Répartition géographique.....	14
2.2. Description botanique.....	14
2.3. Classification taxonomique de <i>l'Arbutus unedo.L</i>	15
2.4. Constituants.....	16
2.5. Propriétés et usages.....	16

Deuxième partie : Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Objectif.....	17
2. Matériel végétale	17
3. L'extraction	17
3.1. Préparation de l'extrait eau/éthanol.....	17
3.2. Extraction liquide-liquide.....	18
4. Etude de l'activité antioxydant et anti radicalaire des extraits	20
4.1. Piégeage du radical libre DPPH	20
4.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)	21
4.3. Test de blanchissement du β -carotène.....	23

Résultats et interprétation

1. Evaluation de l'activité antioxydante	24
1.1. Piégeage du radical libre DPPH	24
1.2. Réductions du fer –FRAP	27
1.3. Blanchissement du β -carotène.....	28
Discussion	31
Conclusion	34
Références bibliographiques	35

Introduction

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels ou sont des dérivés de produits naturels (Boldi, 2004).

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique de l'humanité. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 65- 80% de la population mondiale dans les pays en développement, dépendent essentiellement des plantes médicinales traditionnelles pour leurs soins de santé primaire (Newman *et al.*, 2000 ; Calixto, 2005).

La production des radicaux libres chez les organismes vivants est un processus physiologique, régulé par le biais de divers processus chimiques ou enzymatiques de détoxification. En effet l'organisme possède ses propres moyens de défenses lui permettant de lutter contre ces radicaux libres. Lorsque ce système de protection perd son efficacité ou quand le nombre de radicaux libres augmente de manière importante, il survient un stress oxydant (Koechlin, 2006).

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable d'antioxydants naturels qui sembleraient intervenir dans la prévention de plusieurs pathologies plus ou moins graves, provoquées par le stress oxydatif (Sanchez-Moreno, 2002).

Les antioxydants de synthèses tels que le butyl hydroxy anisole (BHA) et le butyl hydroxy toluène (BHT) sont certes très efficaces, mais susceptibles de manifester des effets secondaires voire toxiques (Manian *et al.*, 2008). Pour pallier les effets secondaires des produits synthétiques et leurs toxicités, les scientifiques se trouvent devant l'obligation au recours à la phytothérapie.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'activité antioxydante *in vitro* de *l'Arbutus unedo* (famille des Ericacées) dit aussi arbre à fraise qui est en fait un arbrisseau essentiellement sauvage et typique de la région méditerranéenne. Les baies de l'arbousier contiennent des quantités importantes des composés phytochimiques (Teofresto, 1988). Il est utilisé en médecine traditionnelle comme agents antiseptiques urinaires, astringents et diurétiques.

Première partie

Synthèse bibliographique

Chapitre I :
Stress oxydatif

1. Stress oxydatif :

Stress oxydant se définit par l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Bonfont-Rousselot et Collin, 2010), à cause de l'existence d'un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants (ERO) et les antioxydants que ce soit par une augmentation de la production d'espèces oxygénées réactives et/ou par une diminution des défenses antioxydants (Halliwell et Whiteman, 2004). Ce déséquilibre conduit à des dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles (Sore, 2004 ; Delattre *et al.*, 2005). Le stress oxydant est impliqué dans le développement de plus de 200 pathologies (Pincemail *et al.*, 2001).

1.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO) :

Un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule), contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Afonso *et al.*, 2007). Cette caractéristique le rend instable et lui procure une grande réactivité (Halliwell et Whiteman, 2004).

Les radicaux libres impliquant un ou des atomes d'oxygène se nomment espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces espèces radicalaires sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques (Laguerre *et al.*, 2007).

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est la forme primaire des ERO, formée par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (O_2), c'est le radical le moins réactif mais le précurseur des autres ERO. Ce radical est le substrat d'enzymes essentielles, les superoxydes dismutases (SOD) qui le transforment en eau oxygénée H_2O_2 , ce dernier n'étant toutefois pas un radical libre puisqu'il ne contient pas d'électrons non appariés, mais il est réactif. L'eau oxygénée peut avoir plusieurs destinées. En présence de métaux, en particulier le fer Fe^{2+} , elle est transformée en radical hydroxyl $^{\circ}OH$ par la réaction de Fenton (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

Les radicaux libres impliquant plutôt un atome d'azote se nomment espèces réactives de l'azote. Le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) est un radical libre qui est formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal du groupement guanidine de la L. arginine. Ce radical va interagir avec l'anion superoxyde pour donner le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$), composé extrêmement réactif et toxique (Tremellen, 2008 ; Barouki, 2006).

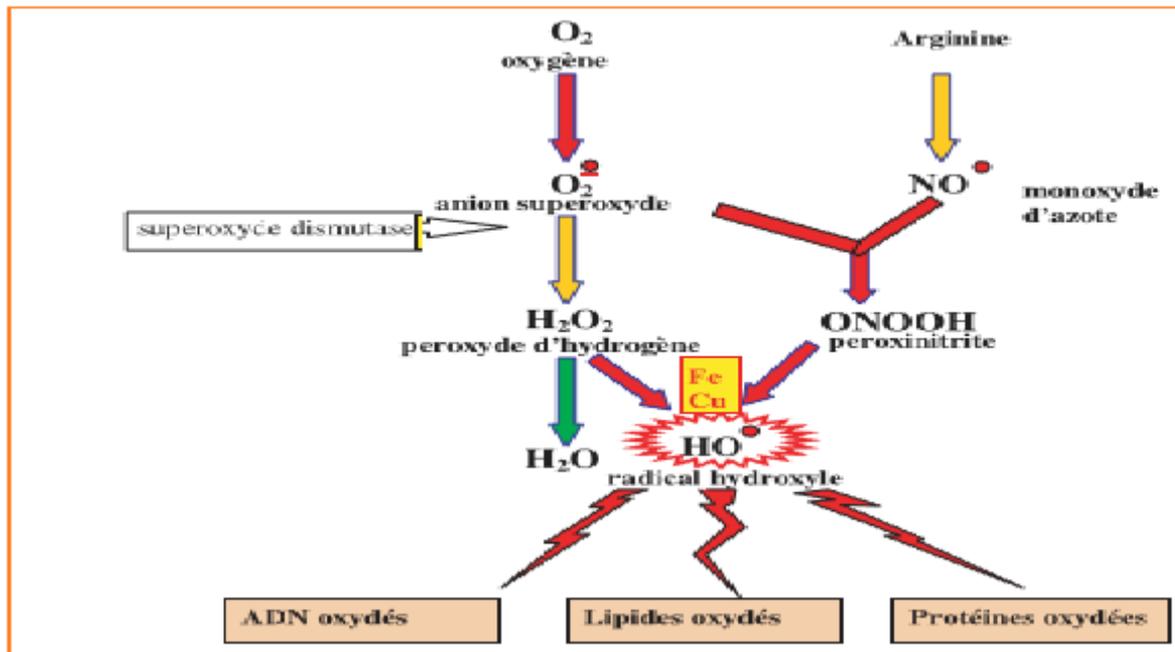


Figure1 : Les principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

1.2. Effets des espèces réactives de l'oxygène :

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, car ils peuvent être bénéfiques ou nuisibles pour les systèmes vivants (Ruttkay-Nedecky, 2013). Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables, notamment de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription. Citons aussi le processus de fécondation, la régulation du tonus vasculaire, la relaxation du muscle lisse, l'adhésion plaquettaire, et la défense antimicrobienne (Dröge, 2002 ; Haleng *et al.*, 2007). Ils sont également nécessaires pour les procédés biosynthétiques, y compris la production d'hormones thyroïdiennes et la réticulation de la matrice extracellulaire (Brieger *et al.*, 2012).

À l'inverse, une surproduction d'ERO, peuvent engendrer des dommages importants aux structures cellulaires, y compris les lipides, les membranes, les protéines et les acides nucléiques (Poli *et al.*, 2004 ; Carrière *et al.*, 2006).

1.2.1. Effet sur l'acide désoxyribonucléique ou ADN :

L'ADN est une cible privilégiée pour les ERO. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\bullet\text{OH}$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du vieillissement (Haleng *et al.*, 2007).

1.2.2. Effet sur les protéines :

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine (Haleng *et al.*, 2007). Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Levine, 2002). Le radical peroxyolé est généralement considéré comme une espèce à radicaux libres pour l'oxydation des protéines (Lobo *et al.*, 2010).

1.2.3. Effet sur les lipides membranaires :

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyolé ($\text{ROO}\bullet$), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (Atkin *et al.*, 2005). Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire.

1.3. Origine de production des espèces réactives de l'oxygène :

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance aux espèces réactives de l'oxygène. Les ERO peuvent être produites par des réactions chimiques et surtout enzymatiques. En effet, toute réaction impliquant de l' O_2 et un système réducteur de transfert d'électrons est susceptible de libérer des ERO. C'est ainsi que

la chaîne respiratoire provoque une libération importante d'ERO. D'autres activités enzymatiques fournissent aussi des ERO, notamment les NADPH oxydases au cours de l'inflammation et les cytochromes P450 au cours de la détoxification des xénobiotiques. Ainsi, la mitochondrie, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique sont les sièges principaux de libération d'ERO (Barouki et Morel, 2001). D'autres facteurs exogènes sont également capables de générer ces espèces dans l'organisme, en citant, les champs électromagnétiques, les rayons ultraviolets, les rayons X, les particules inhalées (amiante, silice), l'ingestion d'alcool, des anticancéreux, des toxiques présents dans notre environnement (suie, goudron, tabac, polluants industriels) (Favier, 2003).

1.4. Conséquences du stress oxydatif :

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la production mitochondriale de radicaux (Sohal ,2002). De nombreuses anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression (Favier, 2006). Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies inflammatoires (arthrite, glomérulonéphrite, syndrome des maladies respiratoires adultes), les maladies ischémiques (maladies cardiaques, ischémie intestinale), le syndrome d'immunodéficience acquise, l'emphysème, les ulcères gastriques, diabète, et l'hypertension, les troubles neurologiques (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, dystrophie musculaire)(Stefanis *et al.*, 1997 ; Schiller *et al.*, 2003 Valko *et al.*, 2007).

1.5. Les Antioxydants :

L'organisme dispose d'un vaste réseau de défense très efficace contre la production des espèces réactives de l'oxygène. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme d'antioxydants et désignent toutes substances qui, présentes a faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Gutteridge, 1990 ; Larauche *et al.*, 2003) et d'exercer leurs effets délétères et prévenir les dommages oxydatifs a notre corps (Pincemail, 2009) .

1.5.1. Mécanisme d'action des antioxydants :

Les antioxydants peuvent exercer leur effet sur les systèmes biologiques par différents mécanismes, y compris le don d'électrons, la chélation des ions métalliques, les co-antioxydants ou la régulation de l'expression des gènes (Krinsky, 1992). Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec des radicaux libres bien déterminés (Van antwerpen, 2006).

1.5.2. Principaux antioxydants :

Il existe deux sources de défenses antioxydantes : l'une est apportée par l'alimentation via les fruits et légumes, sources de vitamines C, E, caroténoïdes, polyphénols ; l'autre est enzymatique et se compose de molécules de petite taille (glutathion), d'enzymes (SOD, glutathion peroxydase, catalase (Leverve, 2009 ; Pincemail, 2009). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certaines enzymes antioxydantes (Pincemail, 2009).

1.5.3. Défenses enzymatiques :

➤ Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène selon la réaction suivante (Barouki, 2006 ; Delattre *et al.*, 2005) :



Chez les humains, trois formes de superoxyde dismutase sont présentes. SOD1 est situé dans le cytoplasme, SOD2 dans les mitochondries, et SOD3 est extracellulaire. Le premier est un dimère, tandis que les autres sont des tétramères. SOD1 et SOD3 contiennent du cuivre et du zinc, tandis que le SOD2 possède du manganèse dans son centre réactif (Afonso *et al.*, 2007 ; Cao *et al.*, 2008).

➤ Les Catalases

La catalase est l'une des principales enzymes du système antioxydant, est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Matés, 2000). Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les

érythrocytes. La catalase humaine est formé de quatre sous unités, chaque sous unités comporte un groupement ferriprotoporphyrine dans sons site actif avec un atome de fer a l'état Fe^{3+} (Ko et al., 2000).



➤ **Glutathion peroxydase (GPx)**

La glutathion peroxydase ou GPX, l'une des principales lignes de défense contre les agressions radicalaires, est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium (Collard, 2006). Chez les Mammifères, elle existe sous 5 isoformes qui sont présentes dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Les GPX cytosoliques et mitochondriales (cGPX et GPX1) assurent l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des hydroxyperoxydes lipidiques en utilisant le glutathion (GSH) comme donneur d'électrons (Delattre *et al.*, 2005 ; Matés et Sanchez-Jimenez , 2000).

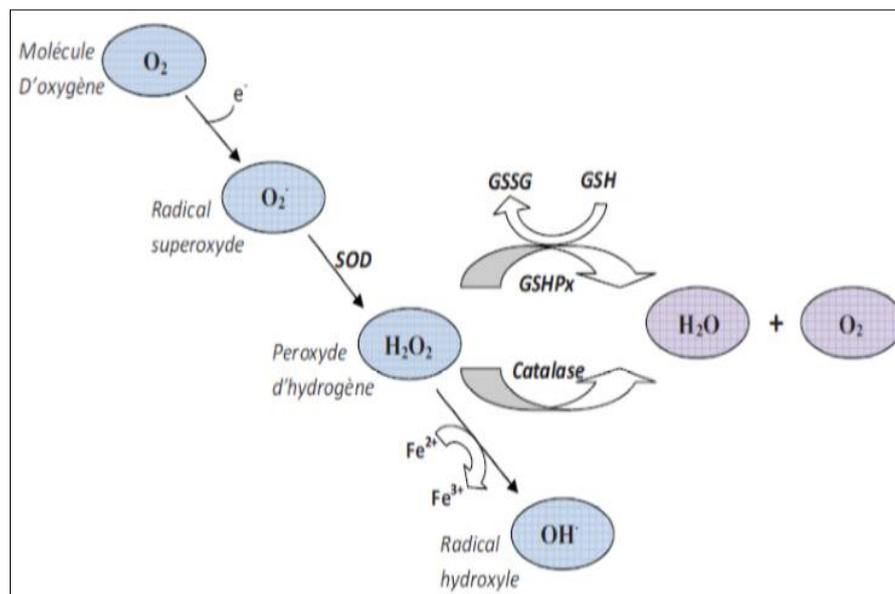


Figure 2 : Réaction par la Glutathion peroxydase (Goudable et favier, 1997).

1.5.4. Défenses non enzymatiques :

a. La vitamine C :

La vitamine C ou acide ascorbique fait partie des vitamines dites hydrosolubles. C'est un puissant antioxydant (Padayatty *et al.*, 2003 ; Vitam, 2001), son rôle essentiel est de capter les radicaux peroxydes lipidiques RO_2^{\cdot} qui propagent les chaînes de peroxydation (Gardès-Albert *et al.*, 2003). La vitamine C protège le cerveau et la moelle épinière des radicaux libres, évitant l'oxydation des graisses polyinsaturées (Paschalis *et al.*, 2016). Leurs fonctions sont diverses : le bon fonctionnement du système immunitaire, la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (Haleng *et al.*, 2007 ; Huang *et al.*, 2001 ; Stamford, 2012). Ses principales sources alimentaires sont les fruits (agrumes, kiwi, cerises, melon) et les légumes (tomates, légumes verts, brocoli et choux) (Roberfroid, 2008).

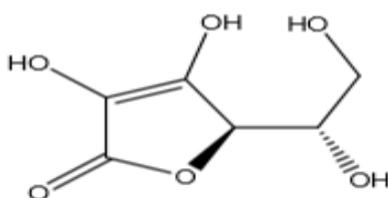


Figure 3 : Structure chimique de l'acide ascorbique (Diallo, 2005).

b. La vitamine E:

La vitamine E est le nom collectif d'un ensemble de huit tocophérols et tocotriénols apparentés (alpha-, bêta, gamma- et delta-tocophérol et alpha-, bêta, gamma- et delta-tocotriénol) (Herrera et Barbas, 2001 ; Sen *et al.*, 2006), sont des vitamines liposolubles avec des propriétés antioxydants. L'alpha-tocophérol est sa forme la plus abondante et la plus active (Saremi et Arora, 2010), il prévient la peroxydation des lipides membranaires en capturant les radicaux peroxydes (Traber et Atkinson, 2007). L'alpha-tocophérol se trouve en quantité variable dans les huiles végétales (huile d'arachide, de soja, de palme, de maïs, et d'olive pressées à froid), ainsi que dans les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes (Colette, 2003). La carence en vitamine E occasionne des problèmes neuromusculaires tels que des myopathies (dégénérescence du tissu musculaire), des troubles de la rétine ou du système immunitaire (Howard *et al.*, 2011).

c. Les caroténoïdes :

Caroténoïdes sont des puissant antiradicalaires, sont retrouvés souvent dans les plantes alimentaires, leur rôle protecteur dans les système biologiques implique la désactivation des espèces réactives telles l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ les radicaux peroxydes ROO° et les alkyles R° (Krinsky, 2001 ; Gardès-Albert *et al.*, 2003). les caroténoïdes incluent l'alpha carotène, bêta carotène lycopène, phytofluène, phytoéne, lutéine, néoxanthine, violaxanthine, anthéroxanthine, alpha cryptoxanthine et bêta cryptoxanthine (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

Le chef de file des caroténoïdes est cependant le bêta-carotène qui est les précurseur de la vitamine A .il est retrouvé dans les légumes verts, les épinards, les carottes, les salades, le melon et d'autre fruits jaunes (Ahmet, 2003).

d. Les polyphénols

Les polyphénols appartiennent à la famille des antioxydants. Ils ont des propriétés bénéfiques démontrées chez l'animal. Ils luttent contre les radicaux libres et donc le stress oxydatif, ils ont des vertus anti-inflammatoires, anti-cancérogènes et protectrices vis-à-vis du système cardiovasculaire (Scalbert *et al.*, 2005 ;Fazel Nabavi *et al.*, 2015), se trouvent en grande partie dans les fruits(les raisins, les pommes, les poires, les cerises..) , les légumes, les céréales et les boissons (Scalbert *et al.*, 2005).

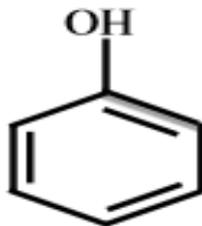


Figure 4 : Structure du noyau phénol (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

1.5.5. Les oligo-éléments

1. Sélénium :

Au sein des oligoéléments essentiels, le sélénium apparait comme un micronutriment primordial dans le maintien des défenses antioxydants et de la santé (Néve, 2002 ; Rayman, 2002 ; Burk, 2002).Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire (Breinneisen *et al.*, 2005), cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathion peroxydases sélénodépendantes (Delattre *et*

al.,2005) .Ce rôle protecteur est complété par d'autres fonctions essentielles, telles que son rôle de détoxification des métaux lourds (cadmium, mercure, plomb) ou son effet activateur de la métabolisation des xénobiotiques organiques (Roussel et Hininger-Favier,2009 ; Delattre et al.,2005). Les principales sources alimentaires de sélénium sont les aliments riches en protéines d'origine animale (viandes, poissons, œufs, lait), les céréales et certains légumes et fruits secs (Nève, 2002).

2. Le cuivre

A concentrations physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzyme comme la SOD le cytochrome C oxydase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réaction de production d'ERO lorsque sa concentrations est élevée devenir pro -oxydant. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau (Haleng *et al.*, 2007).

3. Le zinc

Le zinc joue un rôle de cofacteur pour de nombreux enzymes et intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines. Comme le cuivre, le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège également les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation d'ERO induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre (Zago *et Oteiza*, 2001 ; Haleng *et al.*, 2007). Le zinc est principalement apporté par la viande, les œufs ,les produits laitiers et les céréales (Roussel et Hininger-Favier, 2009).

1.5.6. Les antioxydants de synthèse

Plusieurs antioxydants de synthèse sont autorisés en alimentation pour protéger les lipides insaturés de l'oxydation. Parmi eux, l'éthoxyquine (EQ), le butyl-hydroxy-toluène (BHT), le butyl-hydroxy-anisole (BHA), le gallate d'octyle (OG) et le gallate de propyle (PG) (Lundebye *et al.*, 2010). Malgré leur grand pouvoir antioxydant, l'excès de ces antioxydants synthétique peut être toxique, responsable de la mutagénicité (Kahl, 1984).

Chapitre II

Plante et métabolites

secondaires

Introduction :

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la médecine des médicaments très efficaces. Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, nous montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part dépourvues de toxicité (Farnsworth *et al.*, 1985), sur 252 médicaments considérés comme essentiels par l'OMS, plus de 60 % sont exclusivement produits à partir de plantes médicinales (Rates, 2001).

Le monde végétal constitue la source majeure de médicaments, grâce à la richesse des produits dits métabolite secondaire, celui-ci produit des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animal et végétal. Ces composés sont reconnus pour leur nombreuses activités biologiques, telles que les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Fabricant et Farnsworth, 2001).

1. Métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des molécules nécessaires à la défense de la plante contre les agressions extérieures, agent protecteur contre le stress physiques. Ils appartiennent à des groupes chimiques variés, alcaloïdes, composé phénolique, et les terpènes. Les métabolites secondaires représentent une source importante de molécule utilisable dans des domaines aussi différents que la pharmacologie, agroalimentaire et cosmétologie (Macheix, 2005).

1.2. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules de structure variées, divisées en une dizaine de classe chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatiques à 6 carbones, lui même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004).

a)- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont généralement de puissants antioxydants ; ils constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 5000 composés différents identifiés dans la règne végétal (Massaux, 2012). La structure chimique de base est constituée de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne

la lettre C. Selon le degré d'hydroxylation et l'insaturation des cycles, on distingue 5 classes de flavonoïdes : les flavanones, les flavonols, les flavones, les flavanols, et les isoflavones (Ghidira, 2005). Les flavonoïdes sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antiseptiques, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives (Bruneton, 2009). Ils sont principalement retrouvés dans les agrumes : citrons, oranges, pamplemousses et dans une moindre mesure dans les abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, brocolis, et dans les tomates (Heim *et al.*, 2002).

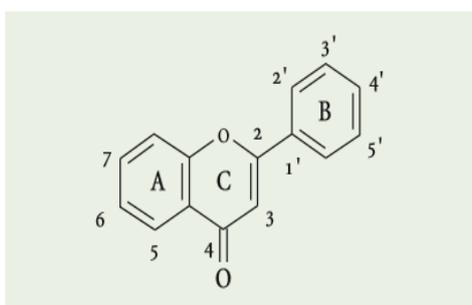


Figure 5 : Structure chimique des flavonoïdes (Ghidira, 2005)

b)-Les tanins

Les tanins sont des substances végétales de la famille des polyphénols, le plus souvent hydrosolubles, qui possèdent la capacité de précipiter les protéines, les alcaloïdes, et les polysaccharides, à partir de leur solution aqueuse. Ces métabolites secondaires sont utilisés par les plantes supérieures (arbres, plantes à fleur, etc) comme moyen de défense chimique contre les parasites (Bruneton, 2009 ; Ozcan *et al.*, 2014). Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes (Sereme *et al.*, 2008) :

Les tanins condensés : dans la littérature, les tanins condensés peuvent être également nommés proanthocyanidines ou tanins catéchiques. Ces composés, qui correspondent à des polymères de flavan-3-ols, peuvent être répertoriés en différentes classes : les monomères, les dimères, les oligomères et les polymères (Tarascou, 2005).

Les tanins hydrolysables : ce sont des oligo-ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol. Le sucre est généralement le glucose. L'acide -phénol est soit l'acide gallique dans les tannins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tanins ellagiques (Jean, 2009).



Figure 6: structure chimique de l'acide gallique et l'acide ellagique (Diallo, 2005)

Les tanins sont doués d'un pouvoir antioxydant. C'est ainsi que les tanins hydrolysables inhibent la peroxydation des lipides et que les tanins condensés inhibent la formation des superoxydes (Bruneton, 1999).

c)-Coumarines :

Les coumarines sont des produits naturels .Ils dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (Bruneton, 1999) .Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Bossokpi, 2002). Ainsi ont des propriétés antipyrétique, analgésique, sédative, antioedémateuse et anti convulsivante (Mpondo *et al.*, 2015).

d)- Les anthocyanosides :

Ces composés phénoliques se caractérisent par une génine comportant un noyau flavylium ou cation 2-phénylbenzopyrilium. Il s'agit de pigments existant sous forme d'hétérosides stables et hydrosolubles responsables de la coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleue ou violette de la plupart des fleurs et fruits (Nijveldt *et al.*, 2001 ;Palé *et al.*, 2007). Les anthocyanes sont répandus dans plusieurs fruits comme les cerises, les myrtilles, le cassis, et le raisin. Ils sont rencontrés dans des légumes comme les racines de betterave, et les bulbes d'oignon rouge et dans des boissons comme, le vin rouge et le thé. Les anthocyanes bloquent la production du NO à partir des polynucléaires neutrophiles au cours de la phase précoce de l'inflammation et sont considérés comme molécules anti-inflammatoires (Kong *et al.*, 2003) .

1.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique, avec un degré variable de caractère basique (Baxter *et al.*, 1998). Les drogues à alcaloïdes ont une importance considérable en thérapeutique. Certaines agissent au niveau central, d'autres sur le système nerveux autonome et d'autres ont des propriétés anesthésiques, anti-tumorales, et aussi antioxydant. Elles agissent à faibles doses, mais peuvent même être très toxiques à très faible dose (Bouhadjera, 2005).

2. *L'Arbutus unedo L.*

L'Arbutus unedo L est une espèce très fréquente en l'Algérie. Il possède plusieurs noms communs comme l'arbousier, l'arbre aux fraises, le fraisier en arbre, l'olonier (Boullard, 2001). Ses appellations arabes sont: Mothrounia, Acir ed dob, Henna hameur, Lenj, Bou-djbida qatelabihia (Beloued, 2005).

D'un point de vue écologique, *A.unedo* est une plante intéressante. En tant qu'espèce caractéristique des écosystèmes méditerranéens, elle contribue à maintenir la biodiversité de la faune, contribue à stabiliser les sols en évitant l'érosion, a une forte capacité de régénération après les incendies et survit assez bien dans les sols pauvres. En outre, il peut supporter des températures basses et tolérer la sécheresse (Gomes *et al.*, 2009)

2.1. Répartition géographique

Arbutus unedo L. a une distribution méditerranéenne, se trouvant dans l'ouest, le centre et le sud de l'Europe, le nord-est de l'Afrique (à l'exclusion de l'Egypte et de la Libye) et des îles Canaries et de l'Asie occidentale (Oliveira *et al.*, 2011). En Algérie, l'arbousier est bien représenté dans le tell algérien, surtout dans les forêts de chêne liège (des régions de Jijel, Skikda et El Taraf) (Akssil, 2015). *Arbutus unedo L.* préfère les substrats siliceux, décarbonatés et les sols alcalins relativement acide (Celikel *et al.*, 2008).

2.2. Description botanique

La plante est un arbuste à feuilles persistantes ou un petit arbre (rarement dépassant 3 m) avec une habitude d'étalement et un écorce gris-brun. Les petites fleurs blanches aux myrtilles sont assemblées en panicules d'environ 5 cm de long, les fleurs d'*A. unedo* sont une source importante de nectar et de pollen pour les abeilles. Les feuilles sont alternées, simples, vert foncé, ont une marge dentelée, avec un pétiole de 10 mm ou moins. Les fruits sont

globulaires, orange-rouge lorsqu'ils sont mûrs, atteignant 2 cm de diamètre, sont récupérés avec des papilles coniques et mûr en automne (Oliveira *et al.*, 2011). Les fruits prennent environ 12 mois pour mûrir. Les populations d'*A. unedo* peuvent être uniformes, mais dans la plupart des cas, cette espèce est associée à d'autres arbres (Reille, 2015).



Figure 7: Arbousier à l'automne couvert de fleurs et de fruits dans différents états de maturité (Reille, 2015)

2.3. Classification classique de l'*Arbutus unedo* L. (Aksil, 2015)

Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermatophytes
Classe :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Dilleniidea
Ordre :	Ericales
Famille :	Ericaceae
Genre :	<i>Arbutus</i>
Espèce :	<i>Arbutus unedo</i> L.

2.4. Constituants

L'arbousier commun contient 2,7 % d'arbutine, de la méthylarbutine et d'autres hydroquinones, un principe amer et des tanins. L'arbutine est un puissant antiseptique de l'appareil urinaire (Iserin, 2001).

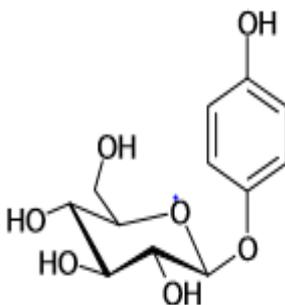


Figure 8 : formule chimique de l'arbutine (Ghedira et Goetz, 2013).

3. Propriétés et usages :

L'arbousier commun a des propriétés astringentes efficaces en cas de diarrhée et de dysentérie, et antiseptiques, pour soigner cystite et urétrite. En gargarisme, il soulage les maux de gorge (Iserin *et al.*, 2001).

Les baies de *A. unedo* sont rarement consommées comme des fruits frais, mais ont une certaine importance dans les communautés agricoles locales où elles sont utilisées pour la production de boissons alcoolisées, de confitures, de gelées et de marmelades (Alarcão-E-Silva *et al.*, 2001 ; Pallauf *et al.*, 2008). Les fruits sont utilisés dans la médecine folklorique comme antiseptiques, diurétiques et laxatifs, tandis que les feuilles ont longtemps été employées comme agents antiseptiques urinaires astringents, diurétiques et plus récemment, dans la thérapie de l'hypertension et du diabète (Bnouham *et al.*, 2007).

En décoction, sa racine est utilisée contre l'hypertension. On lui attribue des propriétés anti-inflammatoires ; il est également efficace contre les **rhumatismes**. La capacité anti-oxydante d'*A.unedo* est également connue, et l'activité antimicrobienne a également été signalée. Plusieurs composés présents dans les différentes parties de la plante peuvent être liés à ces propriétés. Inclus dans ce sont les caroténoïdes, les flavonoïdes, les acides phénoliques et des vitamines (C et E) (Oliveira *et al.*, 2001).

Attention : Le fruit est déconseillé pendant la grossesse et en cas d'affection rénale (Iserin *et al.*, 2001).

Deuxième partie

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Objectif

L'objectif de notre travail est l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait hydroéthanolique des racines de *Arbutus unedo* L. in vitro en utilisant trois méthodes différentes : la réduction du fer FRAP, le piégeage du radical libre DPPH et le test de blanchissement du β -carotène.

2. Matériel végétale

Les racines de *Arbutus unedo* ont été récoltées le mois de Janvier 2017 dans le village de Tizi commune de Ain Fezza wilaya de Tlemcen. Ensuite, elles sont séchées à une température ambiante et à l'abri de la lumière. Après le séchage, les racines sont broyées à l'aide d'un mortier.

3. L'extraction :

Dans un premier temps, un extrait brut eau-éthanol à été préparé. Ce dernier subit une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle.

3.1 Préparation de l'extrait eau/éthanol:

40g de la poudre de la plante sont mise en contact avec 400 ml du mélange eau/éthanol (30/70, V/V). Après 30min de décoction sous reflux, le mélange est filtré sur papier filtre. Puis, le filtrat est concentré au rota vapeur une partie de ce filtrat est séchée dans des boites de pétrie en verre à 50°C ; le résidu est conservé dans des tubes en verre (sous forme de poudre). La deuxième partie est mise à une série d'extraction liquide –liquide.

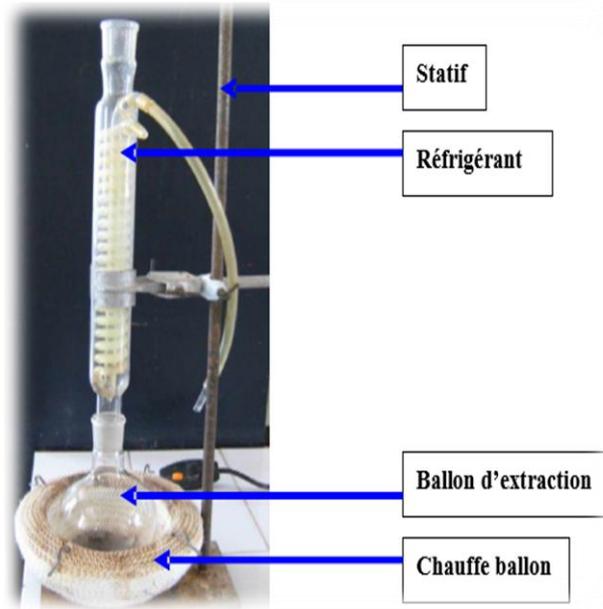


Figure 9: Montage d'extraction sous-reflux

3-2 Extraction liquide-liquide :

L'extrait eau-éthanol probablement préparé, subit une série d'extraction liquide-liquide. Le solvant utilisé est l'acétate d'éthyle. L'extraction se fait en ajoutant V/V à l'extrait eau-éthanol. Deux phases sont formées, aqueuse séchée à 50°C et organique évaporé au rota - vapeur.

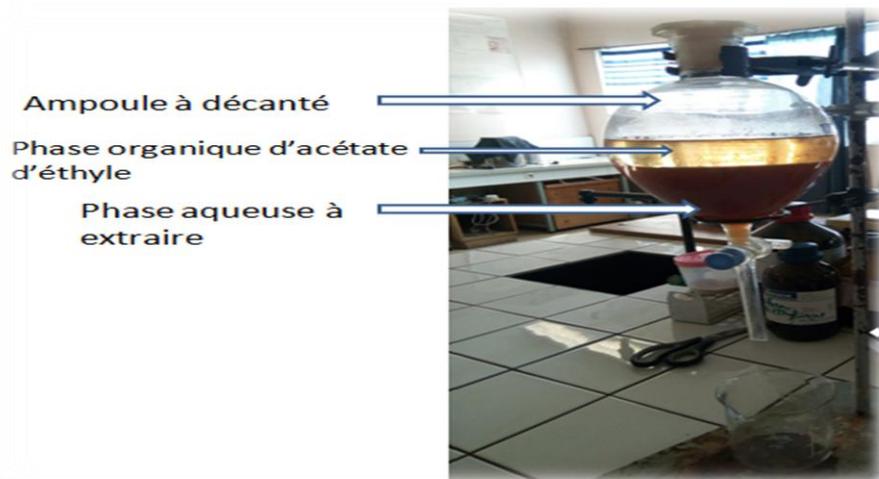


Figure 11 : Montage de dispositif d'extraction liquide –liquide

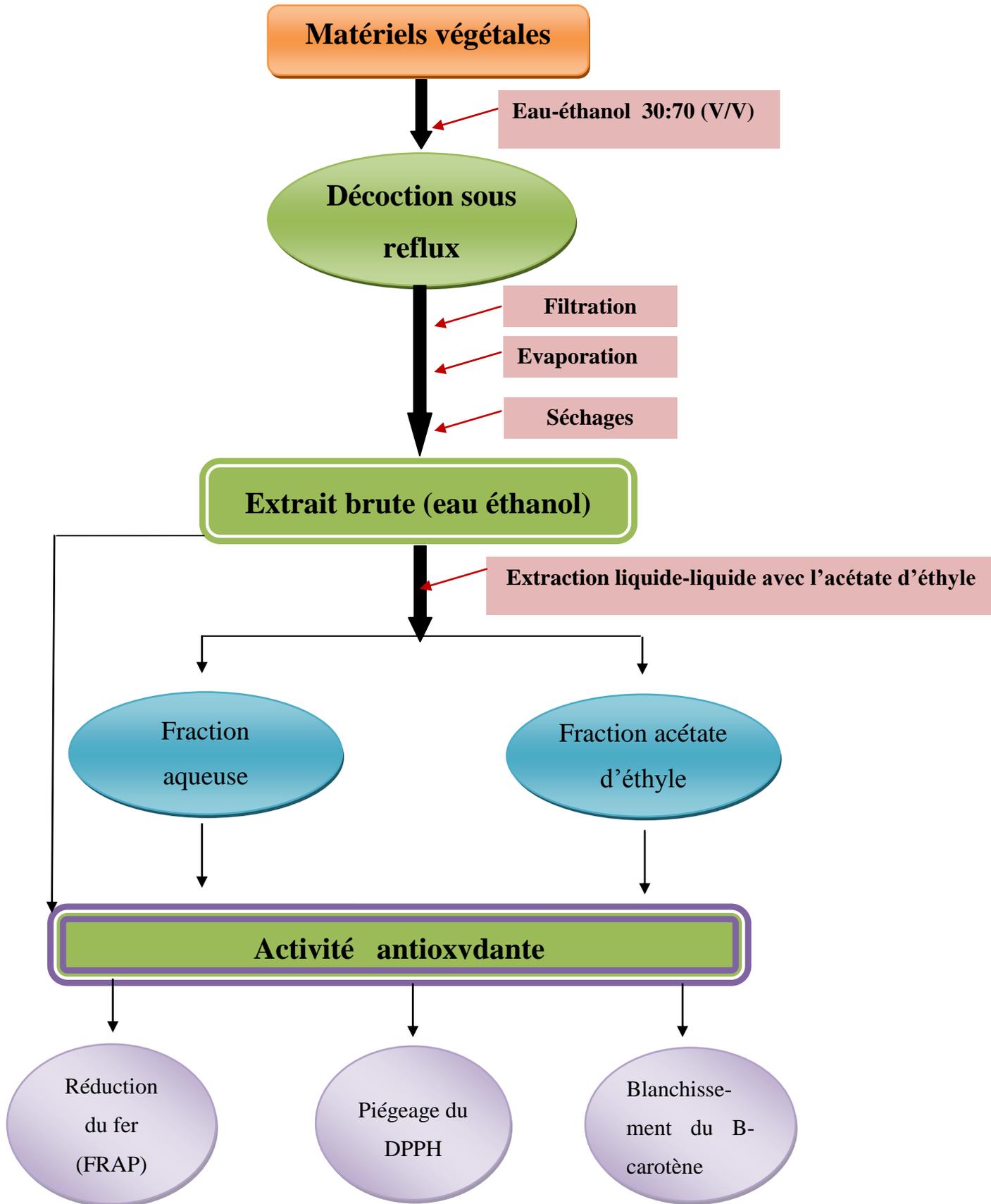


Figure 12: protocole expérimentale de l'évaluation de l'activité antioxydante

4-Etude de l'activité antioxydant et anti radicalaire des extraits :

4.1. Piégeage du radical libre DPPH :

Le DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-williams *et al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote.

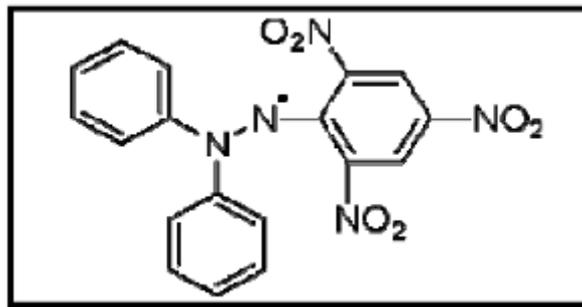


Figure13 : Structure chimique du radical libre DPPH.

❖ Principe :

Le DPPH[•] (2,2-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le DPPH[•] est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (Parejo *et al.*, 2002).

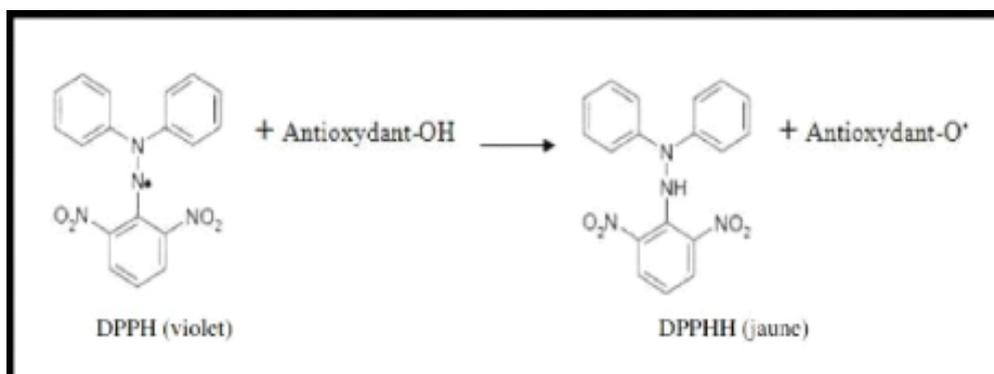


Figure 14 : Piégeage du radical libre DPPH[•] (Congo, 2012)

❖ **Mode opératoire :**

1ml de solution méthanolique de DPPH (0.012g/100ml) est ajouté à 1ml de la solution d'extraits à différentes concentrations (0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; 0,1mg/ml), le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes.

✓ Le blanc est représenté par le méthanol, Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH et 1 ml de méthanol, Le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard: l'acide ascorbique.

❖ **Calcul des pourcentages d'inhibitions :**

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition du DPPH par la formule suivante :

$$I \% = ((A_c - A_t) / A_c) \times 100$$

A_c : absorbance du contrôle négatif

A_t : absorbance du test effectué

❖ **Calcul des concentrations efficaces IC50 :**

La IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH[•]. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des droites tracées ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées. Plus IC50 est petites, plus l'antioxydant a une activité plus importante. (Sanchez *et al.*, 1998).

4.2- Test de la réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)

❖ **Principe :**

Le pouvoir réducteur du fer (Fe³⁺) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par (Oyaiz ,1986). La méthode de la réduction du fer est basée sur la capacité des

antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) (Ou *et al.*, 2001) .

❖ Mode opératoire :

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 mg/ml) est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Un aliquote (2,5ml) de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 (Chlorure ferrique) à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). L'acide ascorbique et l'acide gallique sont utilisés comme témoins positifs dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions et les mêmes concentrations que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Oyaiz ,1986).

4.3. Test de blanchissement du β -carotène

❖ Principe :

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (Laguerre *et al.*, 2007).

❖ Mode opératoire :

Une quantité de 2 mg de β -carotène est solubilisée dans 10 ml de chloroforme. On prélève 1 ml de cette solution dans un bécher contenant préalablement 200 mg de Tween 40 et 20 mg d'acide linoléique. Après évaporation, un volume de 50 ml d'eau saturée en oxygène est ajouté. Dans des tubes, 4ml de l'émulsion β -carotène/acide linoléique sont additionnée à 100 μl de la solution de l'extrait ou de l'antioxydant de synthèse BHT à différentes

concentrations. Les tubes sont placés dans un bain marie à 50°C pendant 120 min. Ensuite, l'absorbance de chaque extrait est mesurée à 470 nm à t = 120 min. Le control négatif est constitué par 100 µl d'éthanol au lieu de l'extrait où de l'antioxydant de synthèse. Tous les essais sont répétés trois fois (Koleva *et al.*, 2002).

L'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm ce qui correspond à t = 0 min contre le blanc contenant l'émulsion sans β-carotène seulement pour le contrôle négative.

L'activité antioxydante (%) des extraits est évaluée en termes de blanchiment de β-carotène en employant la formule suivante :

$$\% = ((A_{A(120)} - A_{c(120)}) / (A_{c(0)} - A_{(120)})) \times 100$$

A_{A(120)}: représente l'absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 120 min.

A_{C(0)}: représente l'absorbance du contrôle à 120 min.

A_{C(120)} : représente l'absorbance du contrôle à 0 min

Résultats et interprétation

1. Evaluation de l'activité antioxydante :

1.1 .Piégeage du radical libre DPPH :

L'activité antiradicalaire exprime la capacité de réduction des radicaux libres .Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicalaire libre et la simplicité de l'analyse (Bozin *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits.

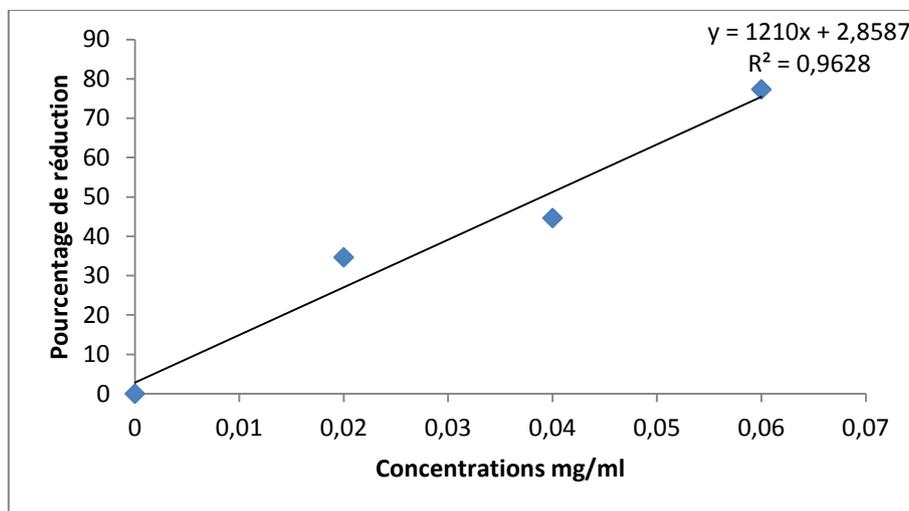


Figure15 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydro-éthanolique.

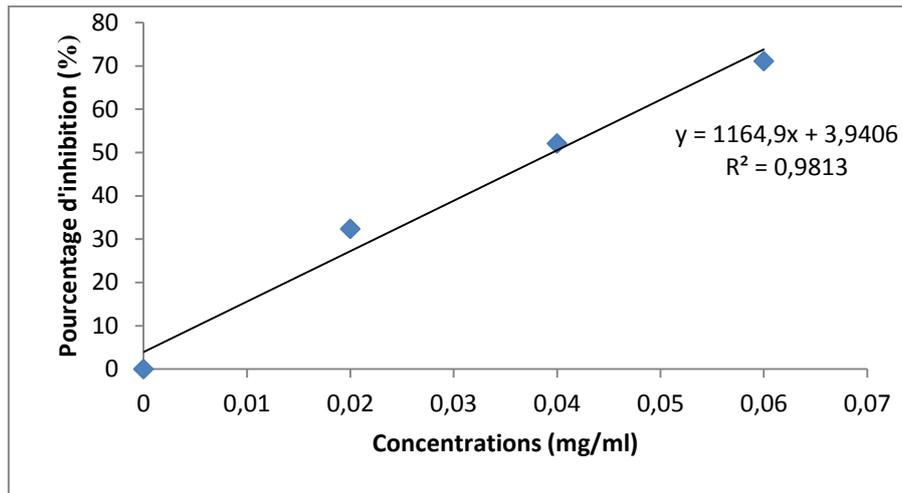


Figure16 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de la fraction aqueuse.

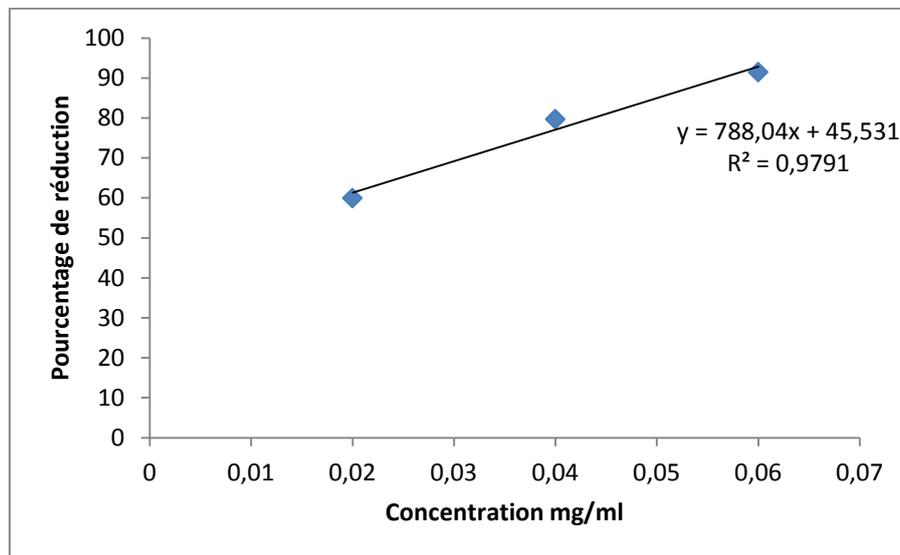


Figure 17 : Pourcentages de réduction du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle.

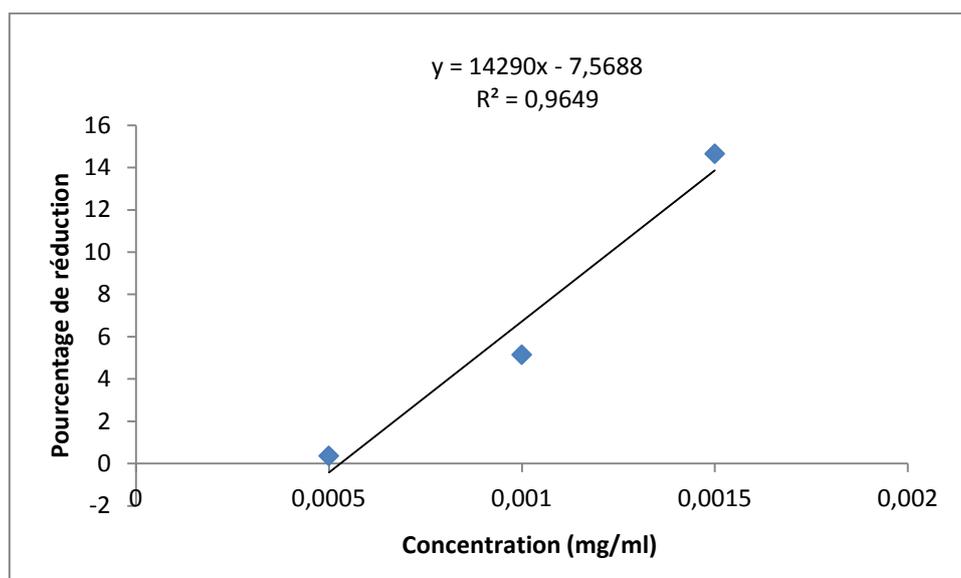


Figure18 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.

Les pourcentages de réduction sont proportionnels à la concentration de l'extrait. La fraction acétate d'éthyle a montré l'activité la plus élevée par rapport à l'extrait hydroéthanolique et la fraction aqueuse. Pour 0,06 mg/ml, la fraction d'acétate d'éthyle a atteint un pourcentage d'inhibition de 92,81%. A cette même concentration, l'extrait hydroéthanolique produit un pourcentage d'inhibition de 75,45 %, alors que la fraction aqueuse a présenté le plus faible pourcentage d'inhibition de 73,83 % .

L'acide ascorbique a présenté la meilleure activité antioxydante par rapport aux extraits des racines de l'*Arbutus unedo*, où la concentration de 0,0015 mg/ml a produit un pourcentage d'inhibition de 14,65 %.

Afin de comparer l'efficacité de nos extraits, nous avons déterminé la concentration IC_{50} qui réduit 50% du DPPH et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Valeurs des IC_{50} des extraits d'*Arbutus unedo*.L

	Extraits hydro-éthanolique	Fraction acétate d'éthyle	fraction aqueuse	Acide ascorbique
IC_{50} exprimée en mg/ml	0,038	0,005	0,039	0,004

D'après les valeurs obtenues, la fraction acétate d'éthyle présente une IC₅₀ inférieure à ceux de l'extrait hydro-éthanolique et la fraction aqueuse, et donc une activité meilleure.

Les IC₅₀ obtenu pour l'acide ascorbique, utilisé comme molécule de référence, est bien plus inférieur à ceux des extraits, est donc, l'acide ascorbique possède une activité antioxydante très élevée. Cependant, on peut remarquer que IC₅₀ de l'acide ascorbique est très proche de celle de la fraction acétate d'éthyle, ce qui donne à cette dernière un puissant effet antioxydant.

1.2. Réductions du fer FRAP :

L'activité antioxydante de nos extraits a été aussi évaluée par la méthode de FRAP, qui est une méthode simple rapide et reproductible. Cette méthode est basée sur la capacité des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺).

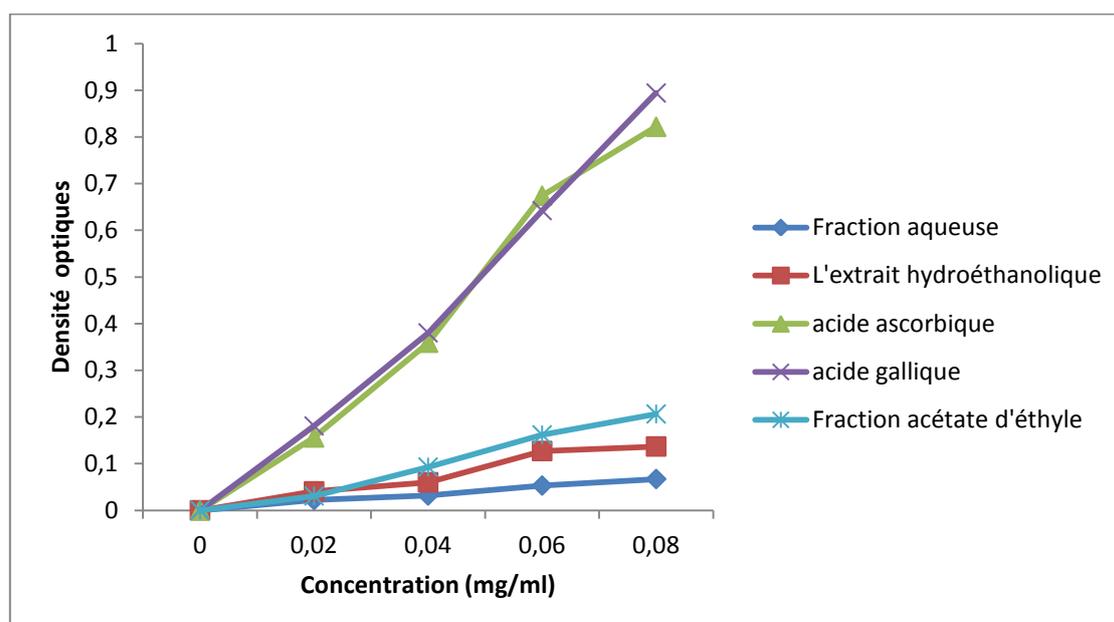


Figure 19 : Pouvoir réducteur du fer de l'extrait hydroéthanolique et ses fractions.

D'après les graphes nous constatons que la fraction acétate d'éthyle a présenté le plus d'activité pour réduire le fer suivi de l'extrait hydroéthanolique alors que la fraction aqueuse a présenté le pouvoir réducteur le plus faible.

Les acides ascorbique et gallique sont employés dans cette méthode comme un contrôle positif, ont montré un pouvoir réducteur plus élevé en utilisant les mêmes concentrations.

Nous remarquons aussi, que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle avec l'augmentation de la concentration des extraits des racines de *l'A.unedo*.

1.3. Test de blanchissement du β -carotène :

Dans le test de blanchissement du β -carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres due à l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylène de l'acide linoléique. Puis le radical libre va oxyder le bêta carotène hautement insaturé. la présence d'un antioxydants dans l'extrait permet de minimiser l'oxydation du bêta carotène par les hydro-peroxyde qui sont neutralisées (Popovici *et al.*, 2009).

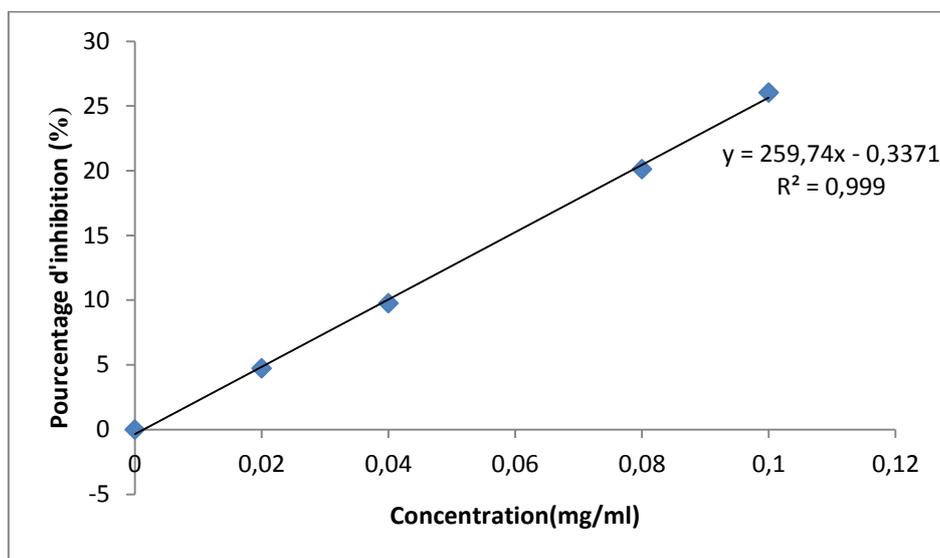


Figure 20 : Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β -carotène en fonction des différentes concentrations de l'extrait hydroéthanolique.

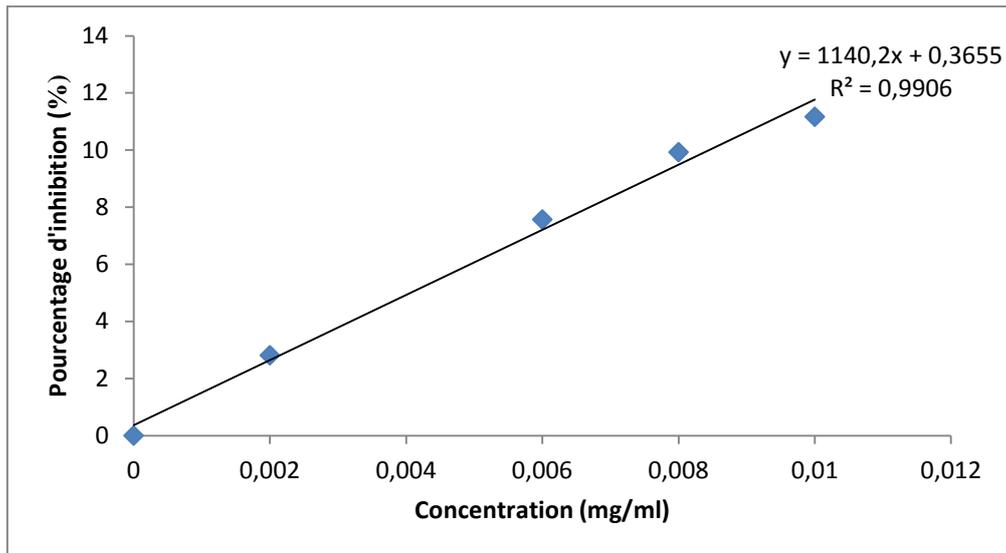


Figure 21 : Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β -carotène en fonction des différentes concentrations de la fraction acétate d'éthyle.

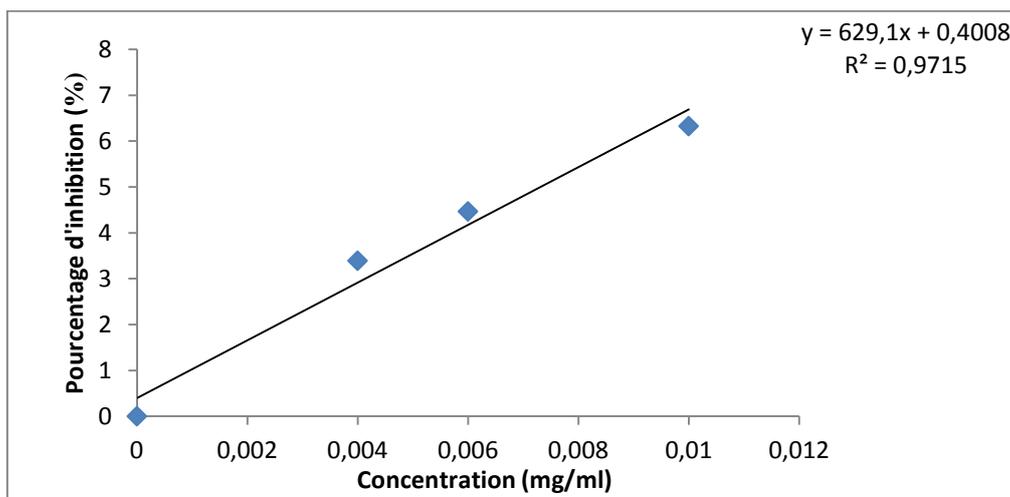


Figure 22 : Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β -carotène en fonction des différentes concentrations de la fraction aqueuse

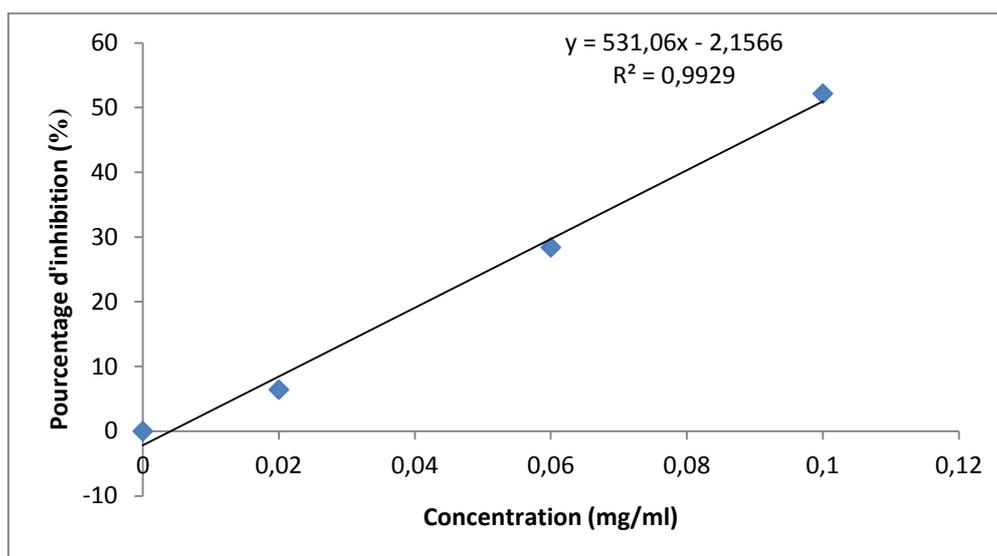


Figure 23 : Pourcentages d'inhibition de blanchissement du β-carotène en fonction des différentes concentrations de BHT.

D'après les figures, le pourcentage d'inhibition de l'oxydation du β-carotène est proportionnel à la concentration. Tous les extraits des plantes inhibent le blanchiment du β-carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libres.

La fraction acétate d'éthyle a atteint un pourcentage d'inhibition de 11,16% à 0,01 mg/ml. À cette même concentration, la fraction aqueuse produit un pourcentage d'inhibition de 6,32%. Pour l'extrait hydro-éthanolique à cette concentration, il reste trop faible.

L'inhibition par le BHT à 0,01 mg/ml a atteint un pourcentage d'inhibition de 3,15%, ce qui montre que la fraction acétate d'éthyle et la fraction aqueuse sont plus efficaces que le BHT, chose confirmée par les valeurs des IC_{50} .

Tableau 2 : valeur des IC_{50} des extraits d'*Arbutus uned .L* :

Extrait	L'extrait hydro-éthanolique	Fraction aqueuse	Fraction acétate d'éthyle	BHT
IC₅₀ (mg/ml)	0,19	0,078	0,04	0,09

L'inhibition la plus élevée a été fournie par la fraction acétate d'éthyle suivie par la fraction aqueuse et en dernier lieu par BHT et l'extrait hydro-éthanolique.

Discussion

Les plantes médicinales sont considérées comme une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules. De ce fait, L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale.

La présente étude est consacrée à la recherche d'éventuels effets antioxydant de l'extraits : eau/éthanol de *l'Arbutus unedo* et ses fractions aqueuse et acétate d'éthyl.

Afin de mettre en évidence l'effet antioxydant des extraits de *l'Arbutus unedo*, nous avons utilisé trois tests : test au DPPH, réduction de fer (FRAP) et le blanchissement du β -carotène.

D'après les résultats obtenus, les extraits étudiés présentent un pouvoir antiradicalaire puissant vis -à-vis le radicale DPPH.

Les IC₅₀ trouvées sont 0,038 ; 0,005 ; 0,039 mg/ml respectivement pour l'extrait eau-éthanol, fraction acétate d'éthyle et la fraction aqueuse. Cette différence pourrait être attribuée aux divers composés extraits par les solvants de polarité différente.

Selon Mrabti *et al.*, (2017) les IC₅₀ des extraits aqueux des racines et des feuilles sont de l'ordre de 0,004 mg/ml et 0,007 mg/ml .

D'après Oliveria *et al.*, (2009) , les feuilles d'*Arbutus unedo* ont produits une IC₅₀ de 0,007 ; 0,099 ; 0,063 mg/ml respectivement pour l'extrait aqueux ,l'extraits méthanolique et l'extrait éthanolique en piégeant le radical DPPH. Cela permet de conclure que nos extraits sont plus efficaces.

Le dépistage phytochimique des racines d' *A. unedo* réalisé par Dib *et al.*,(2013) révélé la présence de quinones, des composés anthraquinones, des anthocyanines, des tanins et des flavonoïdes. L'analyse quantitative a montré que les racines étaient fortement dominées par les composés anthocyanines (3,65 mg/g) suivis par les flavonoïdes totaux (0,56 mg/g) et des flavones et des flavonols (0,17 mg/g).

Pallauf *et al.*, (2008) ont trouvé que Le fruit de l'Arbousier peut être une bonne source d'antioxydants. Il contient une grande teneur en flavonoïdes estimé à 32,37 mg/100g de fruits consommés, et autre ce groupe de composés antioxydants. Les proanthocyanidines sont aussi très abondants, représentant plus de 80% des flavonoïdes totaux.

Par ailleurs l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits par la technique de réduction de fer FRAP, montre que la capacité réductrice de la fraction d'acétate d'éthyle est plus élevée que l'extrait hydroéthanolique et la fraction aqueuse avec des densités optique de 0,2 ; 0,13 ; 0,06 respectivement à la concentration de 0,08 mg/ml. Ces résultats démontrent que les extraits d'*A.unedo* ont marqué la capacité de réduire les ions ferrique Fe^{3+} .

Oliveria *et al.*, (2009) , ont trouvé que la capacité réductrice de l'extrait éthanolique est plus élevée que l'extrait aqueux et méthanolique des feuilles d'*Arbutus unedo*.

Selon Djabou *et al.*, (2013) les résultats de la méthode de FRAP a montré que l'extrait d'acéate d'éthyle des racines de l'*Arbutus unedo* présente un pouvoir réducteur le plus élevé.

Concernant le blanchissement du β -carotène, les extraits de la plante inhibent le blanchiment du β -carotène à différentes valeurs.

La plante présente une très bonne activité avec des IC_{50} de l'ordre de 0,19mg/ml pour l'extrait eau-éthanol et 0,078 mg/ml pour la fraction aqueuse et 0,04 mg/ml pour la fraction acétate d'éthyle. Ces deux fractions possèdent une meilleure capacité d'inhiber le blanchissement du β -carotène que l'extrait hydro-éthanolique.

Selon Liyana-Pathirana et Shahidi, (2006), un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire.

D'après Barros *et al.*, (2010), les fruits de l'*Arbutus unedo* par le test de blanchissement du bêta carotène a produits une IC_{50} de 0,77 mg/ml pour l'extrait méthanolique. En comparant ce résultat avec le notre, les racines restent plus efficaces que les fruits.

En résumant ces informations, il ressort, donc, que l'Arbousier est une plante qui possède un pouvoir antioxydant très remarquable surtout la partie racinaire.

Les racines d'arbousier sont très riches en composés, tanins, flavonoïdes, saponosides, acides aminés et en alcaloïdes (Medjdoub *et al.*, 2014) .

Les effets trouvés sont dus, probablement, aux composés phénoliques, surtout aux flavonoïdes. Le présent travail est, donc, très intéressant et mérite d'être poursuivi par d'autres études ultérieures.

Conclusion Générale

Dans notre étude, nous avons évalué l'activité antioxydante des racines de l'*Arbutus unedo* de la famille des Ericaceae, est une plante très fréquente en Algérie et largement utilisé dans la médecine traditionnelle. Ces racines sont récoltées de Tizi (Ain Fezza), wilaya de Tlemcen.

L'activité antioxydante de l'*Arbutus unedo* a été évaluée par trois techniques : le piégeage du radical libre DPPH, la réduction du fer (FRAP) et le blanchissement du β -carotène.

Pour la première technique, les résultats révèlent que la fraction acétate d'éthyle présente l'activité la plus élevée avec une IC_{50} de 0,005 mg/ml suivie de l'extrait hydro-éthanolique avec une IC_{50} de 0,038 mg/ml et enfin la fraction aqueuse avec une IC_{50} de 0,039 mg/ml.

Concernant la technique de réduction du fer (FRAP), les résultats montrent que tous les extraits ont une capacité à réduire le fer qui augmente en fonction de la concentration dont on remarque que la fraction acétate d'éthyle a une activité plus élevée par rapport à l'extrait hydro-éthanolique et la fraction aqueuse.

Pour le blanchissement du β -carotène, l'inhibition la plus élevée a été enregistrée pour la fraction acétate d'éthyle ($IC_{50} = 0,04$ mg/ml) suivi par la fraction aqueuse ($IC_{50} = 0,078$ mg/ml) et l'extrait hydro-éthanolique ($IC_{50} = 0,19$ mg/ml). Ces résultats restent meilleurs par rapport au BHT ($IC_{50} = 0,09$ mg/ml) à l'exception de l'extrait hydroéthanolique.

Les résultats obtenus dans cette étude, montrent la richesse des racines de l'*Arbutus unedo* d'un pouvoir antioxydant remarquable qui pourrait représenter une nouvelle source potentielle de molécules bioactives.

L'isolement et l'identification de la ou les molécules bioactives responsables de cette activité et l'évaluation d'autres activités comme : anticancéreuses, antidiabétiques, antimicrobiennes restent parmi les perspectives les plus importantes.

Références

Bibliographique

- ✚ Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 2007 ; 74(4), 324-329.
- ✚ Ahamet S. Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae). Thèse Pharmacie.2013, Bamako; 117
- ✚ Aksil, T. *Caractérisation physico-chimique du fruit de l'arbousier (Arbutus unedoL.) du nord Algérien et de la datte (Phoenix dactylifera L.) du nord Algérien et de la datte (Phoenix dactylifera L ,2015* (Doctoral dissertation).
- ✚ Alarcao-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G., & Leitão, M. C. A. The arbutus berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*.2001 ; 14(1), 27-35.
- ✚ Atkin, M. A., Gasper, A., Ullegaddi, R., & Powers, H. J. Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma: response to antioxidants in vitro and to antioxidant supplementation. *Clinical chemistry* .2005 ; 51(11), 2138-2144.
- ✚ Barouki, R. Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences*.2006 ; 22(3), 266-272.
- ✚ Barouki, R., & Morel, Y. Stress oxydant et expression des gènes. *Journal de la Société de Biologie*.2001 ; 195 (4), 377-382.
- ✚ Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*.2010 ; 120 (1), 247-254.
- ✚ Beloued, A. Plantes médicinales d'Algérie. *Offices des publications universitaires*, 2005.
- ✚ Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Legssyer, A., Mekhfi, H., Maâllem, S., & Ziyat, A. Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*.2007 ; 62(8), 630-632.
- ✚ Bonnefont-Rousselot, D., & Collin, F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*.2010 ; 278(1), 55-67. Bouhadjera Keltoum; 2005. contribution a l'étude chimique et biologique de deux plantemédicinales sahariennes .*Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Diplome de doctorat chimie organique appliquée.
- ✚ Boullard, B. Plantes médicinales du monde: croyances et réalités. *De Boeck Secundair*, 2001.

- ✚ Brenneisen, P., Steinbrenner, H., & Sies, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular aspects of medicine*.2005 ; 26 (4), 256-267.
- ✚ Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr, F. J., & Krause, K. H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*. 2012 ; 142, w13659.
- ✚ Bruneton, J. Pharmacognosie, phytochimie. plantes médicinales (4e éd.) ,2009.
- ✚ Burk, R. F. Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutrition in clinical Care*. 2002 ; 5(2), 75-79.
- ✚ Cao X, Antonyuk SV, Seetharaman SV, Whitson LJ, Taylor AB, Holloway SP, *et al*. Structures of the G85R variant of SOD1 in familial amyotrophic lateral sclerosis . *J Biol Chem* .2008 ; 283:16169-77.
- ✚ Carine Massaux. Polyphénols : des alliés pour la santé .2012 ; n°149.
- ✚ Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, *et al*. Les espèces actives de l'oxygène. le yin et le yang de la mitochondrie. *Med Sci (Paris)*. 2006 ; 22 : 47-53.
- ✚ Celikel, G., Demirsoy, L., & Demirsoy, H. The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*. 2008 ; 118 (2), 115-119.)
- ✚ Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 1998 ; 38(6), 421-464.
- ✚ Collard. J. Les systèmes de défense antioxydants. 2006; 61 (5) ,464-470.
- ✚ Delattre, J.; Beaudeau, J.-L.; Bonnefort-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologiques et pathologiques. *Tec & Doc Lavoisier: Londres - Paris - New York, 2005*.
- ✚ Diallo A., 2005. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygium guineense* WILLD(MYRTACEAE). Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako.
- ✚ Dib, M. E. A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N., & Tabti, B. (2013). Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *Journal of Saudi Chemical Society*.2013 ; 17(4), 381-385.
- ✚ Djabou, N., Dib, M. E. A., Allali, H., Benderb, A., Kamal, M. A., Ghalem, S., & Tabti, B. . Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the phenolic composition of Algerian *Arbutus unedo* L. roots. *Pharmacognosy Journal*.2013 ; 5(6), 275-280.
- ✚ Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* .2002 ; 82 : 47-95.

- ✚ Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect.* 2001; 109: 69-75.
- ✚ Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, et al .Medicinal plants in therapy. *Bull World Health Organ.* 1985; 63: 965-81.
- ✚ Favier, A. Le stress oxydant. *L'actualité chimique.* 2003; 108.
- ✚ Favier, A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises.* 2006; 64 (6), 390-396.
- ✚ Fazel Nabavi, S., M Dean, O., Turner, A., Sureda, A., Daglia, M., & Mohammad Nabavi, S. Oxidative stress and post-stroke depression: possible therapeutic role of polyphenols. *Current medicinal chemistry.*2015 ; 22(3), 343-351.
- ✚ Gardès-Albert M, Jore D. Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. In : Delattre JB, Bonnefont-Rousselot D, eds. *Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques.* Paris : Lavoisier. 2005 ; 1–23
- ✚ Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique.*2003 ; 91.
- ✚ Ghedira, K. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.*2005 ; 3(4), 162-169.
- ✚ Ghedira, K., & Goetz, P. Bruyère commune: *Calluna vulgaris* (L.) Hull. ou *Calluna vulgaris* Salisb.(Ericaceae). *Phytothérapie.*2013 ; 11(1), 52-55.
- ✚ Gille, G., & Sigler, K. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiologica.*1995 ; 40 (2), 131-152.
- ✚ Gomes, F., & Canhoto, J. M. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.* 2009 ; 45(1), 72-82.
- ✚ Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege.* 2007 ; 62(10) , 628-38.
- ✚ Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics.*1990 ; 280 (1), 1-8.
- ✚ Halliwell, B., & Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *British journal of pharmacology .*2004 ; 142(2), 231-255.
- ✚ Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry.*2002 ; 13(10), 572-584.

- ✚ Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*.2004; 2(1), 3-6.
- ✚ Herrera, E., & Barbas, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of physiology and biochemistry*.2001; 57(1), 43-56.
- ✚ Huang C-H, Chen H-W, Tsai M-S, Hsu C-Y, Peng R-H, Wang T-D, et al. Antiapoptotic Cardioprotective Effect of Hypothermia Treatment Against Oxidative Stress Injuries. *Acad Emerg Med*. 2009; 16 (9):872-80.
- ✚ Iserin, P., Masson, M., & Restillini, J. P. (2001). Larousse des plantes médicinales.
- ✚ Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Lavoisier
- ✚ Kahl, R. Synthetic antioxidants: biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens. *Toxicology*. 1984 ; 33(3-4), 185-228.
- ✚ Ko, T. P., Safo, M. K., Musayev, F. N., Di Salvo, M. L., Wang, C., Wu, S. H., & Abraham, D. J. Structure of human erythrocyte catalase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2000; 56(2), 241-245.
- ✚ Koechlin RC. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutr Clin Métabol*. 2006 ; 20:165–77
- ✚ Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis*, 2002; 13(1), 8-17.
- ✚ Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*.2003; 64(5), 923-933.
- ✚ Krinsky N. caroténoids asantioxydants.*Nutrition*. 2001 ; 17 :815-817
- ✚ Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* .1992; 200:248-54.
- ✚ Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P.Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progression in Lipid Research*. 2007 ; 46 (5):244- 82.
- ✚ Larauche, M., Anton, P. M., Garcia-Villar, R., Theodorou, V., Frexinós, J., Buéno, L., & Fioramonti, J. Protective effect of dietary nitrate on experimental gastritis in rats. *British Journal of Nutrition*.2003 ; 89(06), 777-786.
- ✚ Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002 ; 32 : 790-796.

- ✚ Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*. 2010 ; 4(8), 118.
- ✚ Lundebye, A. K., Hove, H., Måge, A., Bohne, V. J. B., & Hamre, K. Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and commercially farmed fish. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2010 ; 27 (12), 1652-1657.
- ✚ Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR Presses polytechniques.
- ✚ Manian R, Anusuya N, Siddhuraju P, Manian S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O.Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry* .2008 ; 107: 1000–7.
- ✚ Mates, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*.2000 ; 153(1), 83-104.
- ✚ Matés, J. M., & Sánchez-Jiménez, F. M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*.2000 ; 32 (2), 157-170.
- ✚ Medjdoub,H., Selles,C., Tabti, B. Preliminary phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. and antihyperglycemic effect of the root aqueous extract on streptozotocininduced diabetic Wistar rats .*Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*.2014;6(11):195-1
- ✚ Mpondo, E. M., Yinyang, J., & Dibong, S. D. Valorisation des plantes médicinales à coumarines des marchés de Douala Est (Cameroun). *Journal of Applied Biosciences*.2015 ; 85 (1), 7804-7823.
- ✚ Mrabti, H. N., Marmouzi, I., Sayah, K., Chemlal, L., El Ouadi, Y., Elmsellem, H., ... & Faouzi, M. A. *Arbutus unedo* L aqueous extract is associated with in vitro and in vivo antioxidant activity. *Journal of materials and Environmental Sciences*.2017 ; 8(1), 217-224.
- ✚ Nève, J. Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*.2002 ; 16 (4), 292-300.
- ✚ Nève, J. Selenium as a nutraceutical : how to conciliate physiological and supra-nutritional effects for an essential trace element. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*.2002 ; 5(6), 659-663.

- ✚ Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*.2001 ; 74(4), 418-425.
- ✚ Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*. 2011 ; 44 (5), 1401-1407.
- ✚ Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J. A., & Baptista, P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology*.2009 ; 47 (7), 1507-1511.
- ✚ Ozcan, T., Akpinar-Bayazit, A., Yilmaz-Ersan, L., & Delikanli, B. Phenolics in human health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*.2014 ; 5(5), 393.
- ✚ Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., ... & Levine, M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*.2003 ; 22(1), 18-35.
- ✚ Palé, E., Hema, A., Duez, P., Luhmer, M., & Nacro, M. (2007). Modification de la polarité d'un composé anthocyanique de *Ipomoea asarifolia*: Détermination de la structure et de l'activité antioxydante. In *10èmes Journées Scientifiques de la Société Ouest Africaine de Chimie (SOA CHIM)*.
- ✚ Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J. C., Del Castillo, M. D., Cano, M. P., & de Pascual-Teresa, S. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*.2008 ; 21(4), 273-281.
- ✚ Paschalis, V., Theodorou, A. A., Kyparos, A., Dipla, K., Zafeiridis, A., Panayiotou, G., ... & Nikolaidis, M. G. Low vitamin C values are linked with decreased physical performance and increased oxidative stress: reversal by vitamin C supplementation. *European journal of nutrition*. 2016 ; 55(1), 45-53.
- ✚ Pincemail, J., Heusele, C., Bonté, F., Limet, R., & Defraigne, J. O. Stress oxydant, antioxydants nutritionnels et vieillissement. *Act Med Int*. 2001 ; 4, 18-23.
- ✚ Pincemail, J., Le Goff, C., Charlier, C., Gillion, P., Cheramy-Bien, J. P., Van Honacker, E., ..& Defraigne,J.O. Evaluation biologique du stress oxydant. Application en routine Clinique. *Nutr. Endocrinol*. 2009 ; 16-31.
- ✚ Poli, G.; Leonarduzzi, G.; Biasi, F.; Chiarpotto, E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med Chem* .2004 ; 11, 1163–1182.

- ✚ Rayman, M. P. The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*.2002 ; 61(02), 203-215.
- ✚ Reille, M. Angiospermes Arbres et arbustes feuillus leurs fleurs et leurs fruits, 2015, Ulmer, Paris.
- ✚ Roberfroid, M. B. Aliments fonctionnels: définitions, concepts et stratégies. *Aliments Fonctionnels, seconde édition. Paris: Lavoisier*.2008 ; 53-72.
- ✚ Roussel, A. M., & Hininger-Favier, I. Éléments-trace essentiels en nutrition humaine: chrome, sélénium, zinc et fer. *Endocr. Nutr*.2009 ; 10, 359-10.
- ✚ Saremi, A., & Arora, R. Vitamin E and cardiovascular disease. *American journal of therapeutics*.2010 ; 17(3), e56-e65.
- ✚ Sarni-Manchad, P., & Cheynier, V. Les polyphénols en agroalimentaire, *Éd Tec & Doc. Coll. Sci. & Techn. Agroaliment .Lavoisier. Paris. 2006*.
- ✚ Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C, & Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*.2005 ; 45(4), 287-306.
- ✚ Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, Arnold K. Contribution of Reactive Oxygen Species to Cartilage Degradation in Rheumatic Diseases: Molecular Pathways, Diagnosis and Potential Therapeutic Strategies. *Curr Med Chem*. 2003 ; 10(20):2123-45.
- ✚ Sen, C. K., Khanna, S., & Roy, S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life sciences*. 2006 ; 78(18), 2088-2098.
- ✚ Sereme, A., Milogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., & Nacro, M. Propriétés thérapeutiques des plantes a tanins du Burkina Faso. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*.2011 ; 15.
- ✚ Sohal, R. S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*.2002 ; 33 (1), 37-44.
- ✚ Sorg, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes rendus biologies*. 2004 ; 327(7), 649-662.
- ✚ Stamford, N. P. Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. *Journal of cosmetic dermatology*.2012 ; 11 (4), 310-317.
- ✚ Stefanis L, Burke RE, Greene LA. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol* 1997;10:299-305.
- ✚ Tarascou, I. (2005). *Synthèse et caractérisation de procyanidines oligomères pour l'identification de tanins du raisin et du vin* (Doctoral dissertation, Bordeaux 1).

- ✚ Traber, M. G., & Atkinson, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*.2007 ; 43(1), 4-15.
- ✚ Tremellen, K. Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. *Human reproduction update*. 2008 ; 14(3), 243-258.
- ✚ Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007 ; 39 (1), 44-84.
- ✚ Van Antwerpen, P., & Neve, J. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: ciblage du système myéloperoxydase/péroxyde d'hydrogène/chlorure. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutique.
- ✚ Vitam Horm .ascorbic acid biosynthesis .*Smirnoff N. L* .2001; 61 : 241-66.
- ✚ Zago, M. P., & Oteiza, P. I. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*.2001 ; 31(2), 266-274.

Résumé

Notre travail porte sur l'étude de l'activité antioxydante d'une plante médicinale *Arbutus unedo* de la famille des Ericaceae, largement rependu dans la région de Tlemcen.

L'activité antioxydante de l'*Arbutus unedo* a été évaluée par le test de DPPH, réduction du fer (FRAP) et le blanchissement du β -carotène. Pour la première et la deuxième technique les résultats montrent que la fraction acétate d'éthyle présente l'activité la plus élevée suivi de l'extrait hydro-éthanolique et la fraction aqueuse.

Pour le test du blanchissement du β -carotène la fraction acétate d'éthyle a montré l'activité la plus élevée suivie par la fraction aqueuse et l'extrait hydro-éthanolique.

Pour le blanchissement du β -carotène, la plante a donné un résultat meilleur par rapport au témoin. Il ressort de cette étude que l'arbousier est doué d'un pouvoir antioxydant remarquable.

Mots clés : racine d'*Arbutus unedo*, DPPH, FRAP, blanchissement du β -carotène.

Abstract

Our work deals with the study of the antioxidant activity of a medicinal plant *Arbutus unedo* (Ericaceae), widely spread in the region of Tlemcen.

The antioxidant activity of *Arbutus unedo* was evaluated by the DPPH, iron reduction (FRAP) and bleaching of β -carotene tests. For the first and second techniques the results show that the ethyl acetate fraction exhibits the highest activity followed by the hydro-ethanolic extract and the aqueous fraction.

For the β -carotene bleaching test, the ethyl acetate fraction showed the highest activity followed by the aqueous fraction and the hydro-ethanolic extract.

In addition and for bleaching of β -carotene, the plant gave a better result compared to the control. It is clear from this study that the strawberry tree is endowed with a remarkable antioxidant power.

Key words: *Arbutus unedo* root, DPPH, FRAP, β -carotene bleaching.

ملخص

يركز عملنا على دراسة النشاط المضاد للأكسدة من النباتات الطبية قطلب أونيدو من عائلة (Ericaceae) و التي توجد على نطاق واسع في منطقة تلمسان .

تم تقييم نشاط مضادات الاكسدة في قطلب أونيدو بواسطة اختبار DPPH ، و ارجاع الحديد (FRAP) وتبييض β كاروتين. بالنسبة للاختبار الاول و الثاني تبين أن جزء خلات الإيثيل لديه النشاط العالي يليه المستخلص المائي الكحولي والجزء المائي .

بالنسبة لاختبار تبييض β كاروتين اظهر جزء خلات الإيثيل أعلى نشاط يليه الجزء المائي والمستخلص المائي-الكحولي ، وقدم النبات نتيجة أفضل مقارنة بمادة BHT. و يتضح من هذه الدراسة أن شجرة القطلب لها قوة مضادة للأكسدة ملحوظة .

كلمات البحث : جذو القطلب , DPPH , ارجاع الحديد , تبييض β كاروتين