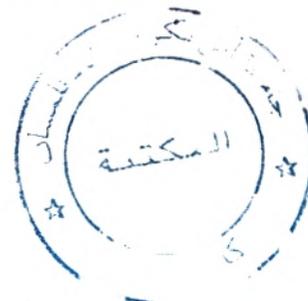


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAÏD-TLEMCEM
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE
LABORATOIRE DE RECHERCHE DE PRODUITS NATURELS, SOURCES
NUTRITIONNELLES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES

BD 3775
09/06/09



Mémoire

Pour l'Obtention de Diplôme de Magister
en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Physiopathologie Cellulaire

**Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes de l'*Arbutus unedo*
et du *Daphne gnidium* L. de la région de Tlemcen**

Présenté par : M^{elle} DIDI Amel

Soutenu le : 27-05-2009

Membre du jury :

Président	Mme. H. MERZOUK	Professeur à l'Univ. de Tlemcen
Examineurs	Mme. M. BELARBI	Professeur à l'Univ. de Tlemcen
	Mr. A. LAZOUNI	Maître de conférences à l'Univ. de Tlemcen
	Mme. N. MOKHTARI	Maître de conférences à l'Univ. de Tlemcen
Encadreur	Mme. F. ATIK-BEKKARA	Professeur à l'Univ. de Tlemcen

Année Universitaire : 2008 - 2009

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAÏD-TLEMCEEN-
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE
LABORATOIRE DE RECHERCHE DE PRODUITS NATURELS, SOURCES
NUTRITIONNELLES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES



Mémoire

Pour l'Obtention de Diplôme de Magister
en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Physiopathologie Cellulaire

**Etude de l'activité antioxydante des flavonoïdes de l'*Arbutus unedo* L.
et du *Daphne gnidium* L. de la région de Tlemcen**

Présenté par : M^{elle} DIDI Amel

Soutenu le : 27-05-2009

Membre du jury :

Président	Mme. H. MERZOUK	Professeur à l'Univ. de Tlemcen
Examineurs	Mme. M. BELARBI	Professeur à l'Univ. de Tlemcen
	Mr. A. LAZOUNI	Maître de conférences à l'Univ. de Tlemcen
	Mme. N. MOKHTARI	Maître de conférences à l'Univ. de Tlemcen
Encadreur	Mme. F. ATIK-BEKKARA	Professeur à l'Univ. de Tlemcen

Année Universitaire : 2008 - 2009

A mes parents et toute ma famille

... Pour leur amour et leur soutien

A mes amis...

et à tous ceux qui m'ont aidé pour réaliser ce travail

Remerciements

Je remercie Dieu le tous puissant qui ma aider et donner la force et la volonté
pour faire ce travail

.....

Je tiens à remercier sincèrement mon encadreur Madame le Professeur
Fouzia ATIK-BEKKARA de l'université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen
tant d'avoir accepté de m'encadrer que pour m'avoir accordé sa confiance, ainsi que pour le
temps qu'elle m'a consacré dans mon travail, et aussi pour m'avoir guidé et conseillé
tout au long de ces deux ans et demie.

Mes remerciements vont également à Madame le Professeur Hafeda MERZOUK
à l'université de Tlemcen de m'avoir honoré de présider le jury de ma soutenance.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à Madame le Professeur
M. BELARBI, Madame le Docteur N. MOKHTARI et Monsieur le Docteur
A. AZOUNI, maîtres de conférences à l'université de Tlemcen, d'avoir acceptés
d'être membre de mon jury de thèse et pour avoir acceptés d'en être examinateurs.

.....

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire des Produits Naturels,
Activités Biologiques et Synthèse de l'université de Tlemcen en collaboration avec
le laboratoire de Catalyse et Synthèse en Chimie Organique (LCSCO) de l'Université
de Tlemcen avec l'aide du Professeur Mohamed Amine DIDI. Je tiens à lui exprimer toute ma
reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son équipe, de m'avoir encouragé et conseillé tout
au long de mon travail. Et aussi pour son soutien et sa bienveillance, qu'elle soit assurée
de ma profonde gratitude.

.....

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai partagé paillasse, matériels, techniques, conseils, discussions qui ont pu orienter ma recherche, et pour leur aide précieuse pendant toute la durée de mon mémoire, dont je dois remercier tous particulièrement Abdelhamid Imed EL-HACI, Nabila BENHAMMOU, Nesrine KARAOUZAN, Fatima Zahra ABI-AYAD, Meryem ABI-AYAD et Najib RAHMOUN.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de produits naturels pour leurs aides et leurs sympathies et également à toute l'équipe du laboratoire de catalyse et Synthèse en Chimie Organique.

.....

Merci à tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est.

Résumé

Dans le cadre des études portant sur la recherche d'antioxydants naturels, la présente étude a été effectuée sur deux plantes médicinales de la région de Tlemcen : *Arbutus unedo* L. (Lenj) et *Daphne gnidium* L. (Azaz) et cela dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de leurs flavonoïdes.

L'extraction des flavonoïdes a été effectuée par deux méthodes : l'extraction à chaud et la macération à froid des différents organes des deux plantes, qui après calcul du rendement en extrait sec et le dosage de leur contenu flavonoïdique, a permis de conclure que l'extraction à chaud a donné de meilleurs résultats par rapport à la macération à froid.

Pour le *D. gnidium* et en ce qui concerne l'extraction à chaud la teneur en flavonoïdes a été de l'ordre de 129,2 mg EQC /g de matière végétale sèche pour les tiges et 112,4 mg EQC /g pour les feuilles. Pour l'*A. unedo*, les teneurs en flavonoïdes sont classées comme suit : rameaux > feuilles > fleurs et qui sont de l'ordre de 222,02 ; 175,3 et 126,4 mg EQC/g respectivement.

Ainsi, l'analyse qualitative des composés phénoliques des deux plantes par chromatographie sur couche mince nous a révélé la présence de l'acide gallique, l'acide *para*-coumarique et le pyrocatechol dans les rameaux de l'*A.unedo* L., l'acide *para*-coumarique, la quercétine et la rutine dans les fleurs et les feuilles. Pour le *D. gnidium* L. on a pu identifier la présence de l'acide gallique, du pyrocatechol et de la catéchine dans les tiges et la rutine pour les feuilles, ceci a été confirmé par les spectres d'absorption en ultraviolet.

Concernant l'activité antioxydante des parties des deux plantes étudiées, le pouvoir réducteur des extraits des fleurs de l'*A.unedo* été plus élevé que celui de l'acide ascorbique, il en est de même pour le piégeage du radical DPPH'.

Pour la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène, les extraits bruts méthanoliques du Daphné ont montré une activité considérable par rapport au BHA (butylhydroxyanisol).

Les extraits bruts méthanoliques des deux plantes, par la méthode de décoloration du β -carotène, ont montré une activité inférieure à celle du BHA, mais toutefois non négligeable.

Mots clés : *Arbutus unedo* L., *Daphne gnidium* L., activité antioxydante, flavonoïdes.

Abstract

In the framework of the studies relating to the search for natural antioxidants, the present study was undertaken on two medicinal plants of the area of Tlemcen : *Arbutus unedo* L. and *Daphne gnidium* L. and this with the aim of evaluating the antioxidant activity of their flavonoids.

The flavonoids extraction was carried out by two methods: the hot extraction and the extraction in cold of the various organs of the two plants, which after calculation of yield in dry extract and the proportioning of their flavonic contents, made it possible to conclude that the hot extraction are giving best results.

For the hot extraction of *D. gnidium*, flavonoids contents were in stems 129.2 mg EQC /g dry weight plant extract and 112.4 mg EQC /g in leaves. For *A. unedo*, flavonoids contents were in the following order: branches > leaves > flowers 222.02 , 175.3 and 126.4 mg EQC/g respectively.

Thus, the qualitative analysis of the phenolic compounds of the two plants by thin layer chromatography exposed us the presence of gallic acid, *para*-coumaric acid and pyrocatechol in branches of *A. unedo* and *para*-coumaric acid, quercetin and rutin in flowers and leaves. In *D. gnidium*, we were able to identify gallic acid, pyrocatechol and catechin in stems and rutin in leaves, this is was confirmed by the ultraviolet spectra.

Concerning the antioxidant activity of the different parts of both plants, the reducing power of the flowers extract of *A. unedo* is highest then for ascorbic acid, the same thing for the scavenging activity the free radical DPPH.

For the hydrogen peroxide scavenging activity, the methanolic crud extracts of *D. gnidium* showed important activity compared to the BHA (butylhydroxyanisol).

The methanolic crud extracts of the two plants in the β -carotene bleaching method showed low activity compared to the BHA but however it was not void.

Key words: *Arbutus unedo* L, *Daphne gnidium* L, antioxidant activity, flavonoids.

الملخص

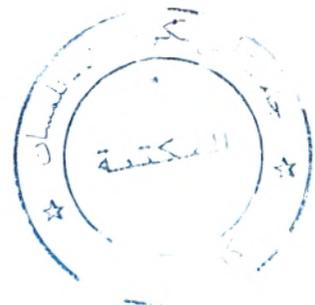
في إطار الدراسات حول البحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية، الدراسة الحالية تهدف إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات المستخلصة من نبتتين طبيئتين من منطقة تلمسان: *Arbutus unedo* L. (البنج) و *Daphne gnidium* L. (أزاز).

تم استخلاص الفلافونويدات بواسطة طريقتين: الإستخلاص بالحرارة و النقع لمختلف أعضاء النبتتين. بعد حساب المردود للمستخلص الخام و التحليل لمحتواهما الفلافوني تمكنا من الإستنتاج أن الإستخلاص بالحرارة يعطي المردودية الأفضل. أعطى الإستخلاص بالحرارة محتوى فلافوني مقدر ب 129,2 مغ معادل الكاتشين/غ بالنسبة لسيقان *D. gnidium* و 112,4 مغ معادل الكاتشين/غ لأوراق نفس النبتة. فيما يخص *A. unedo* يمكن ترتيب المحتوى الفلافوني لمختلف أعضاء النبتة كالتالي: الأغصان < الأوراق < الأزهار (222,02 ; 175,3 و 126,4 مغ معادل الكاتشين/غ على الترتيب).

بالكروماتوغرافيا على الطبقة الرقيقة تم الكشف عن وجود حمض غاليك، حمض باراكوماريك و البيروكاتيكول في أغصان *A. unedo* ، حمض باراكوماريك، الكارستين و جزيئة الروتين في الأزهار و الأوراق. كما تم الكشف عن حمض غاليك، البيروكاتيكول و الكاتشين في سيقان *D. gnidium* و جزيئة الروتين في الأوراق، و قد تم تأكيد هذه النتائج بواسطة إمتصاص الطيف في المجال ما فوق البنفسجي.

فيما يخص النشاط المضاد للأكسدة للنبتتين، القدرة الإرجاعية لمستخلصات أزهار *A. unedo* كانت معتبرة مقارنة مع حمض الأسكوربيك، و كذا بالنسبة لتثبيط جذر DPPH. كما بينت دراسة القدرة على تثبيط ثاني أكسيد الهيدروجين أن مستخلص الكحول المتيلي لمختلف أعضاء نبتة *D. gnidium* أظهر نتائج معتبرة مقارنة مع جزيئة البوتيل هيدروكسي أنيزول (BHA)، في حين أن مستخلصات الكحول المتيلي للنبتتين أظهرت نتائج ضعيفة بالمقارنة مع جزيئة BHA بطريقة نزع اللون للبيتا كاروتين.

الكلمات المفتاحية: *Daphne gnidium* L. ، *Arbutus unedo* L.، النشاط المضاد للأكسدة، الفلافونويدات.



Liste des abréviations

Abs :	Absorbance
AcOEt :	Acide Acétique
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AlCl₃ :	Chlorure d'aluminium
ATP :	Adénosine triphosphate
AU :	<i>Arbutus unedo</i> L.
BAW :	Butanol ; Acide Acétique ; Eau
BHA	Butyl hydroxyanizol
BuOH :	Butanol
CC :	Chromatographie sur Colonne
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
DG :	<i>Daphne gnidium</i> L.
EC :	Extraction à chaud
EDTA :	Ethylène di-amino tétra-acétique acide
EQC :	Equivalent catéchine
F :	Fleurs
FMNH₂	Flavine mononucléotide réduit
FADH₂	Flavine adénine dinucléotide réduit
GAE :	Acide gallique
HCl :	Acide Chlorhydrique
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HPLC-PDA :	High performance liquid Chromatography – photo diode arrays
L :	Feuilles
MeOH :	Méthanol
MF :	Macération à froid
nm :	Nanomètre
NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
p :	Poids
R :	Rameaux
R_f :	Rapport frontal
RMN :	Reactive Oxygen Species (espèces réactive de l'oxygène)
ROS :	Résonance magnétique nucléaire
rpm :	Rotation par minutes
SM :	Spectrométrie de masse
T :	Tiges
UV :	Ultraviolet
V :	Volume
% :	Pourcentage
µg :	Microgramme
µl :	Microlitre

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification, structure, et sources alimentaires de quelques Flavonoïdes.....	31
Tableau 2 :Composition en composés antioxydant du fruit d' <i>Arbutus unedo</i>	47
Tableau 3 : Les flavonoïdes (1-9) et les coumarines (10-13) du <i>D. gnidium</i>	51
Tableau 4 : Absorption UV-visible des flavonoïdes.....	60
Tableau 5 : Résultats CCM : Gel de silice, acétate d'éthyle/acide formique/eau (65 :15 :20), <i>Daphne Gnidium L.</i> , phase acétate d'éthyle.....	72
Tableau 6 : Résultats CCM : Gel de silice, acétate d'éthyle/acide formique/eau (65 :15 :20), <i>Arbutus unedo L.</i> , phase acétate d'éthyle.....	72
Tableau 7 : Résultats CCM : Gel de silice, acétate d'éthyle/acide formique/eau (65 :15 :20), <i>Arbutus unedo L.</i> , phase n-butanol.....	73
Tableau 8 : Résultats CCM : Gel de silice, acétate d'éthyle/acide formique/eau (65 :15 :20), <i>Daphne Gnidium L.</i> , phase n-butanol.....	73
Tableau 9 : Résultats CCM : Cellulose, butanol/acide acétique/eau (4 :1 :5), <i>Daphne Gnidium L.</i> , phase acétate d'éthyl.....	75
Tableau 10 : Résultats CCM : Cellulose, butanol/acide acétique/eau (4 :1 :5), <i>Arbutus unedo L.</i> , phase acétate d'éthyl.....	75
Tableau 11 : Résultats CCM : Cellulose, butanol/acide acétique/eau (4 :1 :5), <i>Daphne gnidium L.</i> , phase n-butanol.....	76
Tableau 12 : Résultats CCM : Cellulose, butanol/acide acétique/eau (4 :1 :5), <i>Arbutus unedo L.</i> , phase n-butanol.....	76
Tableau 13 : Résultats CCM des témoins : Cellulose / BAW.....	77
Tableau 14 : Résultats CCM : Polyamide, butanol/acide acétique/eau (4 :1 :5), <i>Daphne gnidium L.</i> , phase Acétate d'éthyl.....	78
Tableau 15 : Résultats CCM : Polyamide, butanol/acide acétique/eau (4 :1 :5), <i>Arbutus unedo L.</i> , phase Acétate d'éthyl.....	78
Tableau 16 : Résultats CCM : Polyamide, butanol/acide acétique/eau (4 :1 :5), <i>Arbutus unedo L.</i> , phase n-butanol.....	78
Tableau 17 : Résultats CCM : Polyamide, butanol/acide acétique/eau (4 :1 :5), <i>Arbutus unedo L.</i> , phase n-butanol.....	79
Tableau 18 : Résultats CCM des témoins : Polyamide / BAW.....	79
Tableau 19 : Interprétation des couleurs des spots en différentes classes de flavonoïdes.....	81
Tableau 20 : Composés identifiés par le système Polyamide (BAW) et le système Cellulose (BAW).....	82
Tableau 21 : Interprétation des spectres UV des fractions des deux plantes.....	87
Tableau 22 : L'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits brutes méthanoliques des deux plantes	96

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation moléculaire des réductions successives du dioxygène en anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle.....	8
Figure 2 : Mécanisme de la Peroxydation Lipidique.....	15
Figure 3 : Formation et de régulation des ROS.....	21
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.....	24
Figure 5 : Squelette de base des flavonoïdes.....	25
Figure 6 : La biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes.....	26
Figure 7 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des falvonoïdes.....	34
Figure 8 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Me ⁿ⁺).....	36
Figure 9 : L' <i>Arbutus unedo</i> L.....	43
Figure 10 : Le fruit de l'arbousier.....	43
Figure 11 : Le <i>Daphne gnidium</i> L., Feuilles (A) et fleurs (B).....	48
Figure 12 : Le Daphné, en A : L'arbrisseau, et en B ; fleurs et fruit (rouge).....	49
Figure 13 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	56
Figure 14 : Spectres d'absorption des classes de flavonoïdes avec un exemple pour chacune.....	61
Figure 15 : Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH.....	62
Figure 16 : Rendement en extrait sec.....	68
Figure 17 : Dosage de polyphenoles totaux.....	69
Figure 18 : Dosage des flavonoïdes.....	69
Figure 19 : Photo de CCM sur Gel de Silice des différents extraits des deux plantes <i>Arbutus unedo</i> L. et <i>Daphne gnidium</i> L.	71
Figure 20 : Photo de CCM sur cellulose des extraits dans l'acétate d'ethyl de l' <i>Arbutus unedo</i> L. et du <i>Daphne gnidium</i> L.....	74
Figure 21 : Photo de CCM sur cellulose des différents extraits dans le n-butanol des deux plantes <i>Arbutus unedo</i> L. et <i>Daphne gnidium</i> L.....	74
Figure 22 : Photo de CCM sur cellulose (BAW) des témoins.....	77
Figure 23 : Photo de CCM sur Gel de polyamide des différents extraits des deux plantes <i>Arbutus unedo</i> L. et <i>Daphne gnidium</i> L.....	77
Figure 24 : Photo de CCM sur polyamide (BAW) des témoins.....	79
Figure 25 : Spectres d'absorption en ultraviolet de quelques témoins.....	85

Figure 26 : Spectres d'absorption en ultraviolet des différents extraits des deux plantes.....	86
Figure 27 : Pouvoir réducteur des extraits acétate d'éthyle et n-butanol de <i>l'Arbutus unedo</i> L.....	89
Figure 28 : Pouvoir réducteur des extraits acétate d'éthyle et n-butanol du <i>Daphne gnidium</i> L.....	89
Figure 29 : Graphes illustrants le pourcentage d'inhibition des différents extraits du <i>Daphne gnidium</i>	92
Figure 30 : Graphes illustrants le pourcentage d'inhibition des différents extraits de <i>l'Arbutus unedo</i>	93
Figure 31 : Graphe illustrant le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.....	94
Figure 32 : Activité antiradicalaire des extraits acétate d'éthyle et n-butanol de <i>l'Arbutus unedo</i> L.....	95
Figure 33 : Activité antiradicalaire des extraits acétate d'éthyle et n-butanol du <i>Daphne gnidium</i> L.....	95
Figure 34 : L'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène pour l'extrait méthanolique des deux plantes au temps initial (t=0).....	96
Figure 35 : Résultats de l'activité antioxydante par la méthode de la décoloration du β -carotène pour les différentes parties des deux plantes.....	98
Figure 36 : Pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène.....	99

Table des Matières

Introduction	1
Partie Bibliographique	5
Chapitre Un : Le stress oxydant.....	6
I. Les radicaux libres rencontrés en biologie.....	8
- Dérivés activés de l'oxygène.....	8
- Le monoxyde d'azote.....	10
II. Origine des radicaux libres	11
1. Production de radicaux libres par voie endogène.....	11
1.1. La chaîne respiratoire mitochondriale.....	11
1.2. L'inflammation	12
1.3. La NADPH oxydase.....	12
1.4. La xanthine oxydase	13
1.5. Autres mécanismes.....	13
2. La formation des radicaux libres par voie exogènes.....	14
III. Rôle pathogène des radicaux libres	14
1. L'ADN.....	14
2. Les protéines.....	15
3. Les lipides.....	15
IV. les moyens de défences contre les radicaux libres	16
1. La prévention à plein temps.....	17
2. La détoxification active: système de défense enzymatique.....	17
3. la détoxification passive: les molécules antioxydantes.....	19
Chapitres Deux : Les flavonoïdes.....	22
I. Découverte des flavonoïdes	24
II. Structure chimique	24
III. Biosynthèse des flavonoïdes.....	25
IV. Classification	27
1. Flavones et Flavonols.....	27
2. Flavonones et Dihydroflavonols.....	27
3. Flavan-3-ols, Flavan-3,4-diols et anthocyanidols.....	28
4. Chalcone et Aurones	28
5. Hétérosides flavonique.....	29
6. Biflavonoïdes.....	29
V. Sources et importance dans l'alimentation	30
VI. Pharmacocinétique.....	32

VII. Activités biologiques des flavonoïdes	32
1. Propriété antioxydante et piégeage des radicaux libres.....	33
2. Inhibiteurs enzymatiques.....	35
3. Chélation des ions métalliques.....	36
4. Effet protecteur vasculaire	37
5. Propriétés anti-inflammatoire des flavonoïdes et effets sur le système immunitaire.....	37
6. Effet antiallergique.....	38
7. Propriétés antivirales et antibactériennes.....	39
8. Propriétés anti-carcinogènes.....	39
9. Autres propriétés des flavonoïdes.....	40
Chapitre Trois : Les espèces végétales	41
A. Etude Botanique de l' <i>Arbutus unedo</i> L.....	42
I. La famille des Ericacées.....	42
II. Le genre <i>Arbutus</i>	42
III. L'Arbousier <i>Arbutus unedo</i> L.....	42
1. Description Botanique de l' <i>Arbutus unedo</i> L.....	42
2. Classification classique	44
3. Histoire et traditions	44
4. Propriétés et usages	44
5. Travaux antérieurs sur l' <i>Arbutus unedo</i>	45
B. Etude Botanique de <i>Daphne gnidium</i> L.	49
I. La famille des Thymelæacées.....	49
II. Le genre <i>Daphne</i>	49
III. Le <i>Daphne gnidium</i> L.	49
1. Description botanique du <i>Daphne gnidium</i> L.....	49
2. Position systématique.....	51
3. Histoire et traditions.....	51
4. Travaux antérieur sur le <i>Daphne gnidium</i> L.....	52
Partie Expérimentale.....	54
Chapitre quatre : Matériels et méthodes.....	55
1. Matériel végétal.....	56
2. Extraction des flavonoïdes.....	56
- Macération à froid.....	58
- Extraction à chaud.....	58
3. Rendement en extrait sec.....	58
4. Fractionnement.....	58
5. Dosage des polyphénols.....	59
6. Dosage des flavonoïdes.....	60

7. Chromatographie sur couche mince.....	61
8. Spectres d'absorption en UV-visible	62
9. Etude de l'activité antioxydante.....	64
9.1. Réduction du fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant activity)....	64
9.2. Piégeage du radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	65
9.3. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	67
9.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (β-carotene bleaching method).....	68
Chapitre cinq : Résultats et Discussion.....	70
1. Rendement en extrait sec.....	71
2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	72
3. Chromatographie sur couche mince.....	74
4. Spectres d'absorption en UV-visible.....	93
5. L'activité antioxydante.....	98
5.1. Réduction du fer	98
5.2. Piégeage du radical DPPH.....	102
5.3. Activité du piégeage du H ₂ O ₂	108
5.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du β-carotène	110
Conclusion.....	116
Références Bibliographiques.....	119

Introduction

Au cours du métabolisme, l'organisme produit des radicaux libres nécessaires à des mécanismes vitaux. Si ces composés, comportant un électron célibataire et très réactif, ne sont pas éliminés peuvent oxyder les composants cellulaires, protéines et acides gras polyinsaturés, acides nucléiques et hydrocarbures, d'où il y aura un impact négatif sur le métabolisme cellulaire. Heureusement, pour lutter contre les effets délétères de ces radicaux libres, notre organisme possède des systèmes de défense : il y en a ceux qui sont endogènes impliquant des enzymes détoxifiantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, etc) et ceux qui sont exogènes obtenus à partir de notre alimentation. Ces derniers sont constitués par des composés naturels appelés les antioxydants. Ces systèmes sont capables de bloquer la formation des radicaux libres en les neutralisant ou en les désactivant une fois formés et protège ainsi les systèmes biologiques contre un dommage oxydatif.

Les dommages tissulaires qui résultent d'un déséquilibre entre ces systèmes de défense et la formation des radicaux (stress oxydatif) sont impliqués dans diverses pathologies telles que les cancers, l'athérosclérose, le diabète, l'asthme, la cataracte, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, etc.

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt dans le traitement de certaines pathologies, ils sont aussi utilisés pour la conservation des denrées comestibles pour l'industrie agroalimentaire (par exemple empêcher l'oxydation des lipides) (**Pan et al., 2008**).

✕ Au bout des dernières années les antioxydants commerciaux utilisés étaient des antioxydants synthétiques, tels que le 2,3-*ter*-butyl-4-méthoxyphenol (BHA), 2,6-di-*ter*-butyl-4-méthylphenol (BHT), le *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) et le propylgallate (PG), mais ils ont été suspectés qu'ils possédaient une certaine toxicité et qu'ils étaient responsables des dommages causés dans le foie et de la carcinogénèse. De ce fait, l'importance des antioxydants s'est focalisée sur le développement de la recherche et l'isolation des antioxydants naturels à partir des végétaux et cela pour remplacer ceux qui sont synthétiques (**Tawaha et al., 2007 ; Pan et al., 2008 ; Atmani et al., 2009**).

La plupart des antioxydants isolés à partir des plantes sont des polyphénols. Dans cette famille, on retrouve une classe de métabolites secondaires reconnues pour ces nombreuses activités biologiques, les flavonoïdes dotées d'activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-carcinogènes (**Ghedira, 2005**).

L'utilisation de divers systèmes expérimentaux a prouvé que les effets protecteurs des flavonoïdes sont dus à leurs propriétés redox qui se traduisent dans les capacités de donner des électrons et des hydrogènes, en plus de leurs potentiels à chélater les ions métalliques pro-oxydantes, d'activer les enzymes antioxydantes et d'inhiber les enzymes productrices de radicaux libres (NADPH oxydase, xanthine oxydase, myeloperoxydase, etc) (**Harborne et Williams, 2000 ; Atmani et al., 2009**).

Plusieurs études ont confirmé la contribution des polyphénols et des flavonoïdes des extraits végétaux à l'activité antioxydante *in vitro*. On peut citer par exemple les travaux réalisés par : **Ding et al., 2008 ; Iacopini et al., 2008 ; Vasco et al., 2008 ; Alén_Ruiz et al., 2009 ; Borneo et al., 2009**.

Ainsi l'objectif de notre travail vise à étudier l'activité antioxydante des flavonoïdes des extraits de deux plantes de la région de Tlemcen, reconnues pour leurs vertus médicinales : *Arbutus unedo* L. et *Daphne gnidium* L.

L'*A. unedo* L. est connu par ces propriétés antiseptiques et désinfectantes des voies urinaires, antispasmodiques et astringentes. Reconnu également dans d'autres pays, comme la Turquie, comme diurétique ou le Maroc comme remède naturel pour l'hypertension et le diabète (**Boullard, 2001 ; El Houari, 2007**).

Le Daphné, et depuis le Moyen Âge, fut recommandé pour soigner les affections de la peau, Pustule et Gale. Pareillement, dès l'Antiquité, les feuilles et les fruits furent utilisés comme purgatifs et en cas de troubles biliaires. Mais la toxicité de ces divers organes a fait renoncer à leur emploi en usage interne (**Djaziri, 1963 ; Beniston, 1984 ; Boullard, 2001**).

Notre travail consistera, dans une première partie, à une recherche bibliographique qui comporte un premier chapitre sur le stress oxydant et les radicaux libres, un second chapitre sur les flavonoïdes comme molécules antioxydantes et un troisième chapitre exposera la description de nos deux plantes médicinales avec quoi l'étude a été menée.

La partie expérimentale se divise en deux chapitres, le premier (chapitre quatre) présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de cette étude à savoir :

- Extraction des flavonoïdes par deux méthodes : l'extraction à chaud et la macération à froid ;

- une analyse qualitative de la composition en flavonoïdes de nos extraits par chromatographie sur couche mince et par les spectres d'absorption en ultraviolet ;

- les méthodes qui ont permis de tester et évaluer l'activité antioxydante des extraits de nos plantes :

- piégeage du radical DPPH[•] ;
- piégeage du peroxyde d'hydrogène ;
- capacité de réduction du fer ;
- et la décoloration du β -carotène.

Enfin, le dernier chapitre discutera les résultats obtenus dans cette étude.

**Partie
Bibliographique**

Chapitre Un

Le stress oxydant

I. Radicaux libres rencontrés en biologie

L'appellation ROS inclut les radicaux libres de l'oxygène : radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle (OH^{\cdot}), monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) (**Marfak, 2003**).

► Dérivés activés de l'oxygène (ROS)

En biologie, l'oxygène joue un rôle fondamental dans les réactions radicalaires.

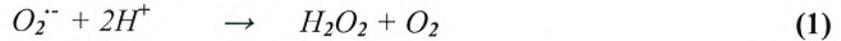
L'oxygène moléculaire ou « dioxygène » est en fait un biradical qui possède deux électrons non appariés (figure 1), ceci explique sa grande réactivité. Cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes et de part sa structure, l'oxygène présente une faible réactivité vis-à-vis de la majorité des molécules organique ; il est donc peu toxique par lui-même. Sous l'action de radiations ionisantes, de rayons UV, de métaux de transition ou au cours de réactions enzymatiques, plusieurs espèces beaucoup plus réactives sont produites (**Hennebelle, 2006 ; Souchard et al., 2002**). La conversion de l'oxygène moléculaire en son état excité donne naissance, après inversion de spin et fragilisation de la liaison $O - O$, à l'oxygène singulet (1O_2) pouvant réagir avec des structures organiques stables. L'oxygène peut également intervenir dans des réactions radicalaires. Ainsi, le gain d'un électron entraîne la formation du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (figure 1).

a) L'anion superoxyde

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), produit par presque toutes les cellules en aérobie est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, souvent au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) (**Hennebelle, 2006**). De même, la NADH-déshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales, peuvent conduire à la formation de radicaux $O_2^{\cdot-}$. Par ailleurs, l'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits ($FMNH_2$, $FADH_2$), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P_{450} présents au niveau du réticulum endoplasmique (**Gardès-Albert et al., 2003**).

b) Le peroxyde d'hydrogène

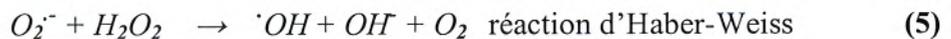
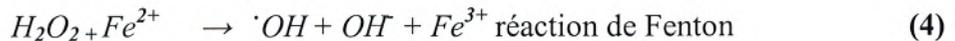
Le peroxyde d'hydrogène est produit par la dismutation spontanée ou induite de l'anion superoxyde, ou par la réduction bivalente de l'oxygène :



Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) n'est pas un radical libre proprement parlé puisqu'il ne possède pas d'électrons célibataires (figure 1). Cependant, il est considéré comme un dérivé activé de l'oxygène, de par sa position essentielle au sein des réactions radicalaires. Par ailleurs le peroxyde d'hydrogène a la propriété de traverser les membranes biologiques (**Hennebelle, 2006**). Il possède un fort pouvoir oxydant, participant indirectement à la toxicité de l'oxygène. Ainsi en présence de métaux de transition, il est capable de générer le radical hydroxyle (figure 1) très réactif (réaction de Fenton). Dans le polynucléaire neutrophile, la myéloperoxydase génère l'acide hyperchloreux ($HOCl$), oxydant très puissant, à partir de H_2O_2 et du chlore (**Souchard et al., 2002**).

c) Le radical hydroxyle

Il est produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferriques, au cours de la réaction d'Haber-Weiss :



Il est capable de réagir avec presque tous les composants cellulaires, par échange d'électron, addition sur des doubles liaisons ou arrachement d'un atome d'hydrogène. Le radical hydroxyle est donc un oxydant très puissant, constituant certainement le radical libre le plus toxique, et serait à l'origine de la production des radicaux libres « secondaires », suite à sa réaction avec les différents composés cellulaires (**Souchard et al., 2002**).

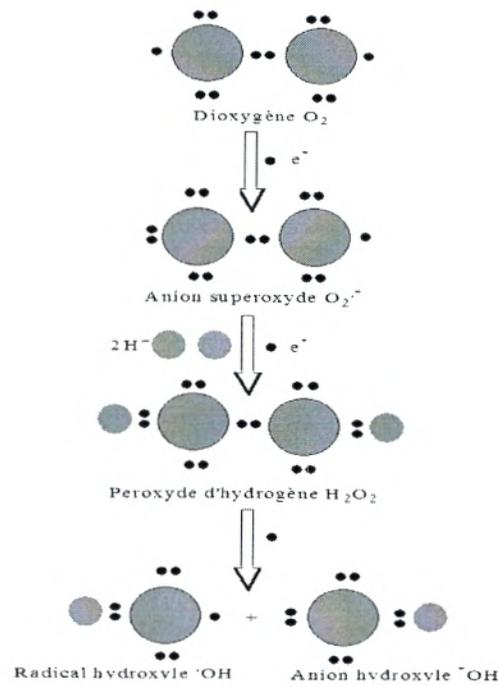


Figure 1 : Représentation moléculaire des réductions successives du dioxygène en anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle (Souchard *et al.*, 2002).

d) Autres formes radicalaires

D'autres formes radicalaires dites « secondaires » peuvent être retrouvées dans les milieux biologiques. Il s'agit en particulier des radicaux alkyles ($R\cdot$), alkoxy ($RO\cdot$), alkoperoxy ($ROO\cdot$), générés à la suite de l'action oxydante de radicaux libres oxygénés « primaires » (superoxyde, hydroxyle) sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés, les glucides, les protéines ou les acides aminés. Ces radicaux « secondaires » sont moins réactifs mais plus sélectifs que les radicaux hydroxyles. Ils sont à l'origine des processus de réactions radicalaires en chaîne et en particulier des réactions participant à la lipoperoxydation des membranes cellulaires (Souchard *et al.*, 2002).

► Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote ou $\cdot NO$ est produit sous l'action des NO synthases (NOS), à partir de la L-arginine, en présence d'oxygène et de cofacteurs. Il s'agit d'une molécule radicalaire non chargée, dont l'électron libre est porté par l'azote. De par ses propriétés lipophiles et sa demi-vie relativement longue, le $\cdot NO$ est capable de diffuser dans l'environnement cellulaire. Le $\cdot NO$ est impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction : il peut réagir avec l'oxygène (O_2) pour donner des nitrates ou avec certaines espèces radicalaires telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) pour former un anion peroxyntrite

(ONOO⁻) (Souchard *et al.*, 2002). Cet anion peroxydite est très néfaste pour les protéines et l'ADN, il est impliqué dans l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et les maladies inflammatoires chroniques intestinales comme la maladie de Crohn (Hennebelle, 2006).

Les radicaux libres sont très instables, leur durée de vie est généralement très courte 10⁻⁴ seconde (10⁻⁶ à 10⁻⁹ s pour le radical hydroxyle), car ils cherchent à « réappairer » leur électron célibataire. Les radicaux libres peuvent induire soit un processus de réaction en chaîne, soit un arrêt de la propagation des réactions radicalaires (Souchard *et al.*, 2002). D'une manière générale, la fin d'une réaction en chaîne peut se produire :

- par la recombinaison des radicaux entre eux : $R_1 \cdot + R_2 \cdot \rightarrow R_1 - R_2$. Ceci est possible s'il s'agit de chaînes organiques contenant uniquement des liaisons saturées ;
- par l'intervention de systèmes antioxydants entraînant le piégeage des radicaux libres. Il s'agit d'enzymes (superoxyde dismutases SOD, catalase, peroxydases) et de molécules antioxydantes telles que la quercétine (Milane, 2004).

II. Origine des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes. Cette production, physiologique et/ou pathologique, est associée au métabolisme cellulaire de l'oxygène et aux réactions d'oxydo-réduction. Nous pouvons considérer que certaines de ces productions sont volontairement programmées par l'organisme à des fins de défense ou d'envoi des signaux.

1. Production de radicaux libres par voie endogène

1.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

On estime qu'environ 2% à 5% de l'oxygène utilisé par la chaîne respiratoire mitochondriale fait l'objet d'une réduction monovalente, qui s'accompagne d'une production d'anions superoxyde. La production de radicaux libres oxygénés est donc un phénomène continu et physiologique. Cette production peut également s'intensifier lors d'un effort physique ou lorsque interviennent des désordres mitochondriaux génétiques, inflammatoires ou nutritionnels.

Dans certaines situations pathologiques, comme l'ischémie-reperfusion, la chaîne respiratoire mitochondriale peut être altérée et la production radicalaire augmente (**Souchard et al., 2002 ; Hininger-Favier, 2004**).

1.2. L'inflammation

L'inflammation est, par ailleurs, une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées soumises à un phénomène appelé : explosion oxydative, qui consiste en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, présente au niveau des phagosomes et des membranes des polynucléaires, qui est capable d'utiliser l'oxygène pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes. Ce dernier peut générer, par dismutation, du peroxyde d'hydrogène, puis une formation d'anions superoxyde peut être déclenchée par la réaction d'Haber-Weiss en présence de fer (**Soares, 2005 ; Souchard et al., 2002**).

Les cellules phagocytaires vont libérer aussi des enzymes, des médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine et en plus de l'anion superoxyde d'autres dérivés oxygénés sont produits tels que l'acide hypochloreux (HClO) et les radicaux OH^\cdot , H_2O_2 et $^1\text{O}_2$.

Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte infectieuse, car il permet la phagocytose des bactéries et corps étrangers.

La NADPH oxydase, activée par la protéine kinase C et l'acide arachidonique libéré par la phospholipase A_2 (PLA_2) intervient et permet la synthèse de $\text{O}_2^{\cdot-}$ au prix d'une forte consommation d' O_2 :



Les radicaux superoxydes subissent ensuite une dismutation, soit spontanée soit enzymatique. Enfin, une enzyme présente dans le phagosome, la myéloperoxydase, catalyse en présence de H_2O_2 et d'ions Cl^- , la formation de dérivés halogénés toxiques comme l'acide hypochloreux (*HClO*). En présence de peroxyde d'hydrogène, *HClO* donne naissance à l'oxygène singulet et peut aussi réagir avec l'anion superoxyde pour former de l'hydroxyle (**Souchard et al., 2002**).

Un leucocyte activé contient donc de fortes proportions de radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^\cdot , $^1\text{O}_2$ et chloramines aux propriétés bactéricides. Ainsi, les radicaux libres peuvent avoir des effets positifs : ils participent à la lutte contre l'infection en lysant les bactéries phagocytées. Un

déficit dans la production des radicaux libres par les leucocytes ou une baisse de l'activité de la myéloperoxydase se caractérise par une sensibilité particulière aux infections (**Milane, 2004**).

1.3. La NAD(P)H oxydase

Nous avons évoqué précédemment le rôle de la NADPH oxydase présente au niveau des cellules phagocytaires dans l'initiation des réactions radicalaires au cours de l'inflammation.

Sous l'influence de stimuli physiques (étirement, cisaillement ...) ou biochimiques (thrombine, angiotensine II ...), la NADPH oxydase des cellules de la paroi vasculaire génère l'anion superoxyde et de l'eau oxygénée. Ces ROS peuvent agir sur la transcription de certains gènes et agir sur la prolifération, la survie, la migration et l'adhésion de nombreuses cellules du système cardiovasculaire (**Souchard et al., 2002**).

1.4. Xanthine oxydase/ Xanthine déshydrogénase

La xanthine oxydase XO est une enzyme dont la fonction principale est la dégradation des bases puriques. Cependant, son activité est associée de la libération d'un radical superoxyde, impliquant la formation du peroxyde d'hydrogène et d'autres réactions radicalaires. Cette enzyme est largement distribuée dans l'organisme et a été localisée dans différents tissus. Elle est présente sous deux formes : la forme déshydrogénase (XD), qui utilise le NAD^+ comme accepteur d'électron et la forme oxydase (XO), qui utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons. *In vivo*, dans des conditions physiologiques, la forme XD est prédominante : elle catalyse la réaction de transformation de la xanthine en acide urique en présence de NAD^+ : cependant dans certaines situations pathologiques comme l'ischémie-reperfusion, la forme XD est convertie en XO, qui réduit l'oxygène moléculaire en anion superoxyde (**Souchard et al., 2002**).

1.5. Autres mécanismes

Lors de la synthèse des prostaglandines, la PLA_2 catalyse la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Deux enzymes, la lipooxygénase et la cyclooxygénase, liées aux membranes plasmiques et microsomales, transforment l'acide arachidonique en dérivés tels que le thromboxane, les prostaglandines ou les leucotriènes.

Ce métabolisme est associé à une production d'anion superoxyde, qui peut être accrue lorsque la dégradation de l'acide arachidonique est accélérée (Milane, 2004 ; Souchard *et al.*, 2002).

Le NO est synthétisé à partir de l'un des atomes d'azote terminal du groupement guanine de la L-Arginine par voie enzymatique faisant intervenir les *Nitric Oxide Synthase* (NOS), en présence d'oxygène et de cofacteurs. A ce jour, quatre isoformes de NOS ont été identifiées. Une forme inductible de cette enzyme est présente au niveau de nombreux types cellulaires ; cette enzyme est capable de synthétiser de grandes quantités de NO après stimulation par des médiateurs immuno-inflammatoires (Souchard *et al.*, 2002).

2. Formation de radicaux libres par voie exogène

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres (O_2^- , OH, 1O_2) et de molécules génératrices de radicaux libres (H_2O_2) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants. Les radiations ionisantes X ou gamma provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d' O_2^- . L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase, et du cytochrome P450.

Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2), présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels), participent à la genèse des radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires.

Les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) mais aussi le fer libre (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) des radicaux hydroxyles très réactifs par une réaction appelée réaction de Fenton. Les particules inhalées telles que l'amiante et/ou la silice sont aussi des sources de radicaux par la phagocytose exacerbée qu'elles déclenchent et aussi car elles sont recouvertes de sels de fer en surface.

Enfin, des antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable

de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité. Ils agissent selon un mécanisme de transfert d'électrons (**Borel *et al.*, 1997 ; Milane, 2004 ; Hininger-Favier, 2004**).

III. Rôle pathogène des radicaux libres

Les dommages liés à un stress oxydant se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN, des protéines ou encore la peroxydation des lipides (**Soares, 2005**).

1. L'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, il s'agit d'une molécule particulièrement sensible à l'action des radicaux libres. Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins. Les cassures observées sont dues aux radicaux OH[•] issus de la réaction de Fenton en présence de fer ferreux chélaté à certains acides aminés ou aux groupes phosphates de l'ADN (**Milane, 2004**). Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (léthalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et dans le vieillissement cellulaire.

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8-oxo-guanine, 8-nitro-guanine, formamidopyrimidine, 8-oxo- adénine, formimidouracile, 5-hydroxy-cytosine, 5-hydroxy-méthyl-uracile, thyminediol, oxazolone (**Favier, 2003**).

2. Les protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (-SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. D'autres lésions irréversibles conduisent à la formation d'un intermédiaire radicalaire. Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine, soit subir des coupures en cas d'agression forte. Les acides aminés les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, la méthionine et la cystéine (**Favier, 2003 ; Milane, 2004**). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques

(enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules, qui associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuschines caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003).

3. Les lipides

Les chaînes d'acides gras insaturés, constituants essentiels des membranes cellulaires, constituent une cible majeure pour les ROS. L'attaque radicalaire des membranes cellulaires phospholipidiques déclenche une réaction en chaîne appelée lipoperoxydation membranaire.

Lors de l'étape d'initiation, un acide gras polyinsaturé est attaqué par un radical libre ($\text{OH}\cdot$, $\text{R}\cdot$, $\text{RO}\cdot$) pour donner un radical lipidique ($\text{R}'\cdot$). Par réarrangement des doubles liaisons de ce radical, il se forme un diène conjugué. Cette molécule réagit avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde ($\text{ROO}'\cdot$) qui réagit lui-même avec un acide gras adjacent pour former un hydroperoxyde (ROOH) et un nouveau radical lipidique. Ce dernier peut être réactivé en présence de fer par la réaction de Fenton qui le convertit en radical alkoxyde ($\text{RO}'\cdot$), lui-même très réactif.

Chez les hypercholestérolémiques (sujets présentant une teneur élevée en « mauvais cholestérol » véhiculé par les *Low Density Lipoproteins* ou LDL), il se forme sur la paroi des vaisseaux (artères coronaires en particulier), une plaque d'athérome riche en lipides. Les LDL accumulées s'oxydent par le biais de réactions radicalaires ayant pour initiateurs des ROS. Les LDL oxydées (LDLox) sont donc reconnues par les récepteurs des macrophages, étant incapables de les dégrader, ils se gorgent de graisse et se transforment en cellules spumeuses, s'endommagent et meurent. Puis, la plaque d'athérome grossit jusqu'à obturer l'artère ou finit par se rompre, entraînant la formation d'un thrombus dans le vaisseau. Ainsi, la théorie actuelle concernant la physiopathologie de l'athérosclérose suggère que l'interaction entre les LDLox circulantes et les macrophages tissulaires soit l'initiateur de la lésion athéroscléreuse (Hennebelle, 2006 ; Souchard *et al.*, 2002).

Les atteintes radicalaires des divers composants cellulaires peuvent induire de nombreuses perturbations cellulaires. L'altération directe des protéines, la peroxydation lipidique et l'accumulation de dérivés de la peroxydation modifient la conformation des

protéines, la structure des lipides ainsi que l'interaction lipide-protéine. Ainsi de nombreuses activités enzymatiques sont perturbées, la perméabilité et la fluidité membranaire sont modifiées, les structures et les fonctions membranaires sont altérées. L'ensemble de ces événements entraîne le développement d'altérations cellulaires qui peuvent aboutir à des perturbations du fonctionnement de certains organes. De ce fait, les radicaux libres sont impliqués dans de nombreuses pathologies (Souchard *et al.*, 2002 ; Milane, 2004).

IV. Les moyens de défense contre les radicaux libres

Les radicaux libres exerceraient des effets toxiques presque permanents s'ils n'étaient pas détruits dès leur formation. Pour cette cause, notre organisme possède une « armée » d'antioxydants de nature protéique, enzymatique et d'agents oxydables. Ces antioxydants interviennent en trois temps, constituant ainsi trois lignes de défense : la prévention à plein temps comprend les protéines non enzymatiques (albumine, transferrine ...) qui jouent un rôle antioxydant par chélation des ions, la détoxification active suite à un stress oxydatif et qui est fournie par des enzymes capables de transformer les ROS en dérivés inoffensifs, et la détoxification passive qui est constituée par des molécules que leurs structures rendent aptes à fixer et détruire les radicaux libres oxygénés, parfois en subissant elles-mêmes des modifications chimiques importantes.

1. La prévention à plein temps

Cette première ligne de défense prévient la surproduction des radicaux libres de l'oxygène en inactivant les molécules endogènes telles que le fer divalent et le cuivre monovalent. Le fer et le cuivre sous forme libre étant particulièrement promoteurs de dommages radicalaires, ces métaux sont physiologiquement séquestrés et transportés grâce à des protéines comme la ferritine, la transferrine, la céruloplasmine... qui agissent donc en tant qu'antioxydants primaires. Elle comprend des enzymes ferroxidases et des protéines chélatrices du fer (transferrine, hémosidérine) et du cuivre (albumine, céruloplasmine).

_ La ferroxidase : enzyme qui permet la transformation de l'ion ferreux (Fe^{2+}) en ion ferrique (Fe^{3+}). Cette activité oxydante favorise la capture du fer par la ferritine et limite ainsi la quantité de ce métal qui pourrait s'auto-oxyder et former alors des espèces réactives de l'oxygène dans les vaisseaux sanguins.

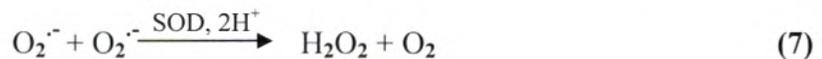
_ La transferrine : une glycoprotéine plasmatique capable de piéger jusqu' à deux atomes de fer ferrique. Celui-ci devient incapable d'intervenir dans des mécanismes d'oxydoréductions générateurs de radicaux libres.

_ L'albumine : c'est une protéine plasmatique qui joue le même rôle que la transferrine mais en captant l'ion cuivreux (**Fontaine, 1998 ; Marfak, 2003 ; Souchard *et al.*, 2002**).

2. La détoxification active (Systèmes de défense enzymatiques)

► Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) constituent la première ligne de protection contre les dérivés radicalaires de l'oxygène. Catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (réaction 7), empêchant ainsi la coexistence de ces deux espèces radicalaires et par conséquent la génération du radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss.



Il existe trois types de SOD chez les vertébrés ayant une localisation différente :

- une SOD cytoplasmique dimérique à cuivre et zinc d'où son nom Cu-Zn-superoxyde-dismutase ;
- une SOD tétramérique, d'activité plus faible, est présente dans le plasma sanguin et les fluides extracellulaires. Appelée superoxyde-dismutase extracellulaire, elle fonctionne avec le Cu^{2+} et Zn^{2+} ;
- une troisième SOD tétramérique localisée dans l'espace intramembranaire des mitochondries, à manganèse (MnSOD) et au Fer (Fe SOD). Il existe une autre moins répondeur la SOD au nickel (**Borel *et al.*, 1997 ; Souchard *et al.*, 2002 ; Soares, 2005**).

L'action de la SOD doit être couplée à celle d'enzymes qui dégradent le peroxyde d'hydrogène comme une catalase ou une glutathion peroxydase, afin d'éviter l'augmentation des concentrations en H_2O_2 , qui peut induire la formation du radical hydroxyle en présence de fer par la réaction de Fenton (Figure 2) (**Souchard *et al.*, 2002**).

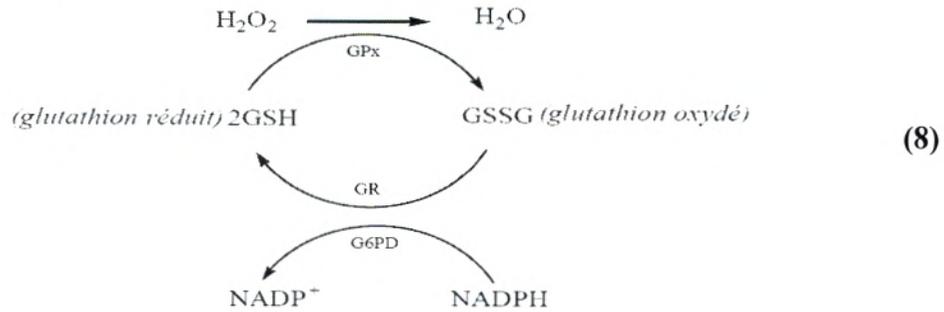
► Les glutathions peroxydases

Les glutathions peroxydases (GPx) ont en commun une structure tétramérique, chaque tétramère possédant un atome de sélénium dans son site actif.

Plusieurs isoformes de cette enzyme existent, dont l'une plasmatiche, la seconde membranaire, et la troisième gastro-intestinale (présente dans le foie et le colon et protégeant directement le tractus gastro-intestinal contre les effets néfastes des dérivés actifs de l'oxygène) (Nève, 2002 ; Milane, 2004 ; Soares, 2005).

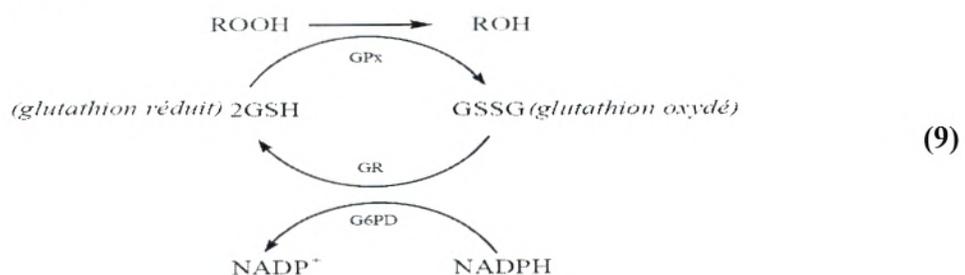
Les GSH-Px ont une action détoxiquante vis-à-vis de 2 substrats :

- Peuvent réduire le peroxyde d'hydrogène en eau en utilisant les capacités réductrices du couple glutathion/glutathion disulfide (GSH/GSSG).



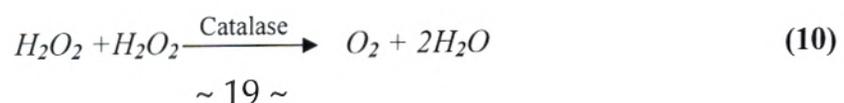
Ce système ne fonctionne que si le GSSG formé est continuellement réduit en GSH, ce qui est assuré par la glutathion réductase en présence du cofacteur NADPH, cette réaction produit du NADP^+ qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, le G6PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase) de la voie des pentoses phosphates. (Souchard *et al.*, 2002 ; Marfak, 2003).

- Les GPx permettent également de limiter la propagation des réactions radicalaires en chaîne en réduisant les hydroperoxydes organiques instables en acides gras hydroxylés (Souchard *et al.*, 2002).



► La catalase

Cette enzyme agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène, qui est toxique, en oxygène moléculaire et en eau selon la réaction suivante :



Les catalases sont localisées exclusivement à l'intérieur des peroxyosomes, ce qui limite leur action par rapport à d'autres enzymes, cytoplasmiques par exemple (**Borel et al., 1997 ; Souchard et al., 2002**).

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème-oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases (**Favier, 2003**).

2. La détoxification passive : Les molécules antioxydantes

Cette troisième ligne de défense permet la réduction des radicaux libres qui ont pu « survivre » aux deux autres lignes de défense. Sont regroupées dans cette catégorie toute substance capable de capter l'électron célibataire d'un radical libre sans donner elle-même un produit radicalaire, elle est définie comme un piègeur de radicaux libres : « scavengers ». Ces piègeurs se caractérisent par leur affinité élevée pour les radicaux libres et leur spécificité pour certains d'entre eux (**Marfak, 2003 ; Milane, 2004**). Ils prennent en charge la détoxification d'un grand nombre de radicaux libres et notamment celle du radical hydroxyle contre lequel aucun système enzymatique n'existe (figure 2).

Ce système de protection peut être à la fois membranaire (vitamine A, E), cytosolique et extracellulaire (glutathion, vitamine C, acide urique...). Au niveau du plasma par exemple, les activités des catalases et GPx sont faibles et la première barrière de défense antiradicalaire serait constituée par la vitamine C, les composés plasmatiques piègeurs des ROS et la SOD extracellulaire (**Souchard et al., 2002**).

Les concentrations normales de ces antioxydants sont souvent élevées, ce qui est indispensable à leur action, car elles réagissent souvent de façon équimoléculaire avec les radicaux libres. C'est le cas du glutathion, de la vitamine E et du β -carotène. Le diméthylsulfoxyde, des thiols comme la cystéine ou le β -mercaptoéthanol sont des scavengers de $O_2^{\cdot-}$.

Des substances végétales appartenant à la famille des polyphénols : les flavonoïdes, les anthocyanes et les tannins sont utilisés déjà depuis longtemps de façon empirique dans le traitement de certaines maladies, en particulier veineuses, en plus des caroténoïdes, l' α -tocophérol et la vitamine C. Ce sont des « scavengers exogènes » (**Borel et al., 1997**). Le groupe des flavonoïdes sera traité en détail dans le chapitre suivant.

- Les caroténoïdes

Pigments naturels que l'on trouve en abondance dans les fruits et les légumes dont les principaux sont l' α - et le β -carotène, la lutéine, la zéaxanthine, la cryptoxanthine et le lycopène. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes préviennent ou contrôlent efficacement la génération de radicaux libres notamment en captant l'oxygène singulet (1O_2). Le β -carotène est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes. Différents systèmes *in vitro* ont confirmé le rôle protecteur de ces molécules. Cependant, les études effectuées *in vivo* sont peu nombreuses et le rôle antiradicalaire des caroténoïdes reste à préciser (**Hininger-Favier, 2004 ; Milane, 2004**).

- La vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. L' α -tocophérol est l'antioxydant le plus puissant de la classe des tocophérols, notamment du fait de son caractère lipophile, qui lui permet d'agir au site même de la peroxydation lipidique membranaire. L' α -tocophérol est également un puissant inhibiteur de la formation des nitrosamides, en captant l'acide nitreux (**Souchard *et al.*, 2002 ; Soares, 2005 ; Milane, 2004**).

- La vitamine C

L'acide ascorbique, est généralement considéré comme l'antioxydant hydrosoluble le plus efficace. Il empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Souchard *et al.*, 2002 ; Soares, 2005**).

En association, les substances antioxydantes (les caroténoïdes comme le β -carotène, le lycopène et la lutéine, l'acide ascorbique, les tocophérols sous ses formes α et γ , les flavonoïdes, les extraits de thé vert, de baie de myrtille et de raisins) présentent des effets synergiques efficaces pour lutter contre le stress oxydant et ses effets délétères nous protégeant du vieillissement accéléré, des nombreuses pathologies dégénératives liées à l'âge et de la composante oxydative des pathologies aiguës : infectieuses, traumatiques, inflammatoires et allergiques (**Curtay, 2000**).

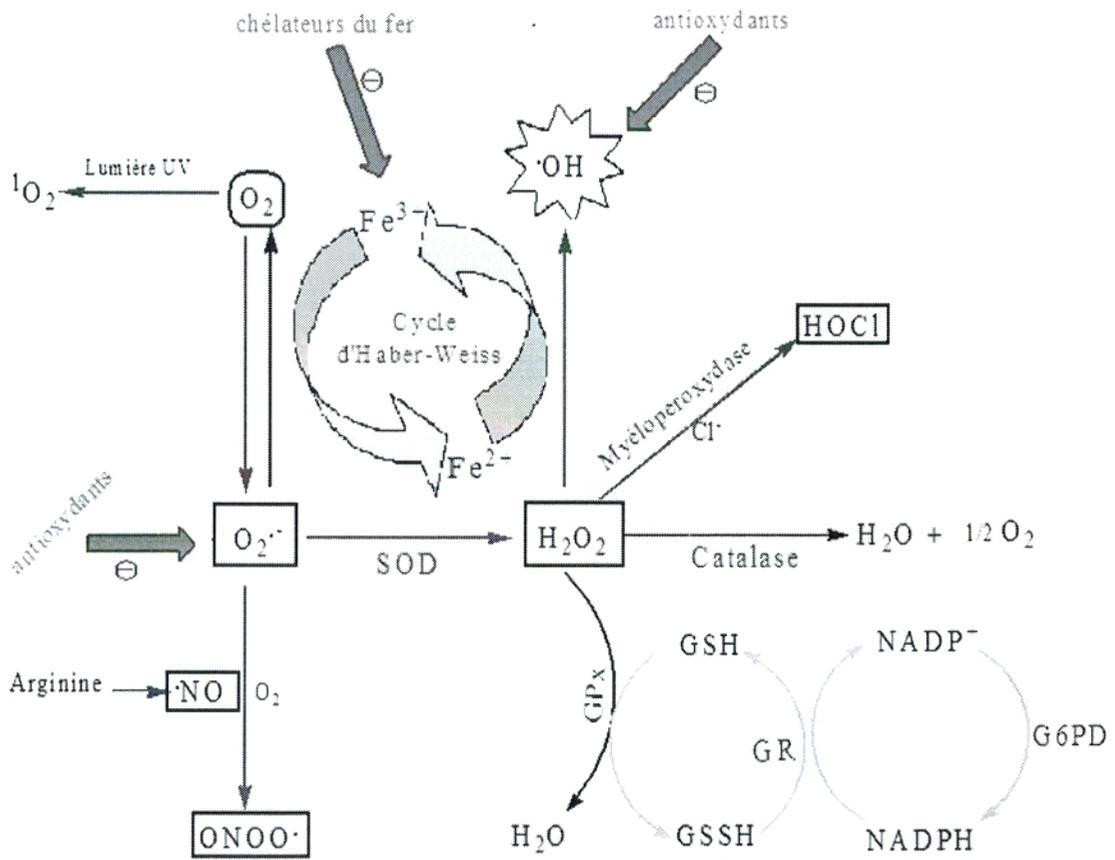


Figure 2 : Formation et de régulation des ROS.

Chapitre Deux :

Les flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Plus de 4 000 flavonoïdes naturels ont été identifiés à ce jour. On estime que 2 % environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 10^9 tonnes par an, est converti en flavonoïdes. Ce sont des pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Kelly et al., 2002 ; Milane, 2004 ; Lhuilier, 2007**). Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, auronnes, flavonols), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets.

Quand ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments : tel est le cas des flavones et des flavonols incolores co-pigmentant et protégeant les anthocyanosides. Dans certains cas, la zone d'absorption de la molécule est située dans le proche ultraviolet : la « coloration » n'est alors perçue que par les insectes qui sont ainsi efficacement attirés.

Les flavonoïdes, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (**Bruneton, 1999**).

Les flavonoïdes jouent plusieurs rôles dans la plante, ainsi leur présence dans la cuticule foliaire assure la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV. Il a été établi aussi que les flavonoïdes contribuent à la résistance des plantes à certaines maladies (**Harborne et Williams, 2000**).

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Des études récentes sur l'interaction plante-animal ont conclu que les flavonoïdes et plus précisément les proanthocyanidines assurent une protection des plantes contre les insectes et les herbivores en les repoussant par leur goût désagréable (**Marfak, 2003 ; Harborne et Williams, 2000**).

Les flavonoïdes sont connus pour leurs nombreuses activités biologiques : activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres.

I. Découverte des flavonoïdes

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de Paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de « vitamine P » n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines. On parle maintenant de « veinotropes » ou encore de « vasculoprotecteurs et veinotoniques ». Les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils sont des antioxydants et possèdent des propriétés biologiques diverses (Bruneton, 1999 ; Milane, 2004).

II. Structure chimique

Flavonoïdes (de *flavus*, « jaune » en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C₃ entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former l'hétérocycle oxygéné (cycle C) (fig3).

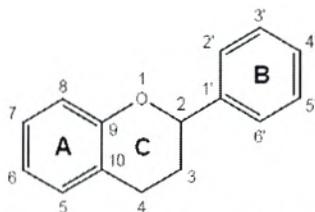


Figure 3 : Structure de base des flavonoïdes



2-PHENYLCHROMONE (ou noyau flavone)

Noyau

flavane

Cet élément structural de base des flavonoïdes dit le 2-phenylchromone ou le noyau flavone, est lui même un dérivé du noyau flavane de base.

Les flavonoïdes peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, lequel peut être ouvert et recyclisé en un motif furanique (dihydrofuranone) :

- 2- phenylbenzopyriliums, i.e. anthocyanes ;
- 2- phénylchromones ;
 - flavones, flavonols et leurs dimères,
 - flavonones et dihydroflavonols (dérivés 2,3-dihydrogénés) ;
- 2- phénylchromanes ;
 - falvanes,
 - falvan-3-ols, flavan-3,4diols;
- Chalcones et dihydrochalcones (le cycle pyranique est ouvert)
- 2-benzylidène-coumaranones (= auronnes) (**Lhuilier, 2007 ; Bruneton, 1999**).

III. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA (Figure 4).

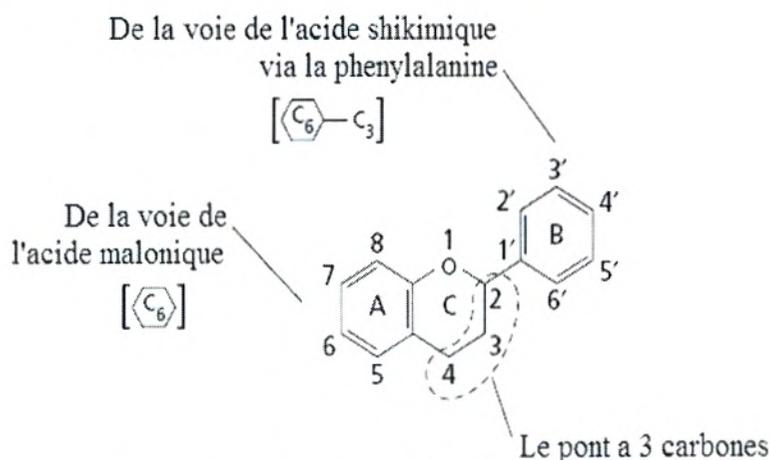


Figure 4 : Squelette de base des flavonoïdes

Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes (**Lhuilier, 2007 ; Bruneton, 1999**).

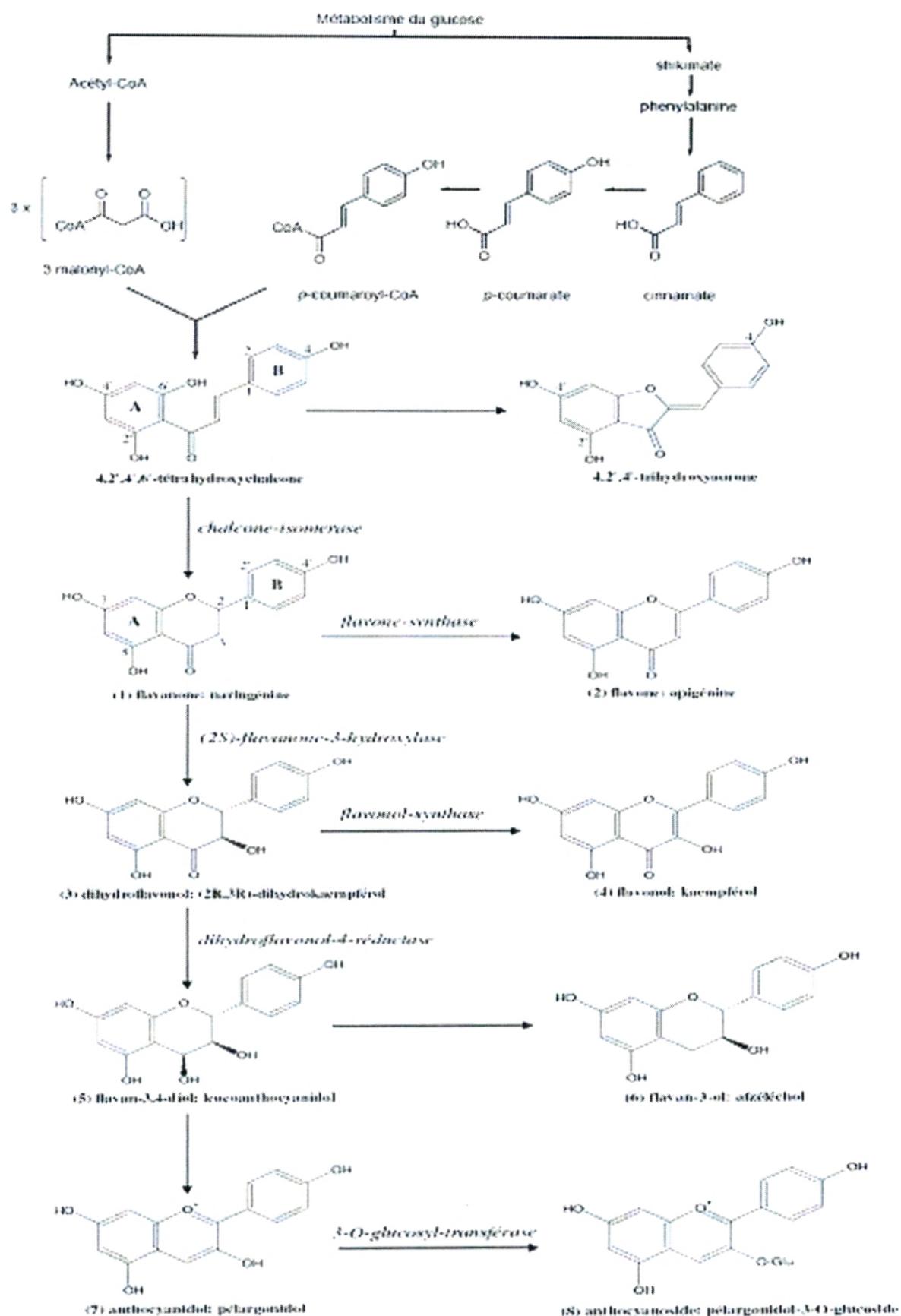


Figure 5 : Biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes (Bruneton, 1999).

IV. Classification

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Durant la biosynthèse, un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8 (**Bruneton, 1999**).

1. FLAVONES ET FLAVONOLS

Tous les types des flavonoïdes dérivent de la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4' (figure 5), cela étant, l'un d'entre eux peut être absent. Dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et flavonols (figure 6) est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés. D'autres substitutions sont possibles avec des fréquences variables: hydroxyles libres ou étherifiés en C-7 et/ou en C-8, méthylation en C-7 ou en C-8, implication du C-6 et/ou C-8 dans une liaison carbone-carbone avec un sucre.

D'autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3', 4', 5' -trisubstitué; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) comme peuvent être des méthoxyles (OCH₃). Les autres positions (C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées.

En plus, les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH en position C-3.

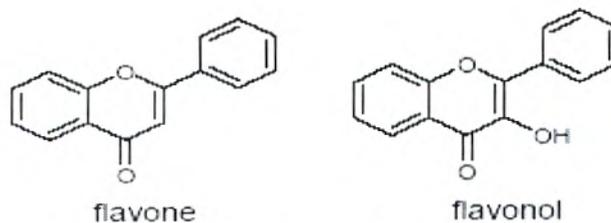


Figure 6 : Structure chimique d'une flavone et d'un flavonol

2. FLAVANONES ET DIHYDROFLAVONOLS

Les flavanones et les dihydroflavonols sont caractérisés par l'absence de la double liaison C2-C3 et par la présence de centres d'asymétrie (figure 7). Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les

dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3. Cette classe de flavonoïdes semble un peu moins fréquente que son homologue insaturé rassemblant les flavones et flavonols.

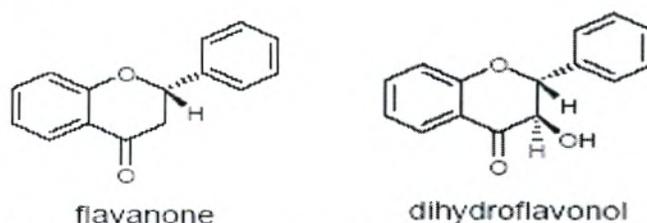


Figure 7 : Structure chimique d'une flavanone et d'un dihydroflavonol

3. FLAVAN-3-OLS, FLAVAN-3,4-DIOLS ET ANTHOCYANIDOLS

A la différence des classes de flavonoïdes décrits au-dessus, ces trois groupes de molécules sont toujours hydroxylés en position 3 et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C-4. Cette position peut être libre (cas des flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (cas des flavan-3,4-diols). Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont à l'origine des polymères flavaniques appelés proanthocyanidols ou tanins condensés.

Les anthocyanidols les plus fréquents sont le pélargonidol et le cyanidol. Les anthocyanosides sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le pélargonidol-3-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinose ou kéracyanine.

4. CHALCONES ET AURONES

Les chalcones sont différents des autres types de flavonoïdes cités au-dessus. De par l'ouverture du noyau pyranique central, elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α -, β -insaturée (figure 8). Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone.

Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes décrites précédemment (figure 8).

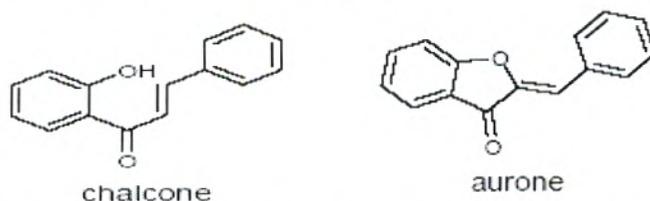


Figure 8 : Structure chimique d'un chalcone et d'une aurone

5. HÉTÉROSIDES FLAVONOÏQUE

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des végétaux. La partie osidique peut être mono-, di- ou trisaccharidiques et rarement tétrasaccharidiques. Les monosides sont formés par le D-glucose, mais aussi avec le D-galactose ou le D-allose, avec des pentoses ou avec les acides D-glucuronique et D-galacturonique.

La liaison entre la génine et l'ose peut se faire par l'un quelconque des hydroxyles phénoliques de la génine mais, en règle générale, ce sont surtout l'hydroxyle en C-7 des flavones et l'hydroxyle en C-3 des flavonols qui sont impliquées.

L'hydroxyle de la partie osidique peut être estérifié par un acide aliphatique (acétique, malonique, etc.) ou aromatique (gallique, 4-coumarique, etc.). Plus de 80 flavonoïdes sulfatés sont également connus.

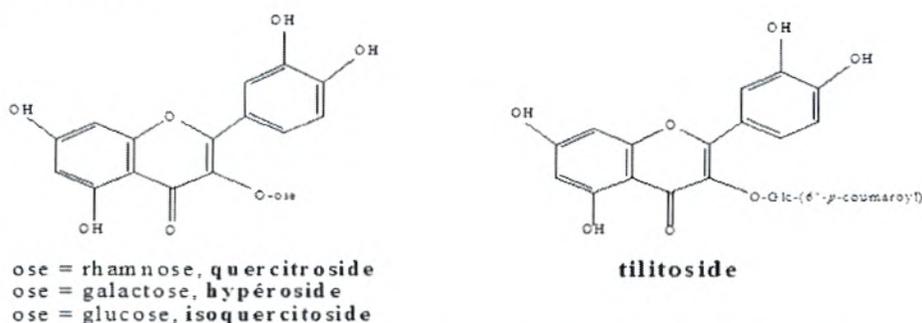


Figure 9 : Structure chimique de quelques hétérosides flavonoïdique

On retrouve aussi des C-hétérosides qui ne sont pas rares : on en connaît plus de 350. La liaison s'établit entre le carbone anomérique du sucre et le carbone C-6 ou C-8 de la génine (Lhuilier, 2007 ; Bruneton, 1999).

6. BIFLAVONOÏDES

Les flavonoïdes peuvent se lier les uns aux autres, en particulier par leurs carbones, très réactifs, C-6 ou C-8. Il se forme alors un dimère « un biflavonoïdes ».

La majorité des biflavonoïdes naturels sont des dimères de flavones et de flavonones généralement 5, 7, 4'-trisubstitués dont la liaison interflavanique peut être de type C-C ou de type C-O-C. Les deux unités constitutives du biflavonoïde peuvent être ou non du même type (bis-flavone, bis-flavonone, flavone-flavonone, flavone-chalcone). Les hydroxyles peuvent être libres ou méthylés. On ne connaît dans ce groupe, que peu de structure hétérosidique. Ce groupe de flavonoïdes est caractéristique des gymnospermes (Bruneton, 1999).

V. Source et importance dans l'alimentation

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. La présence de composés flavonoïdiques a été rapportée chez les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et chez les Angiospermes.

Cette distribution *quasi* ubiquitaire dans les plantes, en plus à leur relative stabilité, leur relative facilité d'identification et la forte tendance des plantes taxonomiquement proches à produire les mêmes types de flavonoïdes, a fait des flavonoïdes des marqueurs chimiotaxonomiques de choix pour la classification végétale (**Lhuillier, 2007**).

Leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes se répartissent volontiers dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) où ils sont localisés dans les tissus superficiels. Ils se répartissent aussi volontiers dans les racines.

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, hydrosolubles sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Cette présence est en grande partie influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales. D'autres facteurs tels que la saison, le climat, la germination, le degré de maturité, la variété, et le stockage ont également une influence sur la teneur de ces composés dans les plantes (**Lugasi et al., 2003 in Mohammedi, 2006**).

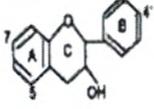
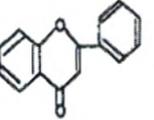
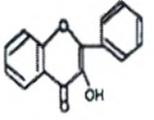
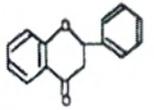
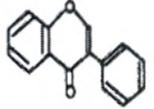
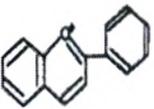
Les flavones apigénine et lutéoline sont très spécifiquement détectées dans les herbes aromatiques comme le persil, le thym, le romarin et le céleri. Pour ce dernier, les concentrations de ces deux flavones sont largement supérieures à celles présentes dans les tiges. Cependant, leurs analogues hydrogénés (flavanones), l'hespéridine et la naringénine sont exclusivement présents dans les agrumes. Dans les tomates, il y a autant de naringénine que de quercétine. Cette dernière se retrouve de façon majoritaire dans la quasi-totalité des végétaux. Le kaempférol, autre flavonol, y est également largement détecté. Les isoflavones sont largement distribuées dans des légumes comme le soja, les haricots verts, les haricots noirs et les pois.

Autres flavonoïdes souvent étudiés, les anthocyanes confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou bleutées.

Le monde animal est lui aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires (**Marfak, 2003**).

La plupart des flavonoïdes diététiques dans les aliments sont des 3 - O glycosides et des polymères (Heim *et al.*, 2002), mais peuvent également exister sous des formes aglycones. On estime que la prise moyenne des flavonoïdes par l'homme s'étend de 25 mg par jours à 1 g/jours (Wang et Mazza, 2002 in Mohammedi, 2006). Le tableau suivant regroupe la distribution nutritionnelle des différentes classes de flavonoïdes :

Tableau 1 : Classification, structure, et sources alimentaires de quelques Flavonoïdes (Heim *et al.*,2002)

Classes	Structure générale	Flavonoïdes	Substituants	Sources alimentaires
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate	Thé (camellia sinensis) Thé Thé
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoses 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose	peau des fruits Persil, Céleri Citron, peau de tomate piment rouge
Flavonol		kaempferol quercetin myricetin tamarixetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe	Poireau, brocoli Thé noir Oignon, laitue, brocoli Tomate, thé huile d'olive, peau de pomme Canneberge
Flavanone (dihydroflavon)		naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoses	Citron Citron Citron Citron Orange
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH	Soja Soja Soja Soja
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe	Fruits coloré Cerise, framboise, fraises

VI. Pharmacocinétique

Seuls les flavonoïdes sous forme de génines (ou aglycones) sont susceptibles d'être réabsorbés. L'hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) n'intervient que dans le côlon où les micro-organismes dégradent simultanément les flavonoïdes d'origine alimentaire. Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes réabsorbés. La muqueuse intestinale et le rein interviennent accessoirement dans ce métabolisme. Une fois réabsorbés, les flavonoïdes vont influencer plusieurs fonctions biologiques dont la synthèse protéique, la différenciation de la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, apportant des effets bénéfiques dans différentes pathologies chez l'Homme (Ghedira, 2005).

VII. Activités biologiques des flavonoïdes

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être «veinoactifs» c'est-à-dire d'être capable de réduire la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance.

De plus, quelques molécules de ces séries ont pu, au moins pour des posologies élevées, faire la preuve d'une certaine efficacité clinique. Actuellement, on s'intéresse surtout aux interactions flavonoïdes (comme antioxydants) avec les radicaux et à ses conséquences possibles en termes de prévention. Beaucoup de travaux s'efforcent également de cerner, *in vitro*, l'activité de ces molécules sur les cellules et les systèmes impliqués dans la réponse immunitaire et l'inflammation.

D'après Halliwell (Halliwell, 1994), les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- 1- Le piégeage direct des ROS.
- 2- L'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS.
- 3- La protection des systèmes de défense antioxydants.

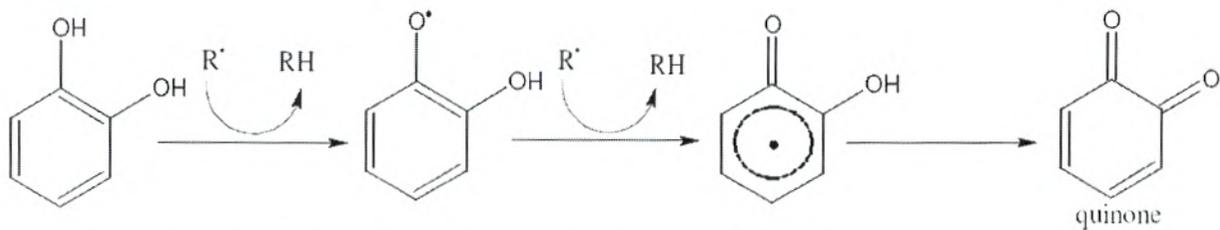
Les flavonoïdes sont ainsi de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique, ce qui est un élément important pour la protection des membranes cellulaires et qui complète les systèmes enzymatiques de défense cellulaire. De plus, ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer.

1. Propriété antioxydante et piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes sont des molécules capables de piéger de nombreuses espèces oxydatives comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le radical peroxy (ROO^{\cdot}) ou encore l'oxygène singlet (1O_2) (**Girotti-chanu, 2006**) et cela selon la réaction suivante :



A cause de leur fort potentiel redox, les flavonoïdes (FI-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxy, l'alkoxy et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Où R[·] représente l'anion superoxyde, le peroxy, l'alkoxy et l'hydroxyle

Figure 10 : Piégeage des ROS (R[·]) par les flavonoïdes (marfak, 2003).

Le radical flavonoxy (FL-O[·]) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable.

En outre, le radical flavonoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant indésirable des flavonoïdes. Nous constatons que la capacité des flavonoïdes d'agir comme antioxydants dépend non seulement du potentiel redox du couple FI-O[·]/FL-OH mais aussi de la réactivité du radical flavonoxy (**marfak, 2003**).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures-activités des flavonoïdes (**Rice-Evans et al., 1995 ; Van Acker et al., 1996; Harborne et Williams, 2000; Bors et al., 2001 ; Heim et al., 2002 ; Hsiao et al., 2007**). Ces études permettent de connaître les activités anti-oxydantes de ces molécules en fonction de leurs caractéristiques structurales. Ainsi, les composés possédant un groupement carbonyle en C4 et une double liaison entre les carbones C2 et C3 sont les flavonoïdes dont les activités anti-oxydantes sont les plus marquées, il en est de même pour les molécules où la délocalisation des électrons peut

se réaliser de façon aisée. Par ailleurs, la présence d'un groupement hydroxyle en position C3 et C3' ainsi qu'un nombre important de résidus hydroxyles augmenteraient le potentiel antioxydant de ces molécules (Harborne et Williams, 2000 ; Girotti-Chanu, 2006).

Après des travaux menés toujours sur la relation structure-activité de ces molécules, les résultats obtenus ont permis de conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- 1- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- 2- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- 3- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

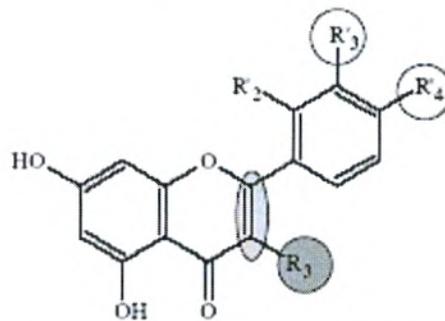


Figure 11 : Éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la peroxydation des lipides et l'oxydation des LDL (*Low Density Lipoprotein*) induite par les ions cuivrique et les macrophages. Ils sont aussi capables d'inhiber la myéloperoxydase qui a le pouvoir d'oxyder les LDL (Halliwell, 2008).

Cependant, leur teneur dans les lipoprotéines est mal connue. A la différence d'autres antioxydants incorporés dans les lipoprotéines tels que l' α -tocophérol, le β -carotène, le lycopène. On considère que la lipoperoxydation peut démarrer lorsque ces antioxydants sont épuisés. La question se pose de savoir dans quelle mesure les composés natifs (flavonoïdes ou acides phénoliques) ou des métabolites liposolubles provenant des polyphénols peuvent s'incorporer dans les LDL, agir en synergie ou remplacer les autres antioxydants normalement présents dans ces particules. Si leur biodisponibilité était suffisante, les flavonoïdes auraient la capacité d'interagir avec les radicaux libres empêchant ainsi la dégradation des antioxydants endogènes.

D'après une enquête récente, la présence des flavonoïdes en quantité importante dans l'alimentation diminue de 68% les risques cardiovasculaires par rapport à une alimentation qui en est faiblement pourvue. Parmi les composés les plus antioxydants, on peut citer l'épigallocatechine gallate, la catéchine, la quercétine, la lutéoline, la myricétine et l'apigénine mais aussi des acides phénoliques tels que les acides caféique et chlorogénique (**Hertog *et al.*, 1993 in Milane, 2004**). Dans des études ultérieures, les catéchines du thé ont été indiquées de forte activité dans des membranes d'érythrocyte et dans des microsomes de foie de rat avec une plus grande protection contre l'oxydation de lipide par l'épigallocatechine gallate et l'épicatéchine gallate, ce dernier étant 10 fois plus efficace que la vitamine E (**Rice-Evans, 1995**).

2. Inhibiteurs Enzymatiques

- Certains flavonoïdes ont la capacité d'inhiber des enzymes clés de la respiration mitochondriale, en particulier la NADH oxydase (**Girotti-Chanu, 2006**).
- Quelques flavonoïdes inhibent aussi l'enzyme xanthine oxydase qui catalyse l'oxydation de la xanthine et hypoxanthine en acide urique (**Iio *et al.*, 1985 ; Harborne et Williams, 2000**). Dans une étude sur la maladie de la goutte, Hansaki et ses collaborateurs, ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (**Hansaki, 1994 in marfak, 2003**).
- Ils sont des inhibiteurs de l'histidine-décarboxylase par le quercétol ou la naringénine ;
- Inhibiteurs de l'élastase ;
- Inhibiteurs de l'hyluronidase, par les flavones et surtout par les proanthocyanidols, ce qui permet de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire ;
- Inhibiteurs non spécifique de la catéchol-*O*-méthyltransférase, ce qui augmenterait la quantité de catécholamines disponible et donc provoquerait une élévation de la résistance vasculaire ;
- Inhibiteurs de la phosphodiesterase de l'AMPc ce qui pourrait expliquer leurs activité antiagrégante plaquettaire ;
- Inhibiteurs de l'aldose-réductase – on sait qu'elle est impliquée dans la pathogénie de la cataracte– par le quercitroside ainsi que par des méthylflavones ;
- Plusieurs flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase et donc de la production des leucotriènes médiateurs de l'inflammation et des manifestations allergiques

D'autres flavonoïdes inhibent quant à eux la cyclo-oxygénase et l'agrégation plaquettaire **(Bruneton, 1999)**.

- Les kinases sont des enzymes intervenant dans de multiples voies de signalisation. Ainsi, la protéine kinase C (PKC) participe notamment au processus inflammatoire, au processus sécrétoire ainsi qu'à la fonction lymphocytaire. Cette enzyme est inhibée par la quercétine, la fisétine et la lutéoline. Les protéines kinases (PK) sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation comme la régulation, la transformation et la croissance cellulaire, le déplacement cellulaire, l'adhésion cellulaire. La génistéine et la quercétine inhibent ces enzymes **(Girotti-Chanu, 2006)**.

Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique : c'est le cas de la proline-hydroxylase. Cette stimulation favoriserait l'établissement des pontages entre les fibres de collagène, renforçant ainsi leur solidité et leur stabilité, s'opposant à leur dénaturation **(Bruneton, 1999)**.

3. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, et Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques. Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs sur la chélation du fer par certains flavonoïdes, ont montré les résultats suivants:

_ Le flavonol (3, 5-OH; 7, 3', 4'-OEtOH) possède une activité supérieure à celle du (3-OGlu; 5-OH; 7, 3', 4' -OEtOH), ce qui indique l'importance du groupement 3-OH.

_ Le (3-OGlu, 5-OH; 7, 4'-OEtOH; 3' -OH) est moins actif que le (3-OGlu, 5-OH; 7-OEtOH; 3', 4'-OH). Ceci démontre l'efficacité d'un groupement catéchol sur le cycle B (3',4'-OH).

_ La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés dans ce travail.

On peut résumer les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques en :

- (i) un noyau catéchol sur le cycle B,
- (ii) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et

(iii) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Van Acker, 1996 ; marfak, 2003).

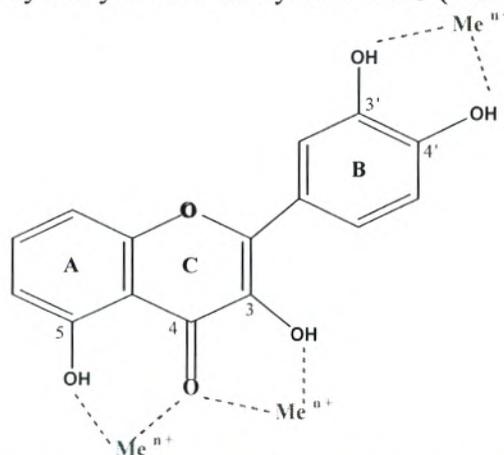


Figure 12 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Meⁿ⁺).

4. Effet protecteur vasculaire

L'endothélium vasculaire est extrêmement sensible aux dommages oxydatifs générés par les ROS, libérées notamment par les cellules inflammatoires. Les flavonoïdes agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique « P », qu'on a précédemment mentionnait. Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale. Ils sont, de ce fait, utilisés dans certains états pathologiques caractérisés par un défaut affectant cette perméabilité. Deux flavonoïdes, la citrine et l'hespéridine diminuent de façon importante la perméabilité capillaire. Les flavonoïdes hespéridine et hespéretine (connus aussi sous le terme citroflavonoïdes) exercent des propriétés vasorelaxantes par action sur le système du cytochrome P450 en limitant la production d'ions superoxydes (Ghedira, 2005). La quercétine et la silybine exercent des effets vasculaires protecteurs en diminuant la production d'espèces radicalaires par inhibition de la xanthine oxydase. Les effets de l'O-β-hydroxyéthyl rutoside (HR) ont été étudiés chez des patients présentant une insuffisance veineuse chronique : un traitement à base de HR a permis de restaurer les paramètres hémorhéologiques altérés. D'autres flavonoïdes sont responsables d'une augmentation de la résistance des capillaires. Cette activité serait en rapport avec les effets de certains flavonoïdes sur les plaquettes, les leucocytes et sur les enzymes intervenant dans la coagulation sanguine (Girotti-Chanu, 2006).

5. Propriétés anti-inflammatoires et effets sur le système immunitaire.

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés

anti-inflammatoires (**Galati et al., 1994 ; Read, 1995 ; Gallego et al., 2007 ; Campos et al., 2007 ; Shaghghi et al., 2008**) et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T. Cet effet des flavonoïdes sur les lymphocytes B ou T peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B. L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase).

Les flavonoïdes inhibent également l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. L'hispiduline, une méthoxyflavone, diminue par exemple l'agrégation plaquettaire en augmentant les taux intracellulaires en AMPc à la suite d'une inhibition des phosphodiésterases. En effet, l'accumulation d'AMPc plaquettaire semble interférer avec la mobilisation de Ca^{2+} impliquée dans l'agrégation de ces cellules (**Bourdillat et al., 1988 In Milane, 2004**).

L'acide arachidonique peut être métabolisé par la voie de la lipo-oxygénase pour aboutir à la formation de leucotriènes et par la voie de la cyclo-oxygénase pour produire des thromboxanes et des prostaglandines, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoire. Le cirsiol et la baicaléine inhibent la 5-lipoxygénase. Les flavonoïdes lutéoline, morine, galangine et catéchine inhibent de façon modérée la cyclo-oxygénase ; la chrysin, l'apigénine et la phlorétine diminuent l'activité cyclo-oxygénase (**Girotti-Chanu, 2006**). La quercétine et la myricétine, à fortes concentrations, inhibent la cyclooxygénase et la lipoxygénase. Cependant à de faibles concentrations, seule la lipo-oxygénase est affectée (**marfak, 2003**).

6. Effets Anti-allergiques

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ces effets sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles : l'AMPc phosphodiésterase et la ATPase Ca^{2+} -dépendante. Par exemple, l'ATPase Ca^{2+} -dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un

potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (Marfak, 2003 ; Ghedira, 2005).

7. Propriétés antivirales et antibactériennes

Des propriétés antibactériennes et antivirales des flavonoïdes vis-à-vis de différentes souches bactériennes ont également été mises en évidence (Jassim *et Naji*, 2003; Basile, 2005; Pereira, 2007; Özkan, 2007; Almajano, 2008). Les flavonoïdes atténuent le pouvoir infectieux ou affectent la replication intracellulaire d'autres virus tels que le virus respiratoire syncytial (VRS), l'herpès simplex virus (HSV) et les adénovirus (Ghedira, 2005).

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales. Ce mécanisme semble être impliqué dans la protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours. D'autres études ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMPc dans des cellules infectées.

Les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase. Une étude récente a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *Staphylococcus aureus* (Sato *et al.*, 1995 In Milane, 2003).

8. Propriétés anti-carcinogènes

Plusieurs travaux ont cité l'activité anticancéreuse des flavonoïdes (Cai *et al.*, 2004; Al-Fayez *et al.*, 2006 ; Hsiao *et al.*, 2007) et plusieurs études ont été menées sur cette propriété. Une étude a montré que la quercétine est capable de diminuer, chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenzantracène) ou la NMU (N-nitrosom éthylurée).

L'action antitumorale de la quercétine pourrait aussi s'expliquer par une interaction de celle-ci avec le complexe calcium-calmoduline qui jouerait aussi un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux carcinogènes.

En donnant à des rats ou à des souris une alimentation contenant de la flavone ou de la quercétine, on peut observer des effets chimiopréventifs à divers niveaux, et en particulier au niveau du foie par une stimulation de la glutathion-S-transférase. Les résultats dans ce

domaine sont difficiles à interpréter car les flavonoïdes semblent avoir des effets divers sur l'activité des enzymes de détoxification (Nijhoff *et al.*, 1995 *In Milane*, 2004).

Les propriétés antitumorales du thé ont été mises en évidence dans de nombreuses études réalisées sur un modèle animal tant *in vitro* qu'*in vivo*. Les effets favorables du thé sur la tumorigenèse et sur l'inhibition de la croissance des tumeurs sont attribués aux catéchines et flavanols présents dans le thé. Des études expérimentales ont mis en évidence que l'administration orale de thé (sous forme d'infusion) ou de ces polyphénols, chez des rats et des souris, réduisent, de la même façon, la fréquence d'apparition des tumeurs et favorise la réduction de la croissance des tumeurs induites par des carcinogènes (Edeas, 2007).

Autres propriétés des flavonoïdes

Des flavonoïdes issus de *Silybum marianum* (chardon marie) ont été utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle dans le traitement des affections hépatiques. Les principes actifs de l'extrait sont constitués d'un mélange complexe (constitué de composés de type flavolignane et flavanone) appelé silymarine. Testée sur un modèle expérimental animal, la silymarine a montré qu'elle exerce un effet positif sur les hépatocytes intacts et sur les cellules hépatiques endommagées irréversiblement, agissant sur la membrane cellulaire, prévenant l'entrée des substances toxiques, et qu'elle stimule la capacité régénérative des cellules hépatique après hépatectomie partielle. L'activité hépatoprotectrice de la silybine, principale flavolignane rencontrée dans la silymarine, a été évaluée chez des souris intoxiquées par des doses non thérapeutiques d'acétaminophène. Ce flavonoïde s'est révélé hépatoprotecteur, mais le mécanisme d'action de cette protection n'est pas encore bien élucidé (Ghedira, 2005).

Depuis le début des années 80, les effets bénéfiques des flavonoïdes sur le diabète a été élucidé. Récemment, il a été montré que la quercétine et l'épicatéchine, deux des flavonoïdes les plus abondants chez les végétaux, sont capable d'inhiber les effets délétères du streptozotocine (STZ) sur les cellules β des îlots pancréatiques. Ils inhiberaient l'induction d'une hyperglycémie par le STZ et sa destruction des cellules pancréatiques β du rat, et aussi bloqueraient l'induction du STZ à la production du NO et son inhibition à la synthèse de l'insuline par des îlots pancréatiques isolées. Le silymarine, montre son capacité à inhiber la production de cytokines inflammatoires issues des macrophages et des cellules T, qui sont probablement les initiateurs de la destruction des cellules β au cours du développement d'un diabète de type 1. Cette étude révèle que les flavonoïdes pourraient protéger les cellules β par

un ou plusieurs mécanismes tels le piégeage des ROS et le maintien du taux élevé en glutathion (Ardestani et Yazdanparast, 2007 In press).

Chapitre Trois : **Les espèces végétales**

A. Etude Botanique de l'*Arbutus unedo* L.

I. La famille des Ericacées

Grande famille cosmopolite représentée par 124 genres (dont *Arbutus* (arbousier), *Calluna* (calune), *Erica* (bruyère) et *Rhododendron*) et environ 4100 espèces, les *Ericaceae* prédominent en Arctique, dans les régions tempérées et dans les montagnes tropicales et extratropicales du sud-est de l'Asie et d'Amérique avec une forte concentration dans l'Himalaya, en Nouvelle-Guinée et dans les Andes. En général, la plus grande densité ainsi que la plus grande diversité des *Ericaceae* se retrouve sous les climats méditerranéens (Meberley, 1987 ; Stevens *et al.*, 2004 In Lhuillier, 2007). Le nom Ericacée dérive du latin scientifique *Erica*, du latin impérial *Erica*. Cette famille appartient aux dicotylédones (Dib, 2008).

De nombreux genres et espèces d'*Ericaceae* sont cultivés comme plantes ornementales (*Rhododendron*, *Calluna*, *Erica*...). Il est également fait mention de nombreuses utilisations d'*Ericaceae* dans les pharmacopées traditionnelles. Les infusions de feuilles de *Rhododendron*, *Vaccinium arctostaphylos* L. et *Gaultheria procumbens* L. représentaient une importante source d'acide salicylique avant sa production par synthèse. On peut citer également *Arbutus unedo* L., anti-diarrhéique et anti-inflammatoire, *Calluna vulgaris* L. et *Arctostaphylos uva-ursi* Spreng, plantes astringentes et antiseptiques urinaires (Spichiger *et al.*, 2000 In Lhuillier, 2007).

II. Le genre *Arbutus* :

Le genre *Arbutus* comporte 14 espèces disséminées dans les régions tempérées et fraîches de l'hémisphère nord et en Amérique tropicale. Sur le continent européen, nous distinguons deux espèces d'arbousiers : *Arbutus unedo* L. et *Arbutus andrachnoïdes* L. Ce dernier est cantonné aux régions du pourtour de la mer Égée et en particulier en Grèce et au sud de l'Albanie. Quant à l'*Arbutus unedo* L., il est réparti sur la méditerranée et l'atlantique (Dib, 2008).

III. L'Arbousier *Arbutus unedo* L.

1. Description Botanique de l'*Arbutus unedo* L.

L'arbousier, ou arbres aux fraises, petit ligneux méridional, n'est en fait qu'un arbuste, voire un arbrisseau. Il de croissance relativement lente, très décoratif par son écorce, son port, son feuillage persistant, sa floraison, et sa fructification et qui peut de temps en temps atteindre 9 mètres de long et 8 mètres de large, bien qu'il soit habituellement un peu plus petit

(de 2 à 4 m de hauteur) (www.tous-les-fruits.com, 2007). Bien que son fruit soit comestible, on ne cherchera pas particulièrement à le planter en tant qu'arbre fruitier (son nom d'espèce est tiré du latin unedo, "je n'en mange qu'une fois").

Cet arbuste rameux, est capable de vivre 200 ans dans des bois et rochers du Midi de la France, d'Europe Méridionale, d'Asie Occidentale et du Nord de l'Afrique (**Boullard, 2001**).

C'est un arbre très intéressant parce qu'il résiste bien aux gels jusqu'à des températures de -12°C jusqu'à -15°C , et qu'il s'adapte à une très large gamme de sols et d'expositions. Il pousse en plein soleil, voire en arbre de sous-bois et il supporte le calcaire (**Morris, 2007**), Il se développe également bien dans les sols argileux et dans les sols secs. C'est un très bon arbuste qui peut se développer dans les villes parce qu'il tolère la pollution industrielle (www.tous-les-fruits.com, 2007).



Figure 13 : *Arbutus unedo* L. (l'arbuste)
(www.plantifolia.fr, 2006)

Les feuilles de l'arbousier persistantes, ovales-lancéolées, sont coriaces, glabres et luisantes. Il produit de belles fleurs blanches en novembre et décembre (www.tous-les-fruits.com, 2007) en forme de clochettes regroupées en panicules terminales, régulières, bisexuées, calice à lobes triangulaires très courts, corolle en grelot, rétrécie au sommet du tube d'un blanc-rosé ou verdâtre (**Quezel et Santa, 1963 ; Boullard, 1997 ; Boullard, 2001**). C'est un arbuste très décoratif puisque le fruit prend 12 mois pour mûrir, alors l'arbre porte le fruit et les fleurs en même temps.



Figure 14 : Le fruit (rouge) et les fleurs (blanches) de l'arbousier
(www.crdp2.ac-besancon.fr, 2004)

Le fruit, l'arbose, varie considérablement dans la taille, bien qu'il fasse la moyenne de 1 à 2 cm de diamètre. C'est une jolie baie sphérique rouge, vu en distance, il ressemble aux fraises mais cette ressemblance ne s'applique pas au goût. Parfois orangée, elle est toujours hérissée de courts tubercules pyramidaux et renferme de nombreuses graines. Ce fruit s'emploie en confiture puisque frais il n'est pas aussi agréable au goût (Boullard, 1997 ; 2001 ; Iserin, 2001).

Les arbousiers constituent le genre *Arbutus* de la famille des Ericacées. L'arbousier de Méditerranée a pour nom scientifique *Arbutus unedo*, et celui d'Amérique du Nord *A. menziesii* (Encarta, 2007).

2. Classification classique

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement : Eudicots

Classe : Magnoliopsidées

Sous-classe : Astéridées

Ordre : Ericales

Famille : Ericacées

Genre : *Arbutus*

Espèce : *Arbutus unedo* L. (Guignard, 2001; Judd *et al.*, 2002 ; Quezel et Santa, 1963).

3. Histoire et traditions

C'est l'Arbousier, l'Arbre aux Fraises, Fraisier en Arbre, Olonier...(Boullard, 2001).

D'après Daoud EL ANTAKE, dans son œuvre «TADHKIRA» le nom classique de l'arbousier est Djina. Il est mentionné par Ibn EL BAYTAR avec une bien curieuse expression qatil abihi « meurtrier de son père ». Il explique que c'est à cause de ses fruits qui n'ont pas le temps de se dessécher, qu'une pousse est déjà prête d'éclore (**Baba-Aissa, 2000 in Dib, 2008**). Cette expression est aussi indiquée par Abderrazaq EL DJAZAIRI dans son livre avec deux autres synonymes : Lendj et Sassnou (**Djazairi, 1960**).

4. Propriétés et usages :

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

La racine d'Arbousier serait un désinfectant des voies urinaires grâce à l'arbutoside qu'elle renferme (**Boullard, 2001 ; Iserin, 2001**). Cet arbutoside, ou arbutine, est un β -glucoside de l'hydroxyquinone. On utilise la racine pour soigner des blennorragies. Les feuilles persistantes dentées et écorce rougeâtre sont tenues pour antiseptiques, antispasmodiques et astringentes (par leur teneur en tanin), aussi les recommande-t-on en cas de diarrhée ou d'engorgement du foie.

Quant à l'eau-de-vie d'arouses, elle possède des propriétés digestives et stomachiques cependant que l'on tient les confitures pour astringentes (**Boullard, 2001**).

L'*A.unedo* est fréquemment utilisé dans la médecine traditionnelle au Maroc Orientale comme un remède naturel pour l'hypertension et le diabète (**El houari, 2007**).

Un thé préparé depuis les feuilles est utilisé comme diurétique en Turquie (**Pabuçcuoğlu, 2003**).

Dans la médecine traditionnelle, il est rapporté que le fruit de l'*A. unedo* possède des propriétés astringente, diurétique et antiseptique (**Özcan et Haciseferoğullari, 2007**).

Attention :

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

Bellakhdar (1997) souligne la nécessité de respecter les doses d'arouses consommées car : elles sont antidiarrhéiques en petite quantité, et deviennent purgatives en grande quantité (**Boullard, 2001**).

5. Travaux antérieurs sur l'*Arbutus unedo* L.

Le fruit contient une grande concentration de glucides, de 42% à 52% (Ayaz *et al.*, 2000). C'est une très bonne source de minéraux comme il est spécialement riche en calcium (Özcan *et Haciseferoğullari*, 2007). Les acides lactique, malique, subérique and fumarique ont été identifiés en plus des acides phénoliques comme les acides gallique, protocatechique, gentisique, p-hydroxybenzoïque, vanillique et m-anisique. La teneur en phénols totaux est estimée par Alarcao-E-Silva *et al.* (2001) à 14,6 mg/g de fruit sec, dont 1,01 mg/g sont des anthocyanines. Les tannins avec les autres composés phénoliques contribueraient au goût amer du fruit. Parmi les anthocyanines, la cyanidine a été identifié comme étant le principal contribuant à la couleur rouge caractéristique du fruit. D'autres flavonoïdes ont été découverts comme l'anthocyanine delphinidine-galactoside et les flavonols quercétine et kaempferol (Pallauf *et al.*, 2008).

Une forte activité antioxydante a été mise en évidence par Pabuccuoglu *et ces collaborateurs* en 2003 sur les extraits méthanoliques et éthanoliques des feuilles de l'*A.unedo* par une méthode basée sur la décolorisation du radical ABTS^{•+} [l'acide 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)], et il a été conclu que les glycosides flavonols et les tannins sont les principes actifs responsables de cette activité (Pabuçcuoğlu, 2003).

Dans une étude récemment faite, il a été montré que l'extrait aqueux de l'*A. unedo* inhibe *in vitro* l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine et l'ADP (Mekhfi *et al.*, 2004).

Une autre étude a montré que les extraits aqueux, d'acétate d'éthyle et d'éther diéthylique des feuilles de l'arbousier *in vitro* ont un effet anti-agrégant plaquettaire qui est dû à l'atténuation de la mobilisation de Ca²⁺ dans les cellules, la production des ROS, et à la phosphorylation des protéines à tyrosine. Ils concluent enfin que les extraits de l'*A. unedo* peuvent être utilisés pour le traitement et/ou la prévention des maladies cardiovasculaires (El houari *et al.*, 2007)

Plusieurs composés ont été isolés à partir de l'*A. unedo*, des acides aromatiques, les iridoïdes, les monoterpénoïdes, les phenylpropanoïdes, les stérols, les triterpénoïdes et les flavonoïdes (Carcache-Blanco *et al.*, 2006 In El houari *et al.*, 2007).

Par la chromatographie sur couche mince, Z. Males *et al.*, en 2006 ont fait la séparation des flavonoïdes et des acides phénoliques des feuilles et du fruit de l'*A. unedo*. Dans les feuilles ils ont indiqué la présence de la quercétine, l'isoquercétine, l'hyperoside et la rutine. L'acide chlorogénique a aussi été identifié, et que le fruit contenait seulement

l'isoquercétine. La détermination spectrophotométrique a indiqué que les feuilles sont plus riche en flavonoïdes que les fruits (**Maleš et al., 2006**).

Une étude phytochimique précédemment faite par Dauguet and Foucher en 1982 sur *l'A. unedo* a mis en évidence un nombre de composés tel que les flavans, les stéroïdes et les terpenoïdes. Les feuilles de l'arbousier ont été étudiées pour déterminer leur composition en flavonoïdes, et cinq flavonols glycosides ont été isolés et identifiés : afzelin (kaempferol 3-rhamnoside), juglanin (kaempferol 3-arabinoside), avicularin (quercetin 3-arabinofuranoside), quercitrin (quercetin 3-rhamnoside), et hyperin (quercetin 3-galactoside).

De plus, quelques irridoïds glycosides ont aussi été isolés à partir de l'extrait organique de la plante et l'étude menée par Fiorentino *et al.*, en 2007 a confirmé la présence de ces composés (**Fiorentino et al., 2007**).

Une autre étude faite sur la caractérisation des composés chimiques de cette plante et leurs effets sur la nitrification du sol. Les métabolites purifiées à partir de l'extrait hydroalcoolique par les différentes techniques chromatographiques (CC, FCC, CCM, HPLC) et caractérisé par les différentes méthodes spectroscopiques et spectrométriques (UV-visible, RMN, SM) sont l'ethyl gallate, l'arbutine et ces dérivées p-hydroxybenzoyl et galloyl, la (+)-gallocatéchine et la catéchine, six flavonoïdes glycosides caractérisé par le kaempferol, la quercitine et la myricétine comme aglycones, et par un rhamnopyranose ou un arabinofuranose comme unités glycone. Les mêmes composés ont été retrouvés dans les fractions méthanoliques et aqueuses mais à des quantités différentes, la gallocatéchine était le composé le plus abondant dans la fraction aqueuse. Les extraits des racines ont présenté aussi les mêmes constituants, à l'exception d'une infime quantité en flavones, mais aussi la gallocatéchine était le composé le plus abondant (**Castaldi et al., 2008**).

Le fruit de l'Arbousier est généralement consommé après traitement, mais peut être une bonne source d'antioxydants s'il est consommé frais, et cela a été prouvé par K. Pallauf, *et al.*, (**Pallauf et al., 2008**) qui ont trouvé qu'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. Les anthocyanines sont aussi présents : les glycosides de cyanidine et de delphinine, avec le cyanidine-3-galactoside qui est le plus abondant. D'autres antioxydants sont présents dans ce fruit tel que l'acide ellagique et ces dérivés diglucosidiques. La vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes ont aussi été identifiées.

Tableau 2 :Composition en composés antioxydant du fruit de l'*Arbutus unedo* (Pallauf *et al.*, 2008)

Données sur la composition du fruit d' <i>Arbutus unedo</i>	
Teneur (mg) pour 100g de portion comestible	Teneur
Anthocyanins	3.77 ± 0.856
Delphinidin-3-galactoside	0.38 ± 0.112
Cyanidin-3-galactoside	2.84 ± 0.935
Cyanidin-3-glucoside	0.12 ± 0.025
Cyanidin-3-arabinoside	0.41 ± 0.133
Ellagic acid derivatives	1.54 ± 0.162
Ellagic acid diglucoside	0.22 ± 0.062
Ellagic acid glucoside	0.46 ± 0.019
Methylellagic acid rhamnoside + ellagic acid arabinoside	0.24 ± 0.040
Ellagic acid xyloside	0.29 ± 0.454
Flavonols	1.14 ± 0.346
Myricetin-3-xyloside	0.17 ± 0.012
Quercetin-3-rutinoside	0.15 ± 0.001
Quercetin-3-xyloside	0.52 ± 0.031
Quercetin-3-rhamnoside	0.29 ± 0.454
Proanthocyanidins	27.46 ± 0.989
Gallocatechin	3.64 ± 0.795
Gallocatechin-4,8-catechin	1.87 ± 0.254
Catechin	4.16 ± 0.854
Epicatechin	2.89 ± 0.237
Ec-Ec-C	0.41 ± 0.052
Ec-Ec-Ec	4.52 ± 0.874
Others	
Vitamin C, total	6.03 ± 0.15
Ascorbic acid	5.50 ± 0.147
Vitamin E (α -tocopherol)	0.023 ± 0.001
Carotenoids (total)	0.064 ± 0.014
β -carotene	0.025 ± 0.007
Lutein + zeaxanthine	0.042 ± 0.009
β -Cryptoxanthine	Traces

Avec Ec= Epicatechine; C= Catéchine .

Sous-Classe: Rosidées

Ordre: Malvales

Famille: *Thyméléacées*

Genre: *Daphne*

Espèce : *Daphne gnidium* L. (**Guignard, 2001 ; Judd et al., 2002 ; Quezel et Santa, 1963**).

3- Histoire et traditions

Les plantes du genre *Daphne* portent le nom de la nymphe qui, poursuivie par Apollon fut métamorphosée en laurier, en raison de certaines ressemblance avec ce dernier —l'aspect des feuilles en particulier.

Gnidium (ou *Cnidium*), indique l'origine supposée du Garou —la région d'Asie mineur, où se trouvait la cité antique de Cnide (**Beniston N.T., et W.S., 1984**).

D'après Abderrazaq EL DJAZAIRI a rapporté dans son livre différents noms vernaculaires au *Daphné* à savoir : Assas, Azaz, Lazaz et aussi Math'nen (**Djazairi, 1960**).

De tous les temps (et surtout au Moyen Âge) l'écorce des rameaux fut recommandée pour soigner les affections de la peau (antiseptique) et divers troubles vénériens. Jusqu'en des temps récents, elle demeura un remède populaire en qualité de drogue vésicante (encore qu'elle provoque assez souvent l'apparition de cloques sur la peau). Enfin, on la tint pour purgative, sudorifique et même abortive.

Pareillement, dès l'Antiquité, feuilles et fruits furent utilisés comme purgatifs (énergiques) et Galien les recommandait en cas de troubles biliaires.

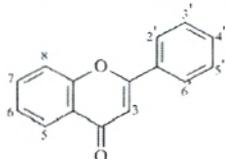
Mais la répétition d'accidents, dus à la toxicité des divers organes du Garou a fait renoncer à leur emploi (surtout en usage interne) (**Beniston N.T., et W.S., 1984 ; Boullard, 2001**). Cette plante est aussi habituellement utilisée comme teinture pour les textiles et les cheveux (**Nowik, 2005**).

4-Travaux antérieur sur le *Daphne gnidium* L.

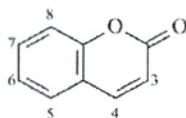
La composition des principaux flavonoïdes et coumarines du *D. gnidium* est un peu mieux connu. Selon les données publier, les composés suivants peuvent être présent : apigénine, apigénine7-O-glucoside, genkwanine, genkwanine5-O-β-D-primeveroside, luteoline, luteoline7-O-glucoside, orientine, isoorientine, quercétine, 2,5,7,4'-

tétrahydroxyisoflavonol, acétylumbelliférol, daphnine, daphnetine, daphnetine-8-O-glucoside et la daphnoretine, et également l' α -tocophérol (Nowik, 2005).

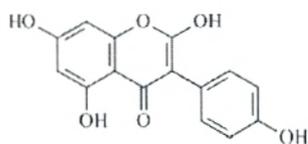
Tableau 3 : Les flavonoïdes (1-9) et les coumarines (10-13) du *D. gnidium* (Nowik, 2005).



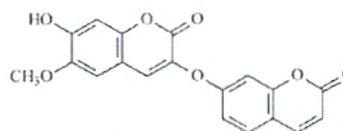
N°	Composés	3	5	6	7	8	3'	4'
1	Apigénin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH
2	Api-7-O-glucoside	-H	-OH	-H	-O-glucosyl	-H	-H	-OH
3	Lutéolin	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-OH
4	Lut-7-O-glucoside	-H	-OH	-H	-O-glucosyl	-H	-OH	-OH
5	Quercétin	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-OH
6	Orientin	-H	-OH	-H	-OH	-glucosyl	-OH	-OH
7	Isoorientin	-H	-OH	-glucosyl	-OH	-H	-OH	-OH
8	Genkwanin	-H	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OH
9	Gen-5-O-primeveroside	-H	-O-xyloglucosyl	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OH



N°	Composés	7	8
10	Acétylumbelliférol	-OCOCH ₃	-H
11	Daphnetin	-OH	-OH
12	Daphnin	-O-glucosyl	-OH
13	Dap-8-O-glucoside	-OH	-O-glucosyl



2,5,7,4'-tétrahydroxyisoflavonol



Daphnoretine

Une étude a été menée sur la caractérisation qualitative de l'extrait brute aqueux des feuilles et des tiges du *D. gnidium* où ils ont utilisé la HPLC-PDA en employant deux différentes phases stationnaire C-18. Les résultats ont confirmé la présence des flavonoïdes et des coumarines citées dans la littérature. L'étude a montré que l'extrait de tiges est riche en coumarines qu'en flavonoïdes (Nowik, 2005).

D'autres chercheurs ont mis en évidence l'activité antioxydante du *Daphne gnidium* en utilisant les extraits méthanoliques des feuilles et des tiges et de leurs constituants principaux. Ils ont testé la capacité du Daphné à inhiber la peroxydation lipidique *in vitro* en employant les systèmes d'auto-oxydation et de l'oxydation par l'intermédiaire du fer ou de l'EDTA de l'acide linoléique. Ils ont conclu que l'apigénine n'est pas d'actif dans aucun des systèmes utilisés, mais les autres extraits testés ont montré une activité dans l'ordre suivant : la lutéoline > la daphnetine > l' α -tocopherol > l'extrait des feuilles > l'extrait des tiges > la daphnoretine **(Deiana et al., 2003)**.

L'activité antimicrobienne des tiges du *D.gnidium* a aussi été testée par F. Cottiglia et ces collaborateurs où ils ont pris l'extrait méthanolique des tiges et ils l'ont testé sur des bactéries et des champignons. L'extrait a présenté une activité antibactérienne contre *Bacillus lentus* et *Escherichia coli* mais il été inactif contre les champignons.

Les flavonoïdes et coumarines des extraits de la plante ont aussi été testé, et les plus actifs d'entre eux était la daphnetine, la genkwanine, et la 2,5,7,4'-tétrahydroxyisoflavonol **(Cottiglia et al., 2001)**.

Une autre étude a été menée sur l'évaluation de la tolérance des lapins sur l'application topique des extraits méthanoliques de l'écorce et des feuilles du *D. gnidium*. Après plusieurs applications et après l'exposition à la lumière UV, ces extraits ont prouvé qu'ils ont une bonne activité antibactérienne et antimycotique. Les résultats de l'irritation aigue, de la phototoxicité et du teste de sensibilité, ont montré que l'extrait des feuilles a une bonne tolérance cutanée **(Rapisarda et al., 1998)**.

Partie
Expérimentale

Chapitre Un : Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

La récolte des deux plantes pour cette étude a été faite au mois de Novembre 2007 dans la région d'El Mafrouche à Tlemcen (voir la station sur la carte géographique, figure 17).

Les différents organes du matériel végétal (tiges, feuilles, fleurs) ont été séchés à l'ombre et à température ambiante parce qu'il est conseillé pour obtenir une meilleure extraction d'utiliser le matériel végétal sec, congelé ou lyophilisé ; étant donné que certains composés antioxydants (certains flavonoïdes et particulièrement les glycosides) sont instables ou peuvent être dégradés sous l'action des enzymes du matériel végétal frais (**Bruneton, 1999 ; Suhaj, 2006**).

Le matériel ainsi séché a été broyé finement pour servir à la préparation des extraits.

Pour *l'Arbutus unedo*, on a travaillé sur les feuilles, les rameaux et les fleurs.

Du fait qu'on a dépassé la période de floraison pour le *Daphne gnidium*, on a récolté seulement les feuilles et les tiges.

2. L'extraction des flavonoïdes

La sélection d'un procédé d'extraction approprié tend vers l'augmentation de la concentration des antioxydants correspondants à notre matériel végétal.

Les méthodes d'extraction dépendent aussi bien du matériel végétal que du type de flavonoïdes à extraire. Si en règle générale, les glycosides sont hydrolysables et solubles dans les alcools, un certain nombre d'entre eux ont une solubilité dans l'eau peu marquée (rutoside, hespéridoside).

Un solvant chloré (le chloroforme, le dichlorométhane), le benzène, l'acétate d'éthyle ou l'éther diéthylique permet de récupérer les aglycones libres peu ou moyennement polaires (flavanones, flavones méthylés et flavonols).

L'acétone, le méthanol, l'eau ou les mélanges eau-alcool permet d'extraire les aglycones polyhydroxylés et la plupart des glycosides. L'eau bouillante extrait les polyglycosides et les dérivés flavaniques. (**Bruneton, 1999 ; Ranarivelo, 2004 ; Andersen et Markham, 2006**).

Le méthanol est le solvant le plus utilisé. Une étude a montré que le méthanol est le meilleur solvant pour extraire la catéchine. L'extraction des anthocyanines est effectuée généralement à froid avec du méthanol acidifié. Il a été aussi montré que le méthanol aqueux, dû à son importante polarité, extrait les polyphénols liés aux matrices des fibres polaires avec une grande efficacité (**Suhaj, 2006**).

L'extraction des flavonoïdes a été effectuée selon la méthode de **Bekkara et al., 1998**. 20g de matière végétale sèche et broyée est ajouté au mélange de solvant méthanol-eau 70:30(V/V). Le mélange est soumis à deux types d'extractions, l'extraction à chaud et la macération à froid :

✓ **Macération à froid :**

Sous agitation permanente, la préparation est laissée à la température ambiante pendant 48h. Après filtration, l'extrait méthanolique est évaporé à sec sous pression réduite à 60°C au Rotavapor (BUCHI Rotavapor R-200). Le résidu sec est repris par 4ml de méthanol et conservé à +4°C. Ce dernier étant l'extrait brut méthanolique.

✓ **Extraction à chaud :**

Pour l'extraction à chaud, la préparation est laissée sous reflux pendant 3h à 60°C et sous agitation, après refroidissement et filtration, l'extrait méthanolique est concentré sous vide à 60°C au Rotavapor. De la même manière que pour la macération à froid, le résidu sec est repris dans du méthanol et conservé à +4°C.

Le poids de l'extrait sec est calculé par la différence du poids du balon vide c'est-à-dire avant utilisation et son poids contenant le résidu sec (pesé après évaporation) en gramme.

3. Le rendement en extrait sec :

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec déjà calculé (en gramme), avec le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme. Les rendements sont calculés par rapport à 100g de matière végétale sèche.

4. Fractionnement :

La macération à froid et l'extraction à chaud ont été faites de la même façon que pour les extraits bruts. Après évaporation, les résidus secs sont repris dans de l'eau bouillante et sont épuisés dans une ampoule à décanter successivement par l'acétate d'éthyle et le n-butanol avec un rapport de volume égale à 1 (v/v).

Les deux phases organiques d'acétate d'éthyl et du n-butanol sont évaporées à sec au rotavapor et les résidus secs sont repris dans du méthanol après avoir calculé le poids comme cela a été fait pour les extraits bruts méthanoliques.

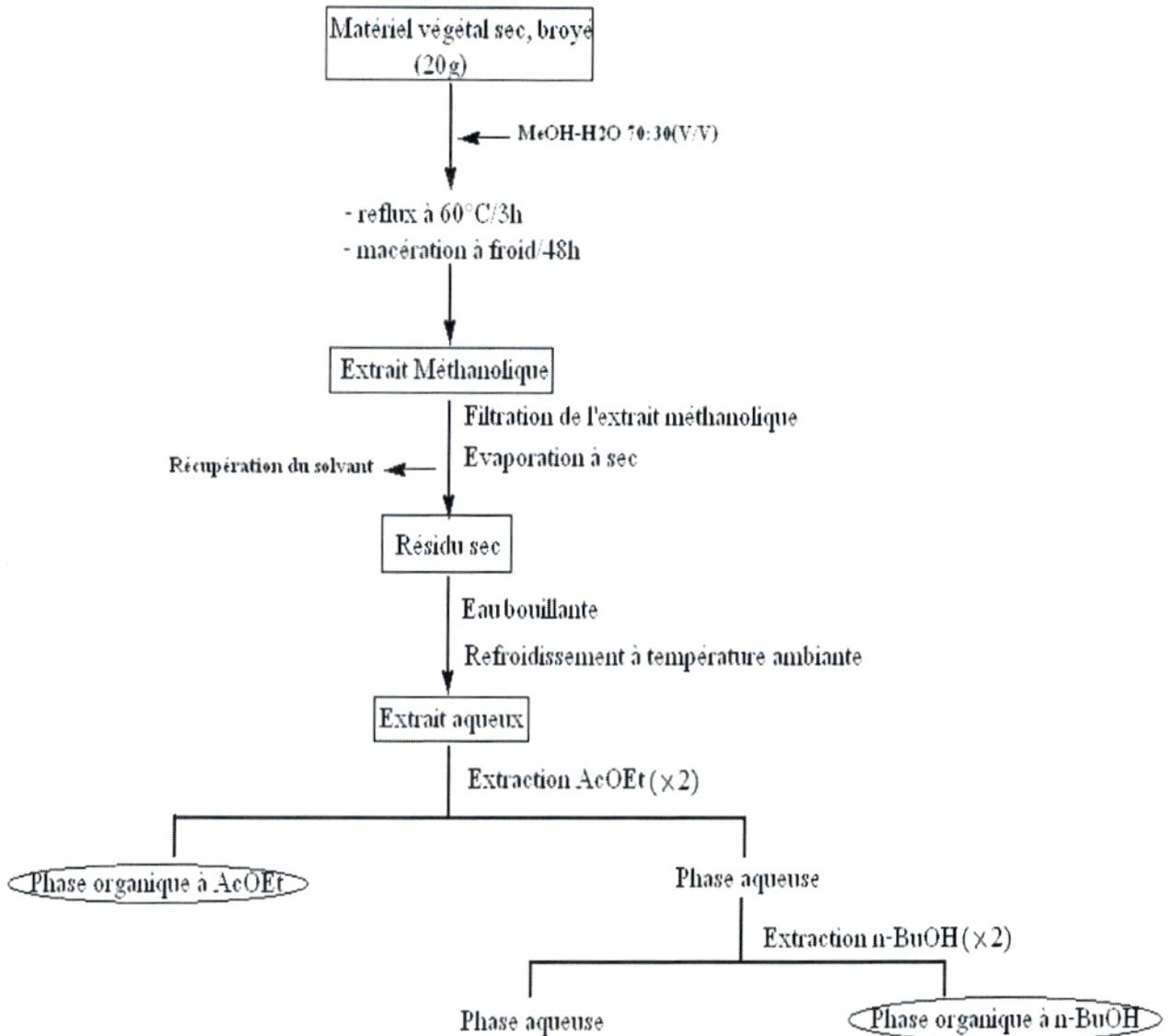


Figure 18 : Protocole d'extraction des flavonoïdes (Bekkara *et al.*, 1998) .

5. Dosage des polyphénols

La méthode la plus utilisée pour l'évaluation quantitative des composés phénoliques dans les extraits végétaux est basée sur leurs capacités de réduire le mélange d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) du réactif de Folin-Ciocalteu, avec la formation d'un complexe bleu (Peri et Pompei, 1971), qui peut être déterminé colorimétriquement à 750 nm.

Mise en œuvre pratique :

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermeris et Nicholson, 2006**.

2 ml d'une solution de carbonate de sodium à 2% fraîchement préparée est ajoutée à 0,1ml de l'extrait brut (dilué si nécessaire), le mélange est agité par un vortex. Après 5 minutes, 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (fourni par Prolabo) à 1N sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 30 minutes à la température ambiante et la lecture est effectuée contre un blanc au spectrophotomètre (Perkin Elmer, Lambda 800) à 750 nm.

L'absorbance maximale lue à 750 nm est proportionnelle à la quantité de composé phénolique présent dans les extraits bruts.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche.

6. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

Mise en œuvre pratique :

La quantification des flavonoïdes de nos extraits est réalisée par la méthode colorimétrique décrite par **Zhishen et al., 1999 in Ardestani et Yazdanparast, 2007**.

500µl de l'extrait brut sont mélangés avec 2 ml d'eau distillée suivi de 150µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15%. Après 6 minutes, 150µl de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) à 10% sont ajoutés au mélange, le tout est laissé pendant 6 minutes, ensuite, 2ml d'hydroxyde de sodium à 4% sont ajoutés aux tubes et le volume final est complété immédiatement à 5ml par de l'eau distillée.

Après 15 minutes, la lecture est faite à 510 nm contre un blanc au spectrophotomètre (Perkin Elmer, Lambda 800).

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine par gramme de matière végétale sèche.

7. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est un outil précieux pour l'analyse en phytochimie. Elle est assez peu onéreuse et son utilisation est très simple.

Une plaque de CCM se compose d'un support en aluminium, en verre ou en plastique, sur lequel est fixé une fine couche d'un milieu de sorption (silice, cellulose, alumine, polyamides...) comme phase stationnaire. On la place en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre. Elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile, qui est constituée d'un ou plusieurs solvants, et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à étudier, déposé à l'état liquide par une micropipette et éventuellement séché, sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque. Le comportement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existant entre soluté, phase mobile et phase stationnaire (Hennebelle, 2006).

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes :

- directement si les substances sont colorées ;
- à l'aide d'un révélateur si elles sont incolores afin de les transformer en tâches colorées.

La plupart des substances ayant une absorption au dessus de 230nm sont étudiées par irradiation de lumière UV à ondes courtes ($\lambda_{\max} < 254\text{nm}$) ou à ondes longues ($\lambda_{\max} < 366\text{nm}$).

La révélation des polyphénols repose sur la coloration de leur spot à l'examen macroscopique, à leur comportement chromatographique (R_f) et à leur fluorescence en lumière UV.

Les aglycones et les hétérosides émettent des florescences en lumière ultraviolettes (200-365nm) en donnant ainsi :

► Une fluorescence violette : témoins soit de l'absence d'un hydroxyle libre soit de la présence d'un hydrogène en position 3, correspondant ainsi aux hétérosides et aux C-glycosides ;

► une fluorescence bleue ou bleu verdâtre : témoins de la présence d'un acide phénol ;

► une fluorescence jaune : indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 3, correspond ainsi aux flavonols.

Dans tous les cas il faut noter la position des tâches colorées justes à la fin de la chromatographie en les entourant avec un crayon (**Hamlat, 2006**).

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son R_f (*rate factor* ou rapport frontal), qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) et qui peut donc être compris entre 0 et 1 (**Hennebelle, 2006**).

Dans notre travail, nous avons réalisé la séparation des fractions acétate d'éthyle et n-butanol sur différents supports et chacun avec un système de solvant approprié :

- **1^{er} système** : Nos analyses sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de Silicagel 60 F₂₅₄ prêtes à l'emploi à support d'aluminium (20×20 cm) (Merck), avec le système de solvant suivant :

Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Eau distillée (65 :15 :20) (**Males et Medic-Saric, 2001**).

- **2^{ème} système** : Nous avons utilisé aussi un autre système de migration sur des plaques de cellulose sur support de plastique avec la phase mobile :

Butanol/ Acide acétique/ Eau distillée (4 :1 :5) (**Onyilagha et al., 2003**).

- **3^{ème} système** : Nous avons utilisé des plaques de CCM gel de polyamide DC6 sur support plastique avec le système :

Butanol/ Acide acétique/ Eau distillée (4 :1 :5) (**Markham, 1982**).

Après développement du chromatogramme, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée à l'UV à la longueur d'onde 365 nm.

8. Spectres d'absorption en ultraviolet

La spectrophotométrie est une étape déterminante de l'identification structurale d'un composé qu'il soit natif ou qu'il résulte d'une hydrolyse acide.

Dans le méthanol neutre, les flavones et flavonols absorbent dans deux régions différentes du spectre ultra-violet, entre 300 et 385 nm (Bande I), et entre 250 et 280 nm (Bande II).

La bande I correspond à l'absorption du système cinnamoylé qui fait intervenir la conjugaison du groupement CO de l'hétérocycle central avec le noyau B (schéma a).

La bande II est associée à l'absorption du système benzoyle du noyau A, cette bande permet de connaître le nombre de substituants du noyau A (schéma b) (Lahouel, 2004).

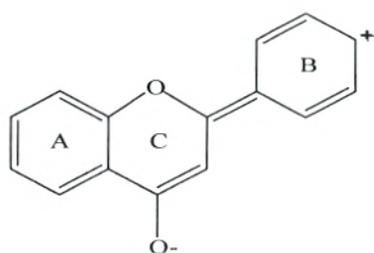


Schéma a

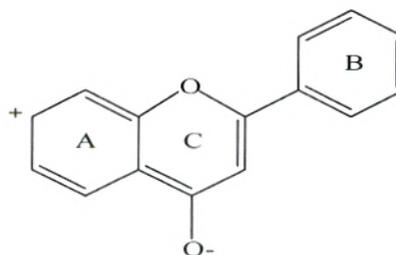


Schéma b

Pour les flavonols, une augmentation dans le nombre de groupes hydroxyles sur le cycle B induit un déplacement de la bande I de 3 nm à 10 nm. Par exemple, les longueurs d'onde d'absorption de la galangine (aucun groupe OH sur le cycle B), du kaempférol (un groupe OH en position 4') et de la quercétine (deux groupes OH en positions 3' et 4') sont respectivement 359 nm, 364 nm et 367 nm (Marfak, 2003).

Tableau 4 : Absorption UV-visible des flavonoïdes (Markham, 1982).

Band II (nm)	Band I (nm)	Type de flavonoïde
250- 280	310- 350	Flavone
250- 280	330- 360	Flavonols (3-OH substitué)
250- 280	350- 385	Flavonols (3-OH libre)
245- 275	310- 330 épaulement	Isoflavones
	320 pic	Isoflavones (5-deoxy-6,7 dioxygéné)
275- 295	300- 330 épaulement	Flavonones et dihydroflavonols
230- 270 (faible intensité)	340- 390	Chalcones
230- 270 (faible intensité)	380- 430	Aurones
270- 280	465- 560	Anthocyanidines et anthocyanines

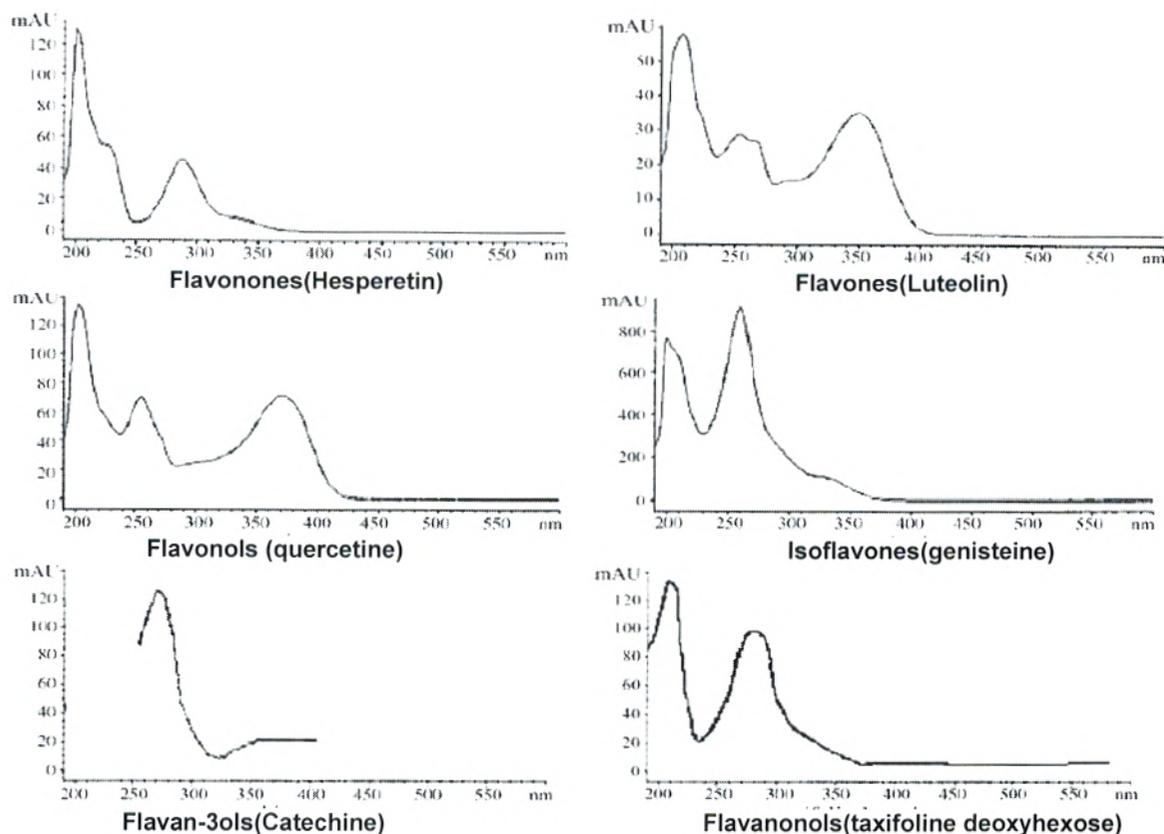


Figure 19 : Spectres d'absorption des classes de flavonoïdes avec un exemple Pour chacune (Rijki *et al.*, 2006).

Les spectres d'absorption de nos extraits acétate d'éthyle et n-butanol dans du méthanol ont été déterminés dans la bande de l'ultraviolet à longueur d'onde comprise entre 200 et 400 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (UV 500, vision 32).

9. Etude de l'activité antioxydante

9.1. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode de **Oyaizu, 1986 in Pan *et al.*, 2008**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fer (III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe (II). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

Le protocole expérimental suivi est celui de **Karagözler et al., 2008**.

1ml de l'échantillon à différentes concentrations (0,1 ; 0,25 et 0,75 mg/ml), est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante. 2,5 ml de l'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis il est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes.

2,5ml du surnageant sont ajoutés à 2,5ml d'eau distillée et 500µl d'une solution de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,1%) sont ajoutés au mélange. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm (Perkin Elmer, Lambda 800 spectrophotometer).

L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies.

Expression des résultats :

Nous traçons les histogrammes des absorbances obtenues pour les fractions acétate d'éthyle et n-butanol de nos plantes étudiées aux différentes concentrations utilisées.

9.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) qui est un radical libre stable, en acceptant un électron ou un radical hydrogène, devient une molécule stable. L'effet des antioxydants sur ce radical se traduit par leurs capacités à lui donner un radical hydrogène (fig 15).

Cette capacité de réduction (sur le radical DPPH) est déterminée par la diminution de son absorbance à son absorption maximale à 515 nm, qui est induite par l'antioxydant. Ceci est visualisé par le changement de couleur du violet au jaune (**Majhenić et al., 2007**). Le DPPH est commercial, peu onéreux et ne nécessite qu'une mise en solution dans le méthanol à une concentration connue pour être utilisé pour le test de l'activité antioxydante avec les extraits, soit utilisé comme révélateur en CCM (**Cuendet et al., In Chaib-Kouri, 2004 ; Benhammou, 2006**).

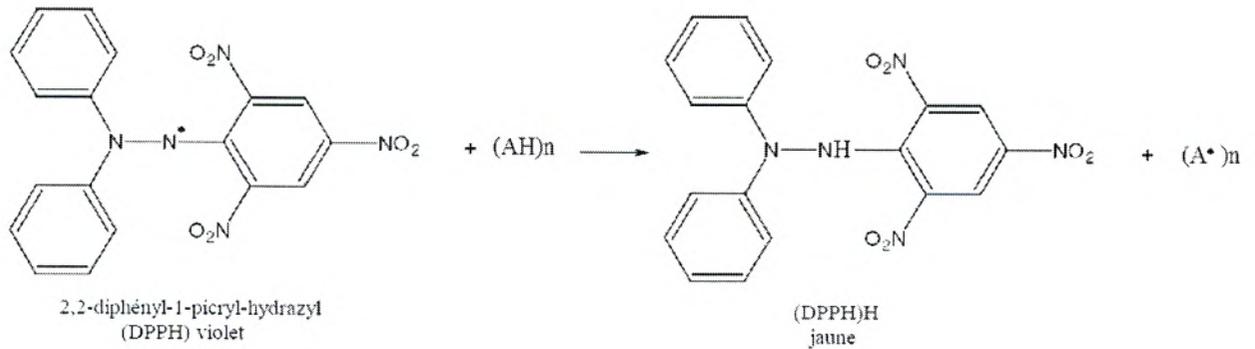


Figure 20 : Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH'

Le protocole expérimental est comme suit :

50µl de chaque solution méthanolique des différentes fractions des plantes étudiées (acétate d'éthyle et n-butanol) à différentes concentrations sont ajoutés 1,95 ml d'une solution méthanolique de DPPH à $6,34 \cdot 10^{-5}$ M. Pour chaque concentration un blanc est préparé (50µl de chaque solution à tester + 1,95 ml de méthanol). Le contrôle est préparé en parallèle, en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,95 ml de DPPH.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm au spectrophotomètre (Jenway 6400) (Atoui *et al.*, 2005 ; Benhammou *et al.*, 2007).

Expression des résultats

► Pourcentages d'inhibition :

Nous déterminons ainsi les pourcentages d'inhibition grâce à la formule suivante:

$$I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \cdot 100$$

A_C : Absorbance du contrôle

A_T : Absorbance du test effectué

► Calcul des IC_{50} :

IC_{50} ou concentration inhibitrice 50 (aussi appelée EC_{50} pour *Efficient concentration 50*), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Ces dernières sont calculées graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées (Bertoncelj *et al.*, 2007 ; Marxen *et al.*, 2007 ; Scherer et Godoy, 2009 ; Fabri *et al.*, 2009).

► *Calcul des pourcentages de piégeage (Scavenging activity) :*

Nous pouvons déduire l'activité anti-radicalaire de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des IC50 trouvées.

$$A_{AR} = 1/IC50 \text{ (Maisuthisakul et al., 2007).}$$

L'activité anti-radicalaire est comparée à celle de l'acide ascorbique.

9.3. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 scavenging activity)

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de H_2O_2 diminue par les composés piégeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue également.

Néanmoins, il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche (Malgalhaes et al., 2008).

La réalisation d'une telle méthode nécessite beaucoup de rigueur au moment de la manipulation.

Mise en œuvre pratique

Pour étudier l'activité du piégeage du H_2O_2 , nous avons utilisé la méthode décrite par Ruch et al., 1989 in Shon et al., 2008, avec quelques modifications.

3,4 ml de l'extrait brut de chaque partie des plantes à étudier à la concentration de 0,1µg/ml, préparé dans une solution tampon phosphate à 0,1M (pH 7,4) sont mélangés avec 600 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 43mM (préparée dans le même tampon phosphate). La réaction des échantillons avec le peroxyde d'hydrogène est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre (Perkin Elmer, Lambda 800 spectrophotometer) à 230 nm pendant 40 minutes à 10 minutes d'intervalle.

Dans les mêmes conditions opératoires, le BHA (butylhydroxyanisole), à la même concentration choisie est utilisé comme contrôle positif.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ du piégeage du H}_2\text{O}_2 = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

A_C : Absorbance du contrôle

A_T : Absorbance du test.

9.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (*β-carotene bleaching method*)

Cette technique consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique.

La dispersion de l'acide linoléique et du β-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du β-carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. Elle présente également l'avantage de pouvoir être couplée à la chromatographie sur couche mince.

Cependant, l'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée et donc non spécifique, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats (**Laguerre et al., 2007**).

Mise en œuvre pratique :

Pour étudier l'activité antioxydante par la méthode de décoloration du β-carotène, nous avons choisi de travailler avec le protocole expérimental décrit par **Sun et Ho (2005)** *in* **Ozsoy et al., 2008**, avec quelques modifications apportées à la méthode.

Pour préparer l'émulsion du β-carotène, 2 mg de ce dernier sont dissous dans 10 ml de chloroforme, puis 1 ml de cette solution est mélangé avec 20 mg d'acide linoléique purifié et 200 mg du Tween 40 (tous ces produits sont fournis par Fluka). Le chloroforme est évaporé par un Rotavapor (BUCHI Rotavapor R-200) et le résidu obtenu est repris par 50 ml de peroxyde d'hydrogène à 30%.

5 ml de cette émulsion sont préparés, pour lesquelles 200 μl d'extraits bruts méthanoliques de nos plantes étudiées ou d'antioxydant de référence (BHA) à la concentration 2,5 mg/ml sont ajoutés. Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470 nm se fait immédiatement à t_0 contre un blanc qui contient l'émulsion sans le β-carotène.

Les tubes couverts sont placés dans un bain marie réglé à 50°C et la lecture de l'absorbance est faite toute les 10 minutes durant 60 minutes.

Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5 ml de l'émulsion du β -carotène et 200 μ l de méthanol.

Expression des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène en employant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [1 - (A_0 - A_t / A_0^0 - A_t^0)] \times 100 \text{ (Ozsoy et al., 2008).}$$

AA : Activité antioxydante

A_0 : Absorbance de l'échantillon à t_0 .

A_t : Absorbance de l'échantillon après incubation de 60 minutes.

A_0^0 : Absorbance du contrôle négatif à t_0 .

A_t^0 : Absorbance du contrôle négatif après incubation de 60 minutes.

Chapitre Deux : Résultats et Discussion

1. Rendement en extrait sec

Les extraits bruts méthanoliques récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme des composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénols et tanins). Le rendement a été déterminé par rapport à 100g de matériel végétal sec et broyé ; subissant l'extraction à chaud et la macération à froid. Les résultats ont été exprimés en pourcentage massique (p/p).

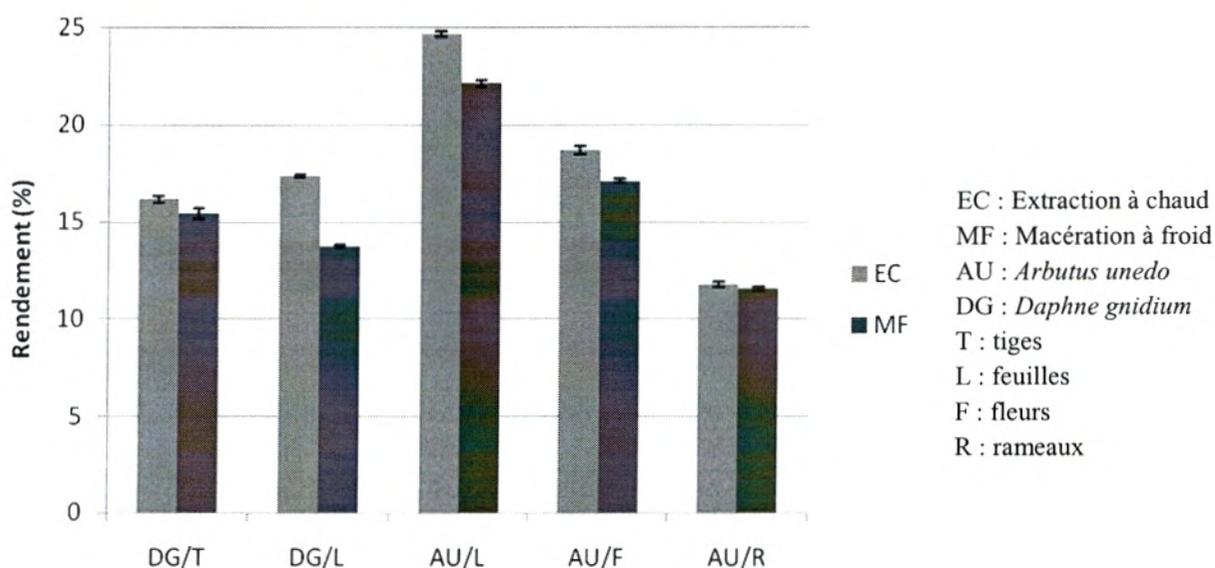


Figure 21 : Rendement en extrait sec

Selon la figure ci-dessus (**fig. 21**), les deux plantes ont donné un bon rendement qui est supérieur à 10 g /100 g de matière végétale en poudre.

Le rendement le plus élevé pour le *Daphne gnidium* a été donné par ces feuilles suivies par les tiges. Pour l'*Arbutus unedo* les rendements des différentes parties de la plante sont donnés par l'ordre décroissant suivant : feuilles > fleurs > rameaux qui sont de l'ordre de $24,7 \pm 0,135$; $18,7 \pm 0,21$ et $11,8 \pm 0,11$ % (p/p) respectivement pour l'extraction à chaud et $22,1 \pm 0,15$; $17,1 \pm 0,105$ et $11,5 \pm 0,1$ % (p/p) respectivement pour la macération à froid.

De même, le *D.gnidium* a donné un rendement pour l'extraction à chaud de l'ordre de $17,3 \pm 0,071$ et $16,1 \pm 0,19$ % (p/p) pour les feuilles et les tiges respectivement, et a donné un rendement de

13,4± 0,067 pour les feuilles et 15,4± 0,29 % (p/p) pour les tiges en ce qui concerne les extraits de la macération à froid.

Ces résultats nous permettent de conclure que la méthode d'extraction à chaud donne de meilleurs rendements que la macération à froid, ce qui confirme qu'une température modérée agit à la faveur de l'extraction, ceci a été affirmé par quelques auteurs qui précisent que les techniques utilisant des températures et/ou des pressions plus ou moins élevées augmenteraient considérablement le rendement de l'extraction (Suhaj, 2006).

2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

A. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été réalisé par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par Vermarris et Nicholson (2006), utilisant l'acide gallique comme contrôle positif.

La courbe d'étalonnage linéaire de l'acide gallique a été réalisée avec des concentrations allant de 70 à 140 µg/ml, avec un R^2 égale à 0,985.

La teneur en polyphénols totaux a été exprimée en équivalent d'acide gallique (GAE) en milligramme par gramme de matière végétale sèche.

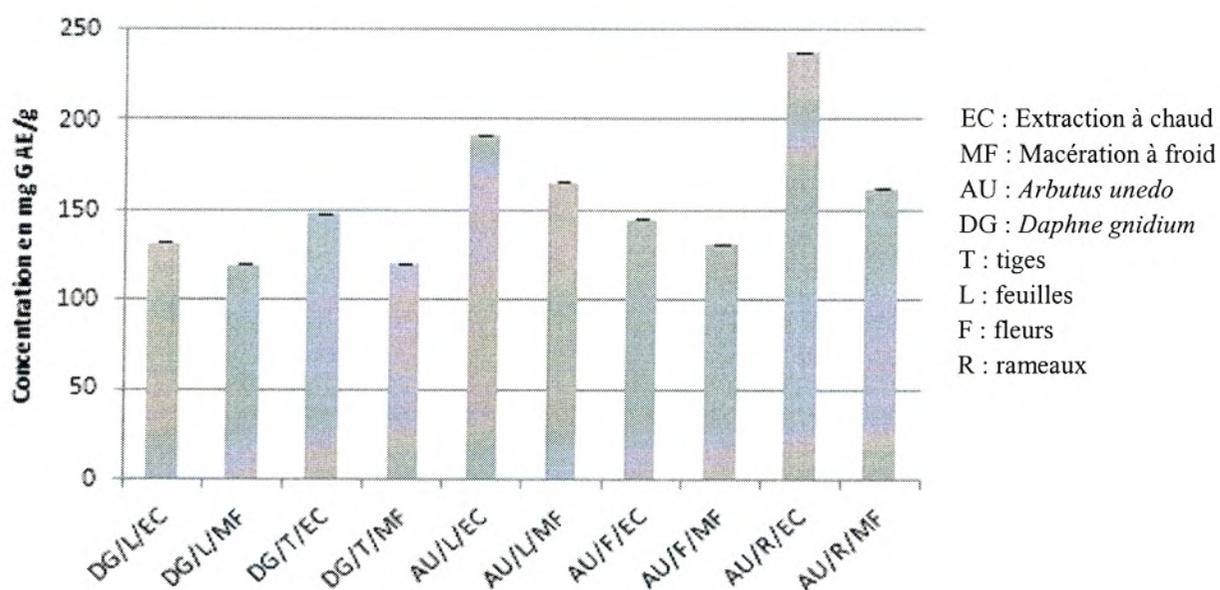


Figure 22 : Dosage de polyphénols totaux

Comme montré sur l'histogramme ci-dessus, il y a une variabilité dans la teneur des polyphénols totaux dans nos différents extraits.

Les extraits bruts épuisés par extraction à chaud présente une teneur plus élevée que ceux extraits par macération à froid pour les différentes parties des deux plantes, ce qui confirme le résultat obtenu après calcul des rendements en extrait sec. De ce fait, on peut conclure que les procédures d'extraction peuvent également affecter en grande partie la détermination de la teneur phénolique des échantillons.

En ce qui concerne l'extraction à chaud pour l'*A.unedo* les teneurs en polyphénols sont classées comme suit : rameaux > feuilles > fleurs qui sont de l'ordre de $237,33 \pm 0,005$; $192,4 \pm 0,003$ et $145,4 \pm 0,0071$ mg GAE/g respectivement. Et pour le *D. gnidium* les tiges (148,07 \pm 0,008 mg GAE/g) contiennent plus de polyphénols que les feuilles (131,9 \pm 0,0072 mg GAE/g).

B. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par la méthode colorimétrique décrite par **Zhishen et al (1999)**. La catéchine pris comme contrôle positif a permis de réaliser une courbe d'étalonnage avec R^2 égale à 0,991, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes pour les différents extraits qui est exprimée en mg équivalent de catéchine (EQC) par gramme de matière végétale sèche.

Les teneurs en flavonoïdes dans les différentes parties des deux plantes sont proportionnelles à ceux des polyphénols, delà on peut dire que la majorité ou presque la totalité des polyphénols présents dans nos extraits sont de la classe des flavonoïdes.

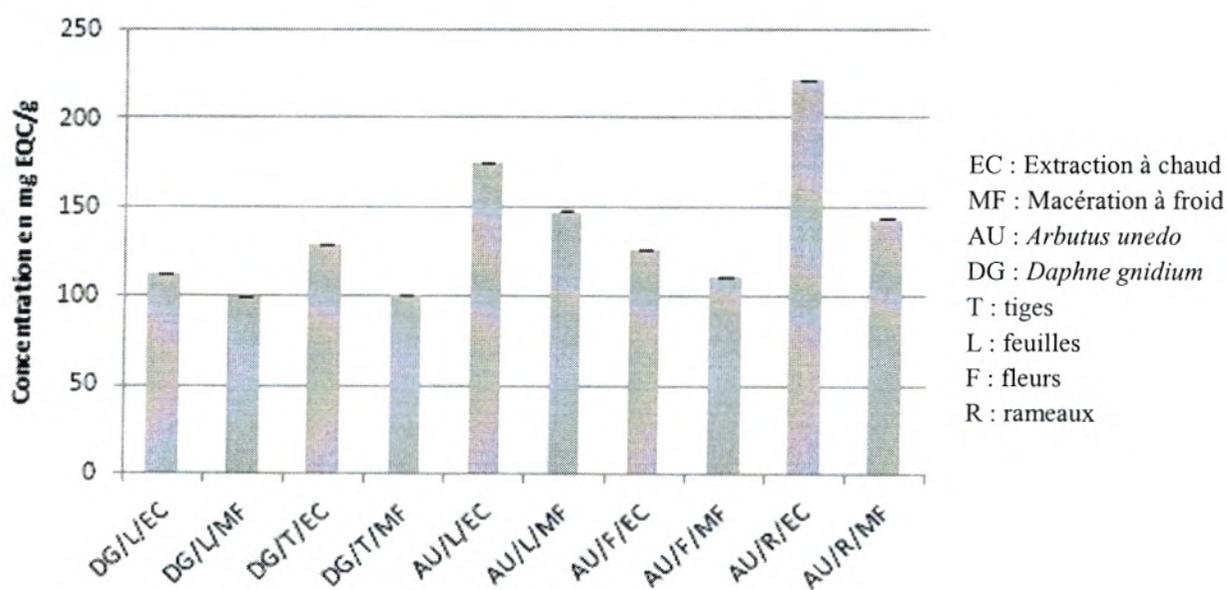


Figure 23 : Dosage des flavonoïdes

Comme le montre l'histogramme, la teneur en flavonoïdes dans nos différents extraits épuisés par extraction à chaud est supérieure à ceux épuisés par macération et aussi comme pour les polyphénols la teneur varie entre tiges, feuilles et fleurs.

Pour l'*A.unedo* les teneurs en flavonoïdes sont classés comme suit : rameaux > feuilles > fleurs, ils sont de l'ordre de $222,02 \pm 0,029$; $175,3 \pm 0,019$ et $126,4 \pm 0,051$ mg EQC /g respectivement pour l'extraction à chaud et pour la macération à froid : $147,7 \pm 0,029$; $143,9 \pm 0,001$ et $111,7 \pm 0,03$ mg EQC /g de matière végétale sèche pour rameaux, feuilles et fleurs respectivement.

Pour le *D. gnidium* et en ce qui concerne l'extraction à chaud la teneur en flavonoïdes a été de l'ordre de $129,2 \pm 0,006$ mg EQC /g de matière végétale sèche pour les tiges et $112,4 \pm 0,02$ mg EQC /g de matière végétale sèche pour les feuilles. De même pour la macération à froid, les tiges ($100,9 \pm 0,001$ mg EQC /g de matière végétale sèche) contiennent plus de flavonoïdes que les feuilles ($99,99 \pm 0,0085$ mg EQC /g de matière végétale sèche).

3. Essai d'identification des composés phénoliques par la chromatographie sur couche mince et les spectres d'absorption en ultraviolet

3.1. La chromatographie sur couche mince

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de nos différents extraits on a eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est l'une des méthodes habituelles pour la séparation et la purification des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre.

Dans notre étude, nous avons réalisé la séparation des fractions d'acétate d'éthyle et butanoliques obtenues par les deux méthodes d'extraction sur trois différents supports et chacun avec un système de solvant approprié :

- Le 1^{er} système consiste en une plaque de gel de silice 60 F₂₅₄ à support d'aluminium avec le système de solvant suivant : Acétate d'éthyle/ Acide formique/ Eau distillée (65 :15 :20) (**Males et Medic-Saric, 2001**).

- Le 2^{ème} système : plaques de cellulose sur support de plastique avec la phase mobile suivante : Butanol/ Acide acétique/ Eau distillée (4 :1 :5) (**Onyilagha et al., 2003**).

- Le 3^{ème} système : Nous avons utilisé des plaques de polyamide DC6 sur support plastique avec le système : Butanol/ Acide acétique/ Eau (4 :1 :5) (**Markham, 1982**).

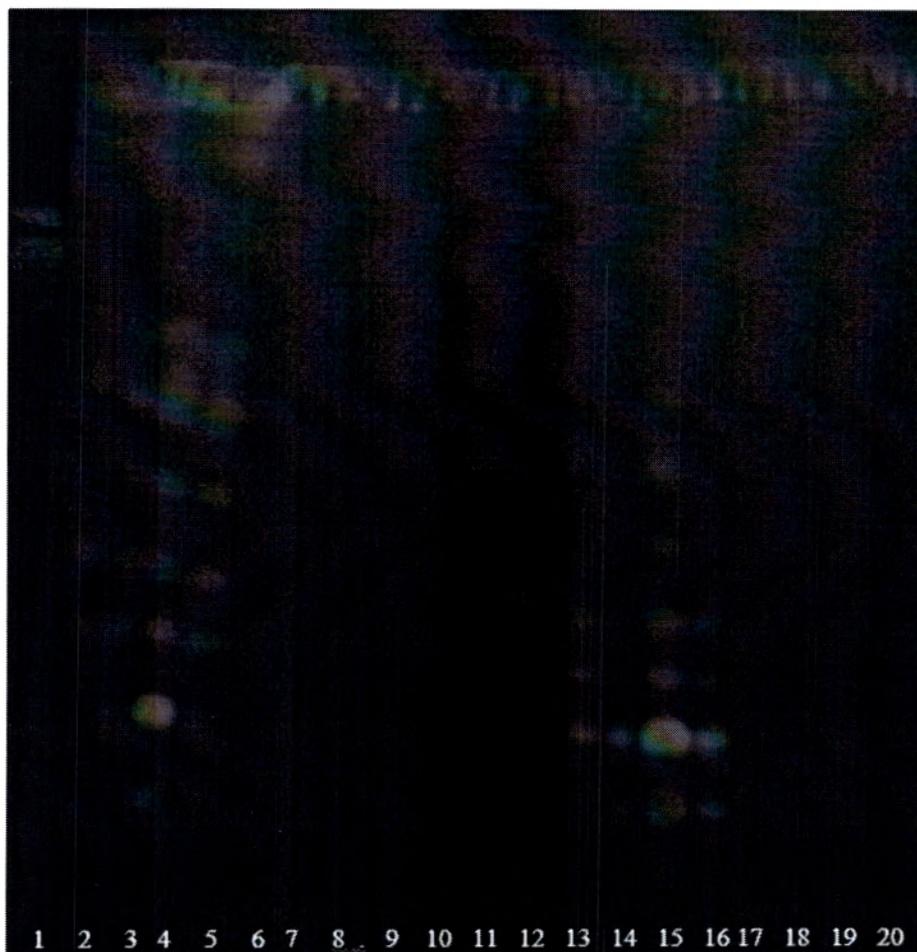
Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux (5-16) et les figures (24-27).

Le système 1 :

Adsorbant : Gel de Silice

Phase mobile : Acétate d'éthyl/ acide formique/eau distillée (65 : 15 : 20)

Révélation : Lampe UV 365nm



EC : Extraction à chaud
 MF : Macération à froid
 AU : *Arbutus unedo*
 DG : *Daphne gnidium*
 T : tiges
 L : feuilles
 F : fleurs
 R : rameaux
 AcOEt : fraction d'acétate d'éthyle
 BuOH : fraction butanolique

1 : DG/L/AcOEt/EC, 2 : DG/L/BuOH/EC, 3 : DG/L/AcOEt/MF, 4 : DG/L/BuOH/MF, 5 : DG/T/AcOEt/EC,
 6 : DG/T/BuOH/EC, 7 : DG/T/AcOEt/MF, 8 : DG/T/BuOH/MF, 9 : AU/L/AcOEt/EC, 10 : AU/L/BuOH/EC,
 11 : AU/L/AcOEt/MF, 12 : AU/L/BuOH/MF, 13 : AU/F/AcOEt/EC, 14 : AU/F/BuOH/EC, 15 : AU/F/AcOEt/MF,
 16 : AU/F/BuOH/MF, 17 : AU/R/AcO Et/EC, 18 : AU/R/BuOH/EC, 19 : AU/R/AcOEt/MF, 20 : AU/R/BuOH/MF.

Figure 24 : Photo de CCM sur Gel de Silice des différents extraits de l' *Arbutus unedo* L.
 Et du *Daphne gnidium* L.

Tableau 5 : Résultats CCM : Gel de silice, ACETATE D'ETHYL/ACIDE FORMIQUE/EAU (65 :15 :20), *Daphne Gnidium L.*, phase acétate d'éthyle.

N° de spots	Extraits		DG/L/EC		DG/L/MF		DG/T/EC		DG/T/MF	
1	Violet	0.43	Violet	0.38	Vert	0.16	Violet foncé	0.54		
2	Violet	0.50	Violet	0.44	Vert	0.18	Violet foncé	0.60		
3	Vert	0.53	Violet	0.47	Vert	0.21	Bleu	0.68		
4	Vert	0.57	Violet	0.51	Violet	0.25	Violet foncé	0.72		
5	Violet	0.63	Vert	0.54	Vert	0.34	Violet foncé	0.73		
6	Violet	0.65	Vert	0.60	Orangé	0.36	Violet foncé	0.76		
7	Violet	0.70	Violet	0.64	Violet foncé	0.39	Bleu	0.81		
8	Violet	0.74	Violet	0.69	Violet foncé	0.41	Violet foncé	0.87		
9	Violet foncé	0.76	Violet foncé	0.73	Vert	0.46				
10	Violet	0.79	Violet foncé	0.76	Orangé	0.51				
11	Vert	0.81	Violet foncé	0.80	Violet foncé	0.55				
12	violet	0.85	Violet foncé	0.83	Violet foncé	0.57				
13			Blanc	0.86	Blanc	0.59				
14			Violet	0.90	Vert foncé	0.65				
15					Vert foncé	0.68				
16					Bleu foncé	0.73				
17					Bleu	0.77				
18					Violet	0.81				
19					Violet	0.84				
20					Bleu foncé	0.92				

Dans le tableau les deux colonnes pour chaque extraits c'est les Rf et les couleurs des spots

Tableau 6 : Résultats CCM : Gel de silice, ACETATE D'ETHYL/ACIDE FORMIQUE/EAU (65 :15 :20), *Arbutus unedo* L., phase acétate d'éthyle.

N° de spots	Extraits AU/L/EC		AU/L/MF		AU/F/EC		AU/F/MF		AU/R/EC		AU/R/MF		
	Extractions	Rf	Couleur	Rf	Couleur								
1	Violet foncé	0.60	Violet	0.52	Violet foncé	0.60	Violet	0.60	Violet	0.48	Violet	0.70	
2	Violet foncé	0.68	Violet foncé	0.60	Violet	0.65	Violet foncé	0.68	Violet	0.60	Violet foncé	0.76	
3	Violet foncé	0.74	Bleu	0.64	Violet foncé	0.69	Violet foncé	0.71	Violet	0.69	Violet foncé	0.84	
4	Violet foncé	0.82	Violet foncé	0.69	Violet foncé	0.72	Violet	0.80	Violet foncé	0.77			
5	Marron	0.87	Violet foncé	0.72	Violet	0.80	Violet foncé	0.82	Violet	0.81			
6			Violet foncé	0.76	Violet foncé	0.83			Violet foncé	0.84			
7			Marron	0.82	violet	0.86							
8			Marron	0.87									

Dans le tableau les deux colonnes pour chaque extraits c'est les Rf et les couleurs des spots

Tableau 7 : Résultats CCM : Gel de silice, ACETATE D'ETHYL/ACIDE FORMIQUE/EAU (65 :15 :20), *Arbutus unedo* L., phase n-butanol.

N° de spots	Extraits AU/L/EC		AU/L/MF		AU/F/EC		AU/F/MF		AU/R/EC		AU/R/MF		
	Extractions	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur	Rf	Couleur
1	Violet foncé	0.32	Violet	0.33	Violet	0.38	Violet	0.38	Violet	0.34	Violet	0.38	
2	Violet foncé	0.39	Violet	0.38	violet	0.41	Violet foncé	0.42	Violet	0.37	Violet foncé	0.41	
3	Bleu	0.47	Violet	0.41	Violet foncé	0.50	Vert	0.47	Violet	0.41	Vert	0.50	
4	Violet foncé	0.50	Violet	0.47	Violet	0.61	Violet foncé	0.51	Vert	0.50	violet	0.88	
5	Violet foncé	0.60	Violet	0.51	Violet foncé	0.65	Violet foncé	0.60	Violet	0.52			
6	Violet foncé	0.67	Marron	0.61	Violet foncé	0.69	Violet foncé	0.65	Violet	0.61			
7	Marron	0.74	Marron	0.69	Violet foncé	0.73	Violet foncé	0.70	Violet foncé	0.70			
8	Marron	0.82	Violet	0.76	Marron	0.78	Violet	0.79	Violet	0.78			
9	Violet	0.87	Violet	0.80	Violet	0.84	Violet	0.84	Violet	0.81			
10			Violet	0.85	Violet foncé	0.87			Violet	0.87			

Tableau 8 : Résultats CCM : Gel de silice, ACETATE D'ETHYL/ACIDE FORMIQUE/EAU (65 :15 :20), *Daphne Gnidium* L., phase n-butanol.

N° de spots	DG/L/EC		DG/L/MF		DG/T/EC		DG/T/MF	
	Extractions	Rf	Extractions	Rf	Extractions	Rf	Extractions	Rf
1	Vert	0.16	Vert	0.09	Violet	0.10	Vert	0.08
2	Orangé	0.18	vert	0.14	Jaune	0.13	Vert	0.11
3	vert	0.21	Vert	0.17	Jaune	0.16	Vert	0.14
4	Vert	0.25	Violet	0.19	Violet	0.19	Orange	0.17
5	Vert	0.34	Violet	0.21	Violet	0.22	Vert	0.19
6	Orangé	0.36	Violet	0.25	Violet	0.26	Vert	0.22
7	Violet	0.39	Violet	0.31	Violet	0.34	Vert	0.24
8	violet	0.41	vert	0.34	Orange	0.38	Vert	0.26
9	Violet	0.46	Vert foncé	0.41	Violet foncé	0.40	Blanc	0.33
10	Blanc	0.51	Vert foncé	0.46	Violet	0.46	Orange	0.40
11	Vert	0.55	Blanc	0.49	Blanc	0.51	Violet	0.47
12	Vert	0.57	Violet	0.53	Violet foncé	0.55	Blanc	0.52
13	Violet	0.59	Violet	0.56	Violet foncé	0.60	Vert	0.54
14	Violet	0.65	Vert	0.59	Bleu	0.65	Vert	0.57
15	Violet foncé	0.68	Violet	0.61	Bleu	0.66	Violet	0.67
16	Marron	0.73	Violet foncé	0.65	Violet	0.72	Violet	0.73
17	Violet	0.77	Violet foncé	0.70	Violet foncé	0.75	Bleu	0.80
18	Violet	0.81	Violet	0.75	Bleu	0.81	Bleu foncé	0.87
19	Vert foncé	0.84	Bleu foncé	0.79	Violet foncé	0.83		
20	Bleu	0.92	Violet	0.83				

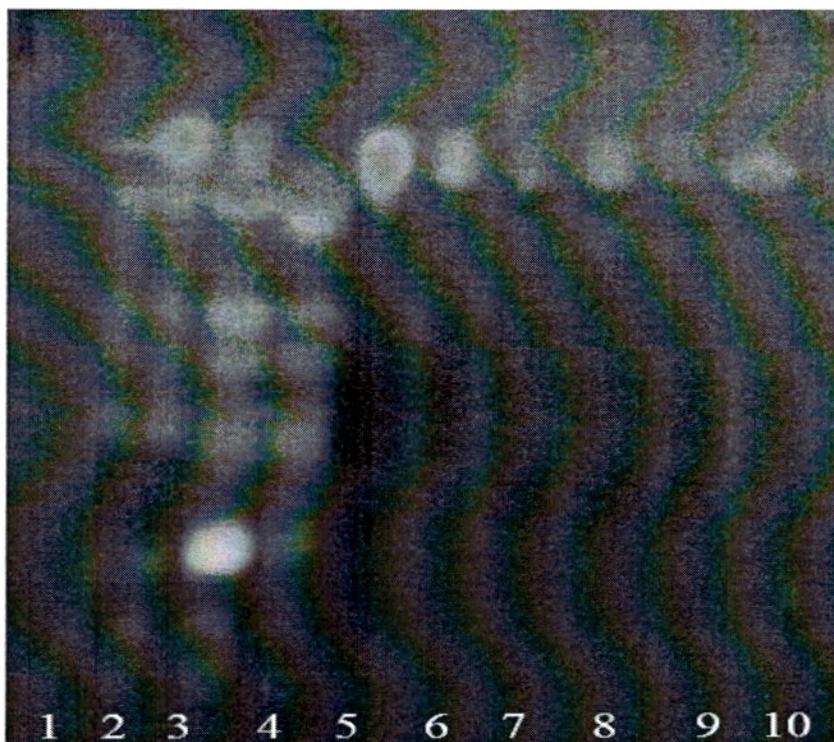
Dans le tableau les deux colonnes pour chaque extraits c'est les Rf et les couleurs des spots

Pour ce premier système avec gel de silice comme adsorbant, que ce soit pour l'*A. unedo* ou le *D. gnidium* les deux méthodes d'extraction (extraction à chaud ou macération à froid) ont donné presque le même nombre de spots.

On constate que les fractions dans l'AcOEt ont donné plus de composés allant jusqu'à 20 composés pour le *D. gnidium* que les fractions butanolique.

Le système 2 :

- Extraits des fractions d'acétate d'éthyle
- Adsorbant : Cellulose
Phase mobile : Butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5)
Révélation : Lampe UV 365nm



1 : DG/L/AcOEt/EC, 2 : DG/L/AcOEt/MF, 3 : DG/T/AcOEt/EC, 4 : DG/T/AcOEt/MF,
5 : AU/L/AcOEt/EC, 6 : AU/L/AcOEt/MF, 7 : AU/F/AcOEt/EC, 8 : AU/F/AcOEt/MF,
9 : AU/R/AcOEt/EC, 10 : AU/R/AcOEt/MF.

Figure 25 : Photo de CCM sur cellulose des extraits dans l'acétate d'éthyl de *Arbutus unedo* L. et du *Daphne gnidium* L.

Tableau 9 : Résultats CCM : Cellulose, BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4 :1 :5), *Daphne Gnidium L.*, phase acétate d'éthyl.

N ^{bre} de Spots	Extraits		DG/L/EC		DG/L/MF		DG/T/EC		DG/T/MF	
	1	Jaune	0.45	Violet	0.58	Violet	0.56	Violet	0.61	
2	Jaune	0.49	Bleu	0.61	Bleu	0.61	Bleu violet	0.77		
3	Violet	0.54	Jaune	0.66	Violet	0.69	Jaune	0.84		
4	Jaune	0.57	Jaune	0.68	Bleu violet	0.76	Violet	0.90		
5	Violet	0.59	Violet	0.73	Jaune vert	0.83				
6	Bleu	0.62	Violet	0.76	Violet	0.90				
7	Violet	0.65	Jaune vert	0.80						
8	Jaune vert	0.70	Violet	0.87						
9	Violet	0.75	Violet	0.89						
10	Jaune vert	0.81								
11	Violet	0.87								
12	Violet	0.90								

Dans le tableau les deux colonnes pour chaque extraits c'est les Rf et les couleurs des spots

Tableau 10 : Résultats CCM : Cellulose, BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4 :1 :5), *Arbutus unedo L.*, phase acétate d'éthyle.

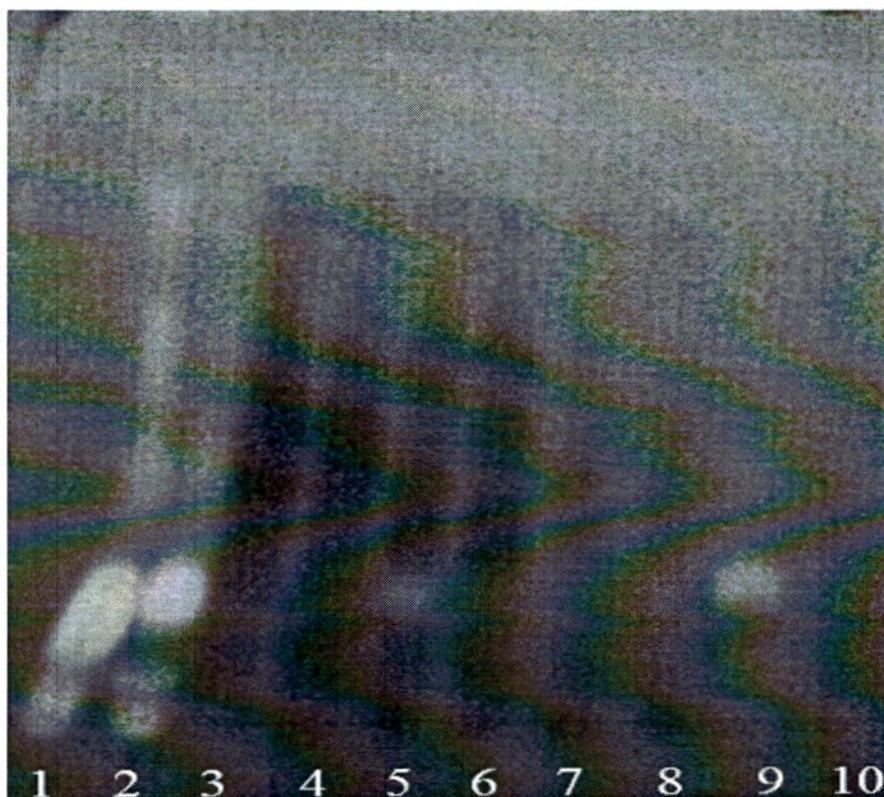
N ^{bre} de Spots	Extraits		AU /L/EC		AU /L/MF		AU /F/EC		AU /F/MF		AU /R/EC		AU /R/MF	
	1	Jaune	0.33	Jaune	0.30	Jaune	0.31	Jaune	0.32	Jaune	0.33	Jaune	0.36	
2	Jaune	0.38	Jaune	0.38	Violet sombre	0.40	Jaune	0.37	Violet	0.55	Jaune	0.47		
3	Jaune	0.40	Violet	0.57	Violet	0.55	Violet	0.40	Jaune	0.62	Jaune	0.56		
4	Violet	0.43	Violet	0.64	Violet	0.63	Violet	0.54	Jaune	0.69	Jaune	0.70		
5	Jaune	0.48	Jaune	0.70	Jaune	0.70	Jaune	0.64	Violet	0.85	Jaune	0.78		
6	Jaune	0.56	Vert foncé	0.84	Violet	0.84	Jaune	0.68			Vert foncé	0.83		
7	Violet sombre	0.61	Jaune	0.87	Jaune	0.89	Violet	0.84			Bleu	0.87		
8	Jaune	0.66												
9	Violet sombre	0.73												
10	Violet sombre	0.80												
11	Jaune	0.85												

- Extraits des fractions butanolique

Adsorbant : Cellulose

Phase mobile : Butanol/ acide acétique/eau (4 : 1 : 5)

Révélation : Lampe UV 365nm



1 : DG/L/BuOH/EC, 2 : DG/L/BuOH/MF, 3 : DG/T/BuOH/EC, 4 : DG/T/BuOH/MF,
5 : AU/L/BuOH/EC, 6 : AU/L/BuOH/MF, 7 : AU/F/BuOH/EC, 8 : AU/F/BuOH/MF,
9 : AU/R/BuOH/EC, 10 : AU/R/BuOH/MF.

Figure 25 : Photo de CCM sur cellulose des différents extraits dans le n-butanol des deux plantes *Arbutus unedo* L. et *Daphne gnidium* L.

Tableau 11 : Résultats CCM : Cellulose, BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4 :1 :5), *Daphne gnidium* L., phase n-butanol.

Nbre de spots	Extraits		DG/L/EC		DG/L/MF		DG/T/EC		DG/T/MF	
1	Jaune	0.43	Jaune	0.30	Violet	0.29	Jaune	0.28		
2	Jaune	0.52	Vert	0.36	Jaune	0.33	Jaune	0.36		
3	Jaune	0.56	Jaune	0.40	Violet	0.38	Jaune	0.47		
4	Blanc	0.59	Jaune	0.45	Jaune	0.46	Vert	0.52		
5	Vert foncé	0.66	Jaune	0.49	Vert	0.51	Blanc	0.57		
6	Violet	0.72	Vert	0.53	Blanc	0.54	Vert	0.63		
7	Violet	0.75	Blanc	0.58	Bleu	0.59	Violet	0.68		
8	Vert	0.81	Vert foncé	0.65	Violet	0.66	Violet	0.74		
9	Violet	0.88	Violet	0.70	Bleu	0.73	Violet	0.82		
10			Violet	0.74	Violet	0.82				
11			Vert	0.80	Violet	0.87				
12			Violet	0.85						

Dans le tableau les deux colonnes pour chaque extraits c'est les Rf et les couleurs des spots

Tableau 12 : Résultats CCM : Cellulose, BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4 :1 :5), *Arbutus unedo* L., phase n-butanol.

Nbre de spots	AU /L/EC		AU /L/MF		AU /F/EC		AU /F/MF		AU /R/EC		AU /R/MF	
	Couleur	Rf										
1	Violet	0.21	Jaune	0.29	Violet	0.24	Jaune	0.28	Jaune	0.28	Violet	0.29
2	Violet	0.24	Violet	0.31	Jaune	0.28	Violet	0.32	Violet	0.31	Violet	0.33
3	Jaune	0.28	Violet	0.37	Violet	0.32	Jaune	0.35	Jaune	0.35	Violet	0.38
4	Violet	0.31	Jaune	0.47	Vert	0.35	Violet	0.38	Violet	0.38		
5	Jaune	0.34	Vert	0.52	Violet	0.38	Jaune	0.45	Jaune	0.43		
6	Violet	0.37	Violet	0.59	Jaune	0.40	Violet	0.51	Violet	0.54		
7	Jaune	0.42	Vert	0.66	Jaune	0.45	Violet	0.56	Violet	0.63		
8	Jaune	0.46	Vert	0.72	Violet	0.52	Violet	0.60				
9	Vert	0.53	Violet	0.76	Violet	0.56	Violet	0.66				
10	Vert	0.59	Vert	0.83	Violet	0.62	Violet	0.71				
11	Vert	0.66			Vert	0.67	Violet	0.80				
12	Vert	0.80			Violet	0.75						
13	Violet	0.85			Violet	0.80						

Dans le tableau les deux colonnes pour chaque extraits c'est les Rf et les couleurs des spots

Pour ce deuxième système de gel de cellulose comme adsorbant, la phase mobile BAW (butanol/acide acétique/eau) a séparé moins de composés pour les mêmes fractions que précédemment (système 1), c'est le cas pour la fraction des feuilles du *D. gnidium* qui a donné 20 composés avec le premier système par contre le second système n'a pu séparer que 11 composés. On remarque aussi pour ce système que les fractions (fraction AcOEt du *D.gnidium* et fraction BuOH de l'*A. unedo*) obtenues après extraction à chaud contiennent plus de composés que les fractions obtenues par la macération à froid pour les deux plantes à quelques exceptions près.

Système 3 :

Adsorbant : Polyamide

Phase mobile : Butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5)

Révélation : Lampe UV 365nm



1 : DG/L/AcOEt/EC, 2 : DG/L/BuOH/EC, 3 : DG/L/AcOEt/MF, 4 : DG/L/BuOH/MF,
 5 : DG/T/AcOEt/EC, 6 : DG/T/BuOH/EC, 7 : DG/T/AcOEt/MF, 8 : DG/T/BuOH/MF, 9 : AU/L/AcOEt/EC,
 10 : AU/L/BuOH/EC, 11 : AU/L/AcOEt/MF, 12 : AU/L/BuOH/MF, 13 : AU/F/AcOEt/EC, 14 : AU/F/BuOH/EC,
 15 : AU/F/AcOEt/MF, 16 : AU/F/BuOH/MF, 17 : AU/R/AcOEt/EC, 18 : AU/R/BuOH/EC,
 19 : AU/R/AcOEt/MF, 20 : AU/R/BuOH/MF.

Figure 27 : Photo de CCM sur Gel de polyamide des différents extraits des deux plantes *Arbutus unedo* L. et *Daphne gnidium* L.

Tableau 13 : Résultats CCM : Polyamide, BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4 : 1 : 5), *Daphne gnidium* L., phase Acétate d'éthyl.

N ^{bre} de spote	Extraits		DG/L/EC		DG/L/MF		DG/T/EC		DG/T/MF	
	1	Marron	0.66	Marron	0.66	Violet	0.69	Violet	0.71	
2	Violet	0.69	Violet	0.69	Vert	0.73	Violet	0.79		
3	Vert	0.75	Vert	0.75	Violet	0.79	Bleu	0.87		
4	Marron	0.79	Violet	0.79	Bleu	0.85				
5	Bleu	0.83	Bleu	0.83						
6	Jaune	0.89	Jaune	0.89						

Tableau 14 : Résultats CCM : Polyamide, BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4 : 1 : 5), *Arbutus unedo* L., Phase Acétate d'éthyl.

N ^{bre} de spote	Extraits		AU/L/EC		AU/L/MF		AU/F/EC		AU/F/MF		AU/R/EC		AU/R/MF	
	1	Vert	0.09	Vert	0.09	Violet	0.09	Jaune	0.05	Vert	0.06	Jaune	0.09	
2	Violet	0.13	Vert	0.12	Violet	0.16	Violet	0.16	Violet	0.30	Violet	0.30		
3	Marron	0.17	Violet	0.16	Violet	0.25	Violet	0.25	Marron	0.34	Violet	0.34		
4	Vert foncé	0.34	Marron	0.34	Violet	0.33	Violet	0.33	Marron	0.57	Marron	0.57		
5	Vert foncé	0.38	Violet	0.47	Violet	0.48	Violet	0.48	Violet	0.63	Violet	0.63		
6	Vert foncé	0.47	Violet	0.67	Violet	0.66	Violet	0.66	Violet	0.66	Violet	0.66		
7	Violet	0.58	Marron	0.76	Violet	0.73	Violet	0.73	Marron	0.74	Marron	0.74		
8	Marron	0.63	Violet	0.81										
9	Marron	0.70												
10	Marron	0.78												

Tableau 15 : Résultats CCM : Polyamide, BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4 : 1 : 5), *Arbutus unedo* L., phase n-butanol.

N ^{bres} de spote	Extraits		DG/L/EC		DG/L/MF		DG/T/EC		DG/T/MF	
	1	Marron	0.64	Marron	0.63	Violet foncé	0.76	Violet	0.80	
2	Violet	0.69	Violet	0.69	Violet	0.80	Bleu	0.83		
3	Marron	0.75	Marron	0.74	Bleu	0.83				
4	Vert	0.78	Violet	0.81						
5	Violet	0.82								

Dans le tableau les deux colonnes pour chaque extraits c'est les Rf et les couleurs des spots.

Tableau 16 : Résultats CCM : Polyamide, BUTANOL/ACIDE ACETIQUE/EAU (4 :1 :5), *Arbutus unedo* L., phase n-butanol.

N ^{bres} de spote	Extraits AU/L/EC		AU/L/MF		AU/F/EC		AU/F/MF		AU/R/EC		AU/R/MF	
	Jaune	0.08	Jaune	0.08	Jaune	0.07	Jaune	0.07	/	/	/	/
2	Violet foncé	0.14	Violet foncé	0.14	Violet foncé	0.10	Violet foncé	0.10				
3	Marron	0.36	Marron	0.35	Violet	0.40	Marron	0.32				
4	Violet	0.49	Violet	0.41	Marron	0.50	Violet	0.40				
5	Marron	0.60	Marron	0.48	Bleu	0.63	Violet foncé	0.50				
6	Marron	0.67	Bleu	0.51	Violet	0.67	Marron	0.63				
7	Marron	0.80	Marron	0.56	Marron	0.76	Violet foncé	0.70				
8	Marron	0.83	Bleu	0.63	Bleu	0.81	Violet foncé	0.75				
9			Marron	0.72								
10			Violet	0.81								

Dans le tableau les deux colonnes pour chaque extraits c'est les Rf et les couleurs des spots.

Le troisième système de polyamide/BAW a donné moins de composés que les deux autres systèmes. On remarque qu'il n'y a presque pas de différences entre le nombre de composés de la macération à froid et l'extraction à chaud.

On remarque aussi que ce système n'a pas pu séparer aucun composé pour les fractions butanoliques des rameaux de l'arbousier. Par contre le premier système sur gel de silice a pu séparer jusqu'à 10 composés pour la même fraction et le second système a pu séparer 7 composés.

Si on compare les deux derniers systèmes utilisant la même phase mobile (BAW) l'un avec gel de polyamide et l'autre à cellulose, on peut dire que le système sur plaque de cellulose est le meilleur d'entre les deux puisqu'il a pu séparer le plus grand nombre de composés, mais toujours est-il que le système sur gel de silice (acétate d'éthyle/acide formique/eau) reste le plus performant des trois.

• **Essai d'identification des composés phénoliques à partir de la CCM:**

A- Selon la littérature :

Selon Markham et comme on a mentionné plus haut, la plupart des flavonoïdes ne sont pas visibles sur le gel de chromatographie (cellulose) après leurs migration (BAW comme phase mobile), à l'exception des anthocyanines qui apparaissent en spots oranges et les chalcones, aurones et 6-hydroxyflavonols qui apparaissent en jaune. Pour cette raison, les chromatogrammes doivent être visionnés sous lumière UV, et les flavonoïdes deviennent visibles (fluorescents) sous cette lumière (Markham, 1982 ; Hamlat, 2006).

Tableau 17: Interprétation des couleurs des spots en différentes classes de flavonoïdes

Couleur des spots sous lumière UV	Type de flavonoïdes selon Markham (1982)
Violet et violet foncé	Typique pour les flavones et flavonols glycosides (hétérosides)
Fluorescence bleue	Caractéristique des acides phénols
Fluorescence blanche	Isoflavones
Jaune orangé	Flavonols avec 3-OH libre (et dihydroflavonols)
Fluorescence jaune	-Flavonols -Aurones et quelques 2-, 4-OH chalcones
Jaune verdâtre, bleu verdâtre ou vert	-Flavonols avec 3-OH libre -Flavonones ou aurones
Orange, rouge ou mauve	Anthocyanidin 3-glycosides
Rose	La plupart des 3-5 diglycosides

En se basant sur cette littérature et selon les couleurs des spots obtenues sur les chromatogrammes des deux plantes (**tableaux 9, 10, 11 et 12**), on peut dire que :

- Pour les extraits de feuilles et des tiges du *D. gnidium* fractions AcOEt, on a pu suspecter la présence des flavonols (jaune), flavones (violet) et acide phénol (bleu). De même, pour les

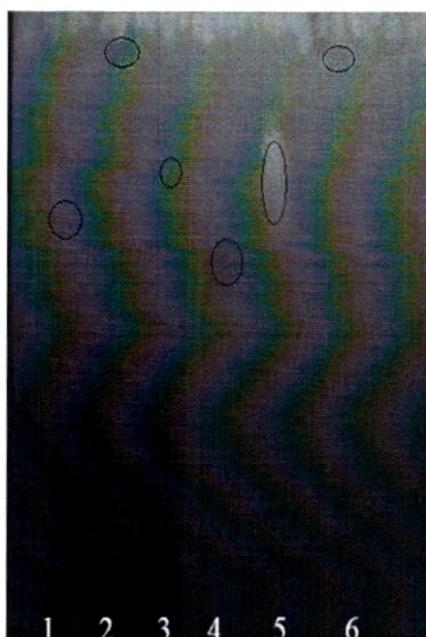
fractions dans le n-butanol, on a eu des flavonols, flavones et aussi une isoflavone (blanc) et des flavonones ou aurones (couleur verte).

- D'un autre côté, pour les extraits de feuilles de l'*A. unedo* fractions AcOEt, on suspecte la présence des flavonols (jaune), flavones (violet et violet sombre) et une flavonone ou aurone (vert sombre). Pour l'extrait des fleurs (AcOEt) les deux méthodes d'extractions à chaud et à froid ont donné le même nombre de spots qui étaient jaunes (flavonols) et violet (flavones). Et pour les rameaux en plus des flavonols et flavones on a eu un acide phénol (bleu) pour l'extrait de la macération à froid.

Pour les fractions dans BuOH de l'arbousier, on a eu des flavonols (jaune), flavones (violet) et des flavanones ou des aurones (vert) dans les extraits des feuilles et des fleurs, des flavonols et des flavones pour les rameaux (EC) et seulement des flavones (3 spots de couleur violette) pour l'extrait de la macération à froid.

B- En utilisant quelques témoins de flavonoïdes :

Nous avons comparé les résultats des CCM des fractions AcOEt et BuOH avec les 6 témoins suivants : l'acide gallique, le pyrocatechol, l'acide *para*-coumarique, la catéchine, la quercétine et la rutine.

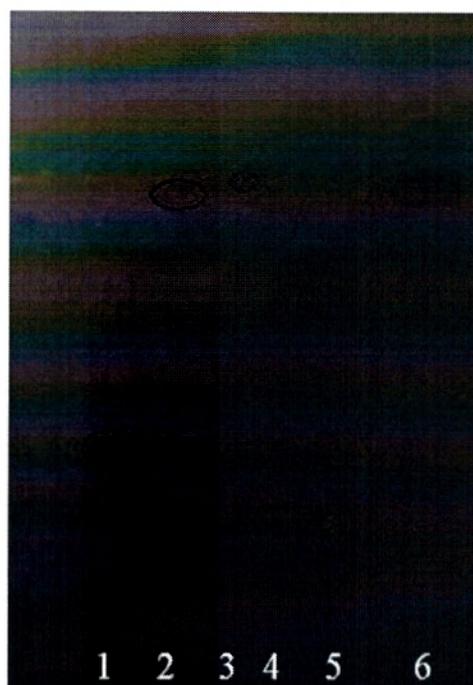


1 : Acide gallique, 2 : Pyrocathécol, 3 : Catéchine, 4 : Rutine,
5 : Quercétine, 6 : Acide para-coumarique.

Figure 28 : Photo de CCM sur cellulose (BAW) des témoins.

Tableau 18 : Résultats CCM des témoins : Cellulose / BAW

Témoins	Couleur	Rf	Classes phénoliques
Acide gallique	Bleu fluorescent	0,64	Acide phénol
Acide <i>para</i> -coumarique	Bleu fluorescent	0,94	Acide phénol
Pyrocathécol	Violet	0,91	Phénol simple
Rutine	Vert foncé	0,55	Flavone glycoside
Quercétine	Jaune	0,72	Flavonol
Catéchine	Violet	0,70	Flavan-3-ol



1 : Acide gallique, 2 : Pyrocathécol, 3 : Acide para-coumarique, 4 : Catéchine,
5 : Quercetine, 6 : Rutine.

Figure 29 : Photo de CCM sur polyamide (BAW) des témoins.

Tableau 19 : Résultats CCM des témoins : Polyamide / BAW

Témoins	Couleur	Rf	Classes phénoliques
Acide gallique	Violet	0,29	Acide phénol
Acide <i>para</i> -coumarique	Violet	0,65	Acide phénol
Pyrocathécol	Violet	0,64	Phénol simple
Rutine	violet	0,67	Flavone glycoside
Quercétine	Jaune	0,16	Flavonol
Catéchine	Violet	0,23	Flavan-3-ol

Les tableaux 18 et 19 résument les résultats (couleurs et Rf) des témoins obtenus avec les systèmes polyamide/ BAW et cellulose/BAW.

L'identification des composés phénoliques des deux plantes : *A. unedo* et *D. gnidium* est résumée sur le tableau suivant (tableau 20) :

Tableau 20 : Composés identifiés par le système Polyamide (BAW) et le système Cellulose (BAW)

Plantes	Parties étudiées	Type d'extraction	Système 1				Système 2			
			Phase acétate d'éthyle		Phase n-butanol		Phase acétate d'éthyle		Phase n-butanol	
			Composé	Rr	Composé	Rr	Composé	Rr	Composé	Rr
<i>Daphne gnidium</i>	Feuilles	EC	Rutine	0,66			Acide gallique Pyrocatechol	0,65 0,90		
		MF	Rutine	0,66					Catéchine	0,70
	Tiges	EC					Catéchine Pyrocatechol	0,69 0,90		
		MF					Pyrocatechol	0,90		
<i>Arbutus unedo</i>	Feuilles	EC			Rutine	0,67	Acide gallique	0,63		
		MF					Acide gallique	0,63	Quercétine	0,72
	Rameaux	EC	Acide gallique Pyrocatechol Acide paracoumarique	0,30 0,63 0,66					Acide gallique	0,63
		MF	Acide gallique Pyrocatechol Acide paracoumarique	0,30 0,63 0,66						
	Fleurs	EC	Acide paracoumarique	0,66						
		MF	Acide paracoumarique	0,66					Quercétine	0,72

Pour les systèmes 2 et 3, et à l'aide des témoins on a pu faire une identification de quelques composés présents dans les deux plantes :

Dans le système 2, on a pu identifier l'acide gallique (acide phénol) et le pyrocatechol (phénol simple) pour l'extrait des feuilles du *Daphné* obtenu par extraction à chaud ; pour ses tiges on a pu identifier en plus du pyrocatechol qui est un phénol simple dans les deux extraits (EC et MF) la catéchine qui est une flavan-3-ol, et qui existe aussi dans les feuilles de cette plante (pour la phase BuOH).

Tandis que pour l'arbousier on trouve l'acide gallique dans les feuilles et les rameaux en plus de la quercétine qui est de la classe des flavonols, identifiée dans les feuilles et les fleurs (fraction n-butanol).

Dans le système 3 il n'y a qu'un seul composé qui a pu être identifié pour les extraits des feuilles (MF et EC) du *D. gnidium* qui est la rutine, une flavone glycoside.

Les composés mis en évidence pour les extraits de rameaux de *l'A. unedo* sont l'acide gallique, l'acide *para*-coumarique et le pyrocatechol qui sont des acides phénols. Pour les extraits des fleurs on a pu identifier seulement l'acide *para*-coumarique.

On n'a pas pu identifier des composés pour les fractions butanoliques sauf la rutine dans l'extrait des feuilles de l'arbousier.

► **Les flavonoïdes identifiés pour le *Daphne gnidium* L. et pour l'*Arbutus unedo* L.**

Notre présent travail nous a permis après une séparation par CCM des extraits du Daphné la mise en évidence des composés phénoliques suivants : l'acide gallique, le pyrocatechol, la rutine et la catéchine.

Peu de travaux ont été menés sur l'analyse qualitative de ses extraits par CCM, mais l'identification des flavonoïdes de cette plante a été mise au point par HPLC-PDA qui a pu mettre en évidence 9 flavonoïdes (**Tableau 3, Chapitre 3**) qui sont l'apigénine, l'apigénine 7-O-glucoside, la genkwanine, la genkwanine 5-O- β -D-primeveroside, la luteoline, la luteoline 7-O-glucoside, l'orientine, l'iso-orientine et la quercétine (**Nowik, 2005**).

Pour *l'Arbutus unedo*, une analyse par CCM dans une étude faite par Z. Males *et al.*, a mis en évidence la présence de flavonoïdes et d'acides phénoliques dans les extraits méthanoliques des feuilles et du fruit. Dans les feuilles ils ont indiqué la présence de la quercétine, l'isoquercétine, l'hyperoside et la rutine. L'acide chlorogénique a aussi été identifié, et que le fruit contenait seulement l'isoquercétine (**Maleš *et al.*, 2006**).

Une étude phytochimique précédemment faite a déterminé la présence, dans les feuilles de l'arbousier, la composition en flavonoïdes suivante : afzelin (kaempferol 3-rhamnoside), juglanin (kaempferol 3-arabinoside), avicularin (quercetin 3-arabinofuranoside), quercitrin (quercetin 3-rhamnoside), et hyperin (quercetin 3-galactoside) (**Dauguet et Foucher, 1982 in Fiorentino *et al.*, 2007**).

Une autre étude faite sur la caractérisation des composés chimiques de cette plante en utilisant les différentes techniques chromatographiques (CC, CCM, HPLC) et caractérisé par les différentes méthodes spectroscopiques et spectrométriques (UV-visible, RMN, SM) a pu déterminer la présence des différents métabolites purifiés à partir de l'extrait hydroalcoolique qui sont l'éthyl gallate, l'arbutine et ces dérivées p-hydroxybenzoyl et galloyl, la (+)-gallocatéchine et la catéchine, six flavonoïdes glycosides caractérisé par le kaempferol, la quercétine et la myricétine comme aglycones, liés au rhamnopyranose ou au arabinofuranose comme unités glycosidique. Les mêmes

composés ont été retrouvés dans les fractions méthanolique et aqueuse mais à des quantités différentes, la gallocatéchine était le composé le plus abondant dans la fraction aqueuse. Les extraits des racines ont présenté aussi les mêmes constituants, à l'exception d'une infime quantité en flavones, mais aussi la gallocatéchine était le composé le plus abondant (**Castaldi et al., 2008**).

Une analyse qualitative faite sur cette plante a permis la révélation à l'aide de la spectrométrie de masse de la présence de la catéchine, la catéchine phloroglucinol et la catéchine-O-gallate. Puis à l'aide de la chromatographie sur colonne des extraits brutes et l'analyse spectroscopique de la RMN ^1H et ^{13}C , ils ont pu isoler trois composés à partir des tiges qui sont la catéchine, l'afzeléchol et le 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy chroman-3-yl-4-hydroxybenzoate qui était identifiée pour la première fois, et ils ont pu isoler aussi deux composés dans les racines qui sont la catéchine et la catéchine phloroglucinol (**Dib, 2008**).

Par notre analyse qualitative par CCM mais par manque de témoins on a pu mettre en évidence seulement cinq composés phénoliques qui sont l'acide gallique, l'acide para-coumarique, le pyrocatechol, la rutine, et la quercétine, dont les deux derniers composés ont été aussi mise en évidence par Maleš *et al.* en 2006 et la quercétine identifié aussi par Nowik en 2005 et Fiorentino *et al.*, en 2007.

3.2. Essai d'identification des composés phénoliques par les spectres d'absorption en ultraviolet

Les spectres de flavonoïdes sont d'habitude déterminés dans une solution de méthanol, ou moins satisfaisant depuis une solution de flavonoïdes dans de l'éthanol. Cependant, du méthanol acidifié par HCl est recommandé pour les spectres des anthocyanines.

Le spectre typique consiste en deux absorptions maximales dans la gamme de 240 – 285 nm (bande II) et 300 – 550 nm (bande I). La position précise et les intensités relatives de ces maximums donnent des informations de grande valeur pour connaître la nature du flavonoïde et ces dérivés oxygénés.

Pour notre étude, les spectres UV ont été faits sur les fractions d'acétate d'éthyle et les fractions butanoliques à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (UV 800- vision 32).

Les spectres de la figure ci-dessous (**figure 30**) sont ceux de quelques témoins (catéchine, pyrocatechol et quercétine) :

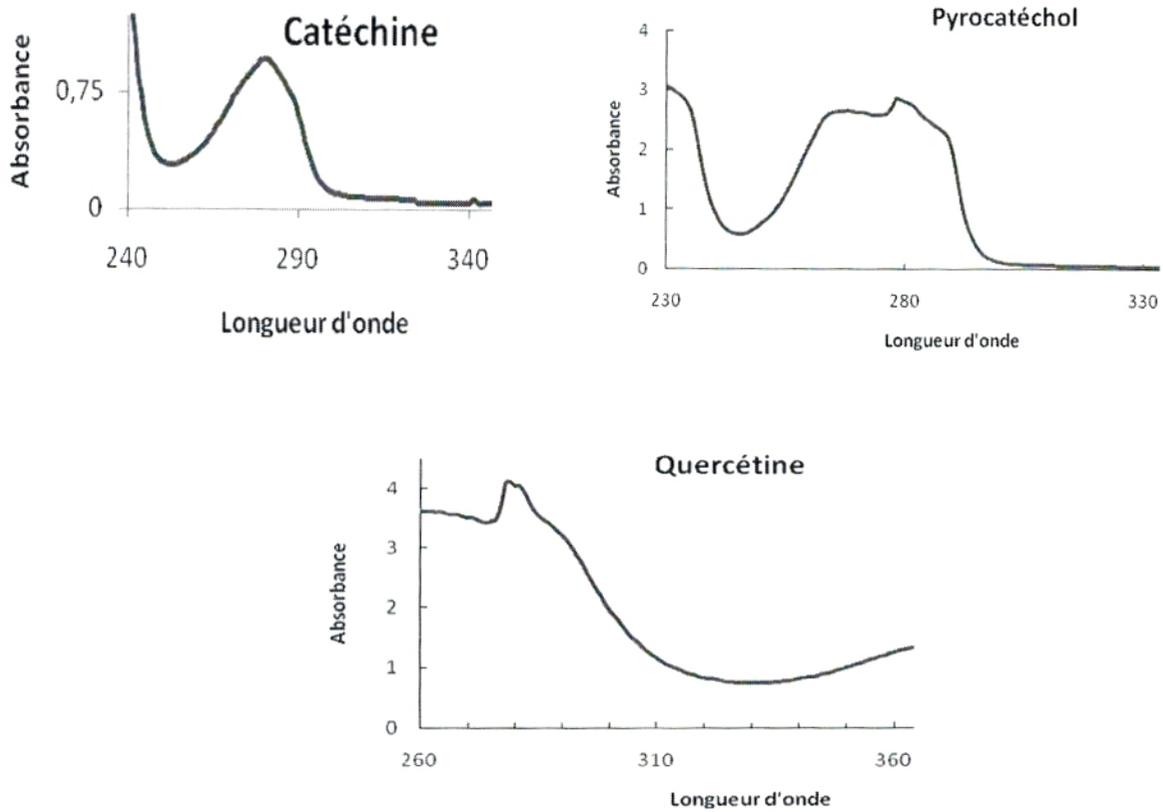
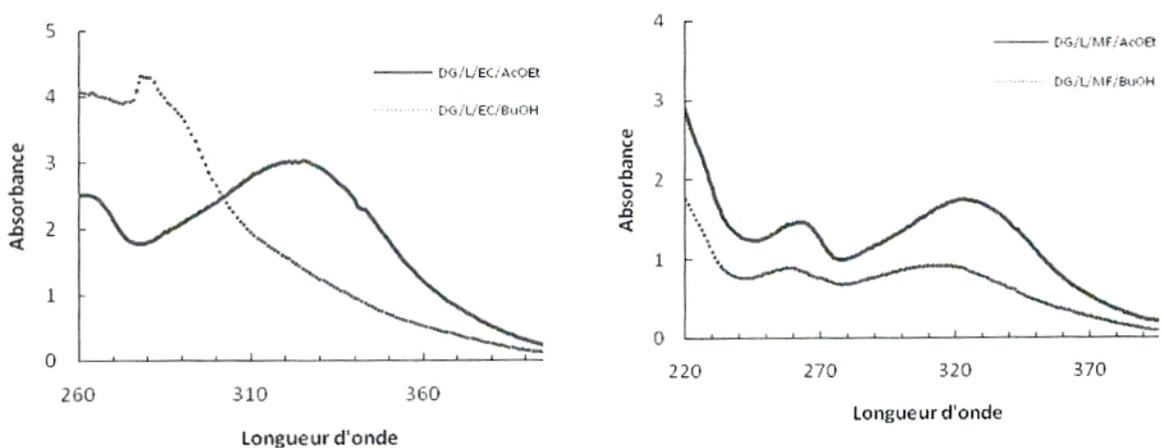


Figure 30 : Spectres d'absorption en ultraviolet de quelques témoins.

Les spectres des extraits des différentes fractions des deux plantes dans du méthanol sont représentés dans les **figures 31 et 32** :



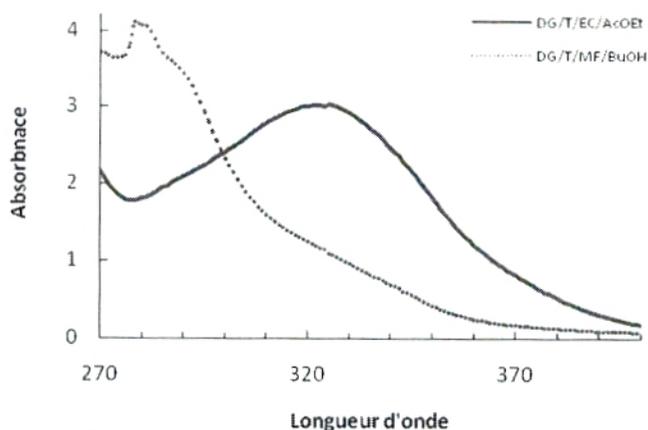


Figure 31 : Spectres d'absorption en ultraviolet des différents extraits du *Daphne gnidium* L.

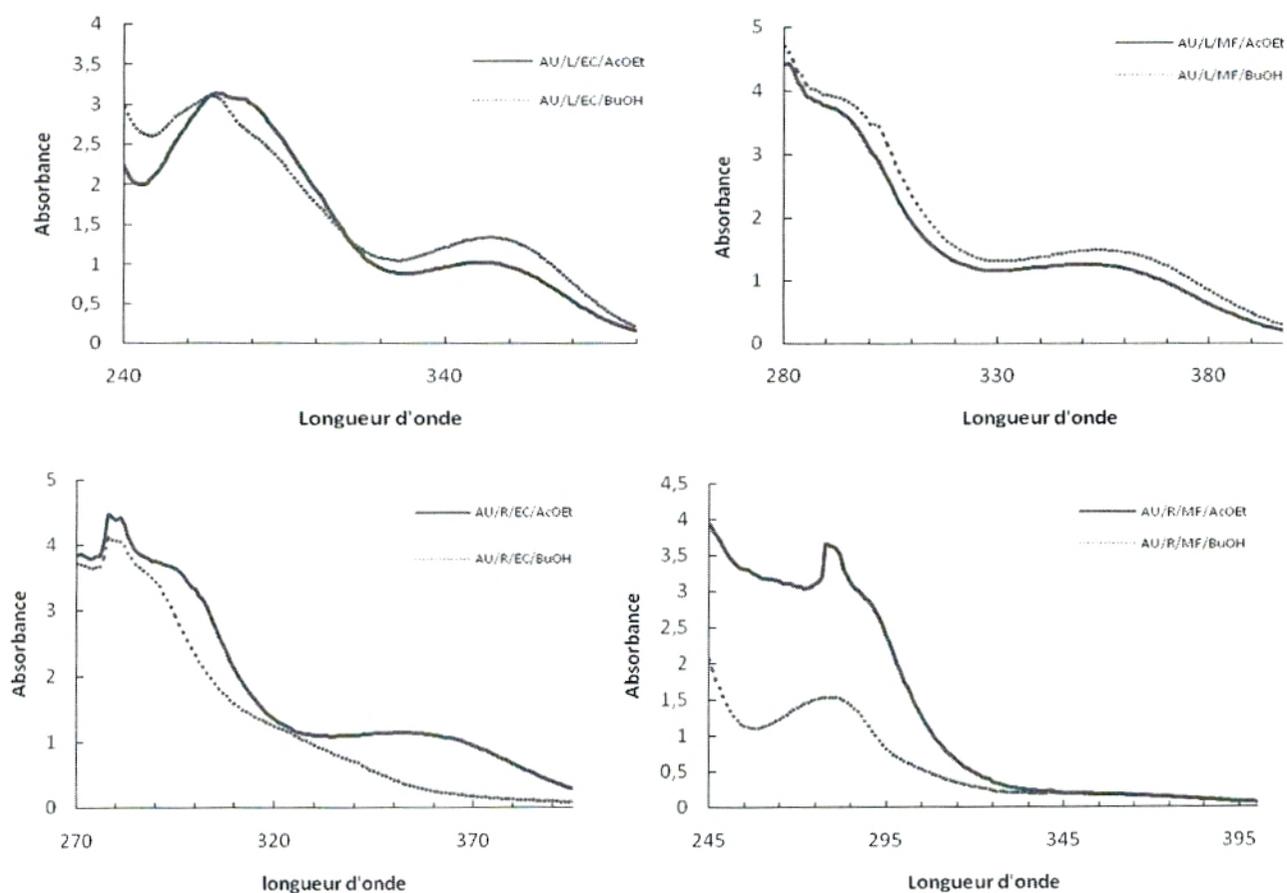


Figure 32 : Spectres d'absorption en ultraviolet des différents extraits de l'*Arbutus unedo* L.

En comparant nos spectres avec ceux de la littérature (Markham, 1982 et Rijki *et al.*, 2006) et des témoins nous avons pu identifier la classe majoritaire contenant dans nos extraits, concernant la fraction AcOEt issue de l'extraction à chaud et de la macération à froid des feuilles du Daphné la band II entre 250-280 nm et la band I entre 330-360 nm peut affirmer et selon Markham la présence de la classe de flavonol 3-OH substitué.

Pour les rameaux de *A. unedo* et pour la fraction AcOEt issue de la macération à froid représente un spectre avec une bande II entre 275 et 295 nm et une bande I au environ de 300-330 nm qui sont caractéristique des dihydroflavonols.

Le spectre de la fraction BuOH des rameaux de l'Arbousier issue de la macération à froid représente une flavon-3-ol comparé a celui de la catéchine (voire illustration des spectres de Rijki *et al.*, 2006 dans le chapitre matériel et méthodes)

L'interprétation des résultats des spectres UV pour les extraits des deux plantes à savoir le *D. gnidium* et l'*A. unedo* seront représenté dans le tableau suivant (**tableau 21**) :

Tableau 21 : Interprétation des spectres UV des fractions des extraits des deux plantes

Plantes	Parties étudiées	Type d'extraction	Fraction acétate d'éthyle		Fraction n-butanol	
			Type de flavonoïdes	Longueur d'onde	Type de flavonoïdes	Longueur d'onde
Daphne gnidium	Feuilles	EC	Flavonol 3-OH substitué	BII : 250-280 nm BI : 330-360 nm	Flavonol*	BII : 250-280 nm BI : 330-360 nm (quercétine)
		MF	Flavonol 3-OH substitué	BII : 250-280 nm BI : 330-360 nm	Flavonol 3-OH substitué	BII : 250-280 nm BI : 330-360 nm
	Tiges	EC	Flavonol 3-OH substitué	BII : 250-280 nm BI : 330-360 nm	/	/
		MF	Flavonol**	BII : 260-290 nm BI : 310-360 nm	/	/
Arbutus unedo	Feuilles	EC	Flavonol 3-OH libre	BII : 250-280 nm BI : 350-385 nm	Flavonol 3-OH libre	BII : 250-280 nm BI : 350-385 nm
		MF	Flavonol 3-OH libre	BII : 250-280 nm BI : 350-385 nm	Flavonol 3-OH libre	BII : 250-280 nm BI : 350-385 nm
	Rameaux	EC	Flavones	BII : 250-280 nm BI : 320-360 nm	dihydro- flavonol	BII : 275-295 nm BI : 300-330 nm
		MF	dihydro- flavonol	BII : 275-295 nm BI : 300-330E nm	Flavan-3-ol*	280 nm (catéchine) *

E : épaulement ; BI : Bande I ; BII : Bande II ; * : interprétation du résultat selon les spectres des témoins ; ** selon Rijki *et al.*, (2006).

Ces résultats confirment à un certain pourcentage les résultats trouvés par la chromatographie sur mince, c'est le cas par exemple des fractions AcOEt et BuOH des feuilles de l'arbusier qui ont donné pour la CCM des spots violette sous lumière UV qui sont dus selon la littérature et les témoins aux flavonols et les spectres de ces fractions sont caractéristiques des flavonols qui absorbent dans une bande I entre 350 et 385 nm et une bande II entre 250 et 280 nm.

5. L'étude de l'activité antioxydante

1. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

C'est une analyse de l'activité antioxydante rapide, reproductible, et facile à exécuter.

Dans cette méthode, la détermination de l'activité antioxydante est basée sur la capacité des polyphénols (flavonoïdes) à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} .

Bien que cette analyse, à l'origine, à été développée pour mesurer la capacité antioxydante du plasma sanguin, elle a pu être employée pour la mesure de l'activité antioxydante d'une large variété d'échantillons biologiques comme les échantillons issue de plantes (**Borneo et al., 2009**).

En traçant les histogrammes des absorbances obtenues de nos différents échantillons (**figures 33 et 34**), on a pu remarquer que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons, et ça été confirmé par beaucoup d'auteurs (**Benhammou, 2006 ; Su et al., 2008 ; Lieu et al., 2009**).

En comparant les valeurs obtenues pour les extraits de l'*Arbutus unedo* à celle de l'acide ascorbique (D.O égale à $2,580 \pm 0,051$) à la concentration de 0,75 mg/ml on peut dire que nos les valeurs des D.O de nos extraits sont plus ou moins proches de celui-là.

Pour les feuilles de l'*A. unedo* l'extraction à chaud à donner de meilleurs résultats que la macération à froid pour les deux fractions d'AcOEt et de BuOH, et la fraction d'AcOEt (absorbance égale à $2,433 \pm 0,09$ pour EC et $2,053 \pm 0,07$ pour MF) à montrer une grande capacité de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} que la fraction BuOH ($1,903 \pm 0,009$ pour EC ; $1,753 \pm 0,009$ pour MF).

Pour les fleurs des deux extraits MF et EC ont montré presque une même capacité à réduire le fer et la même chose que pour les feuilles l'activité de la fraction AcOEt ($3,061 \pm 0,001$ pour EC ; $3,107 \pm 0,01$ pour MF) est supérieur a celle du n-butanol ($1,949 \pm 0,009$ pour EC ; $2,355 \pm 0,017$ pour MF).

Par contre pour les rameaux l'extrait de la MF à montré une grande capacité par rapport à celui de l'EC mais toujours est-il que l'activité dans l'AcOEt ($2,983 \pm 0,007$ pour EC ; $1,143 \pm 0,003$ pour MF) est supérieur à celle du BuOH ($2,142 \pm 0,003$ pour EC ; $0,316 \pm 0,007$ pour MF), et ceci a pu être confirmé par d'autre études qui suppose que l'augmentation de l'activité dépend de l'augmentation de la polarité des solvant (**Ardestani, 2007 ; Matanjun et al., 2008 ; Atmani, 2009 ; Li et al., 2009**).

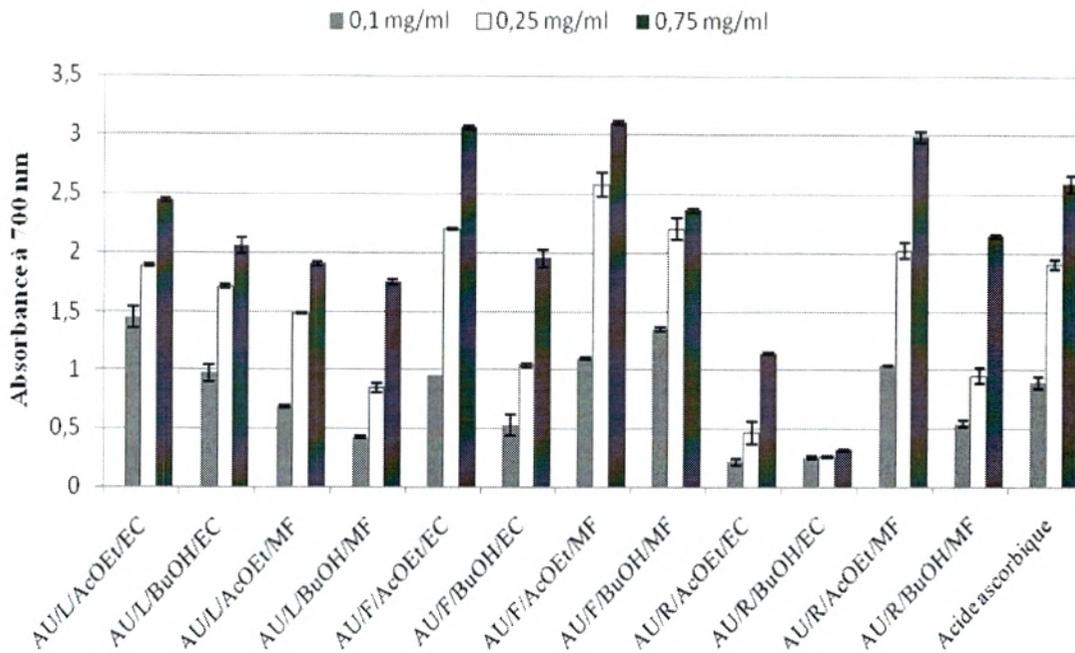


Figure 33 : Pouvoir réducteur des extraits acétate d'éthyle et n-butanol de *l'Arbutus unedo* L.

Pour la même concentration de 0,75 mg/ml de l'acide ascorbique (D.O égale à $2,580 \pm 0,051$) le *D. gnidium* a montré une activité plus faible en ce qui concerne les fractions butanoliques des feuilles ($0,012 \pm 0,009$ pour EC et $0,163 \pm 0,007$ pour MF) et les fractions butanoliques des tiges ($0,189 \pm 0,007$ pour EC et $1,169 \pm 0,003$ pour MF).

Les fractions d'acétate d'éthyle des tiges du *Daphné* ont montré une capacité à réduire le fer ($1,389 \pm 0,003$ pour EC et $1,036 \pm 0,007$ pour MF) inférieur à celle de l'acide ascorbique mais plus ou moins supérieur à celle des feuilles ($0,758 \pm 0,01$ pour EC et $1,107 \pm 0,01$ pour MF).

Donc pour les deux plantes on ne peut pas conclure à une parfaite comparaison entre l'activité antioxydante pour l'EC et la MF puisque les résultats montrent que chaque extrait réagi d'une manière différente.

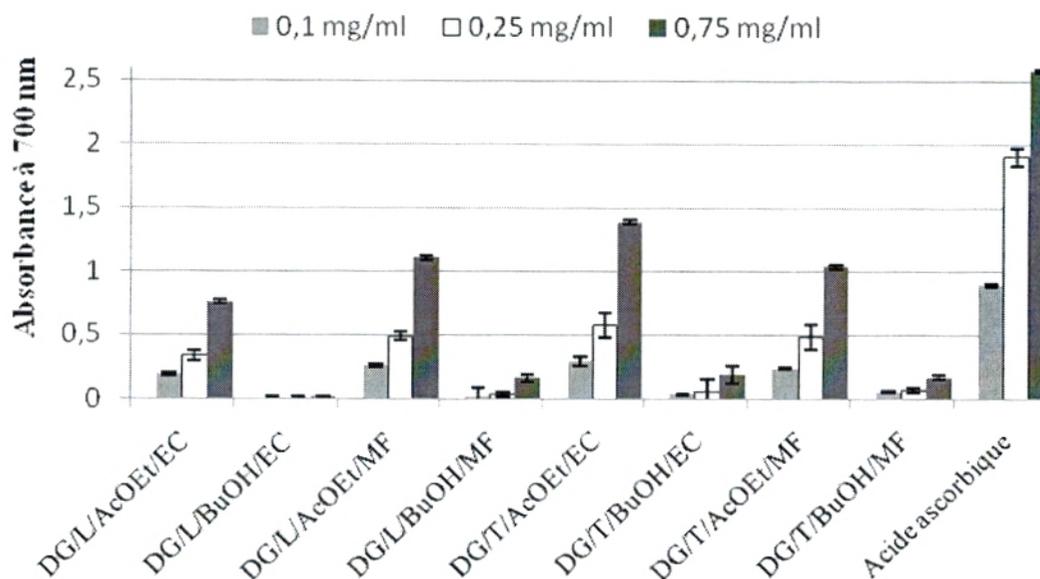
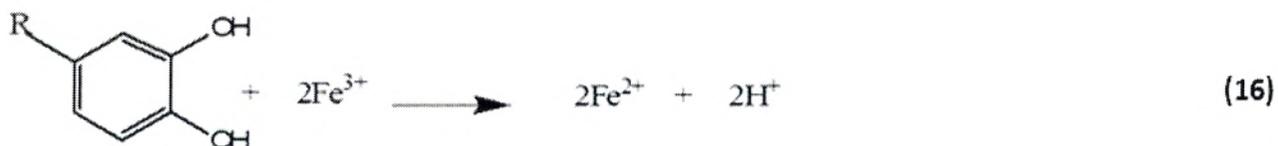
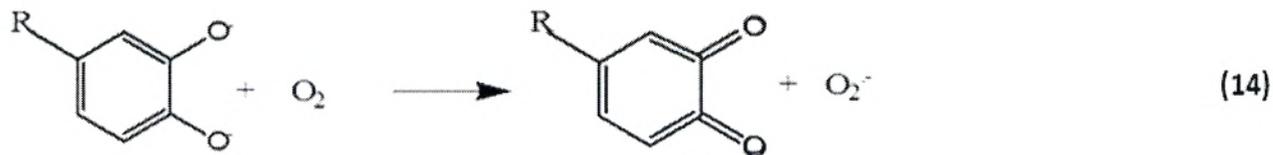
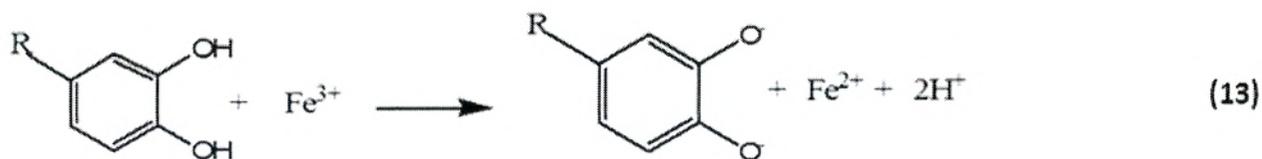


Figure 34 : Pouvoir réducteur des extraits acétate d'éthyle et n-butanol du *Daphne gnidium* L.

Une étude récente faite sur cette capacité de réduction le fer par les polyphénols des plantes a indiquée que le noyau catéchol est la seule structure qui est associée positivement dans le pouvoir réducteur et selon cette étude cette structure augmenterait le pouvoir réducteur d'un composé à 36% par rapport à un autre qui n'en contient pas. Ils ont suggéré que cette activité a été due à la participation des groupements $-OH$ liés au noyau catéchol.

La réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} par les groupes $-OH$ du catéchol peut être décrite par les quatre réactions suivantes :



L'oxydation initiale du catéchol par Fe^{3+} conduit à la génération de Fe^{2+} et une structure en semi-quinone (**réaction 13**). La semi-quinone peut réagir avec l' O_2 dissous dans le mélange réactionnel avec une libération ultérieure d'ions superoxydes (**réaction 14**). L'ion superoxyde peut également réduire l'ion Fe^{3+} (**réaction 15**). Ainsi, l'oxydation de 2 groupements $-\text{OH}$ peut résulter de la réduction de 2 ions Fe^{3+} (**réaction 16**).

L'activité des groupements $-\text{OH}$ du catéchol peut être modulée par une variété de substituant sur le noyau aromatique. Par exemple, la substitution sur le noyau phénolique d'un groupement donneur d'électron ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, ou d'autre substituant aliphatiques) promouvrai des réactions dans lesquelles les noyaux phénoliques acquièrent une tendance de donner des électrons via un groupement $-\text{OH}$, et finalement augmentent leur capacité de réagir comme des réducteurs.

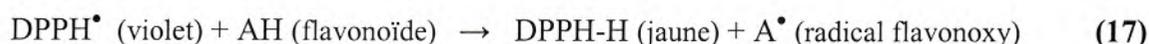
D'autre part, la double liaison dans le substituant aliphatique conjuguée avec le noyau aromatique diminue la réactivité du groupement $-\text{OH}$ (**DeGraft-Johnson et al., 2007**).

2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Puisque le principal mécanisme d'action antioxydante des polyphénols des végétaux est le piégeage des radicaux libres, plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des végétaux par le piégeage de radicaux libres synthétiques en solution dans des solvants polaires comme le méthanol à température ambiante. Les radicaux les plus fréquemment utilisés incluent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et l'acide 2,2-O-azino-bis (3-ethylbenzoline-6-sulphonique) (ABTS).

Dans cette étude, la méthode par le DPPH a été choisie pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de nos plantes parce qu'elle est l'une des méthodes les plus simple, les plus rapide et les plus efficace à cause de la grande stabilité du radical (**Bozin, et al., 2008**).

L'activité antioxydante est déterminé par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH à 515 nm, qui est du à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H, par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire comme le montre les équations suivantes (**17 et 18**) (**Paixão et al., 2007 ; Maisuthisakul et al., 2007 ; Da Silva Pinto, 2008**) :

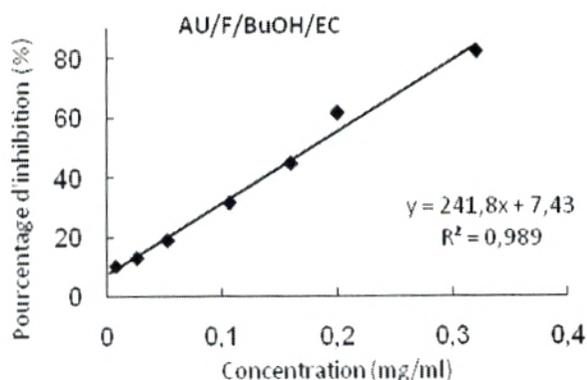
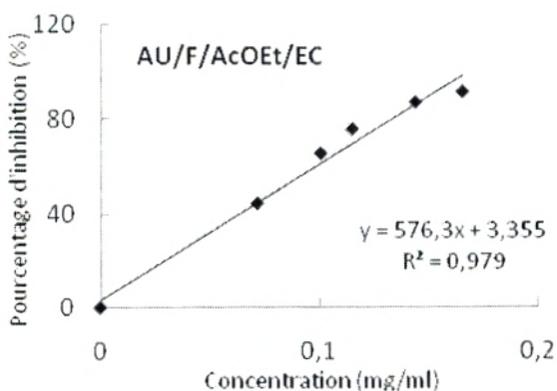
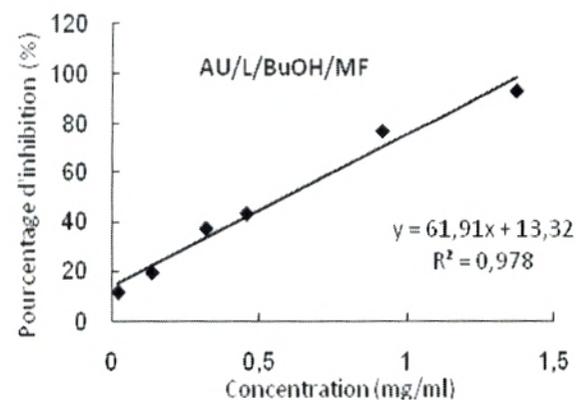
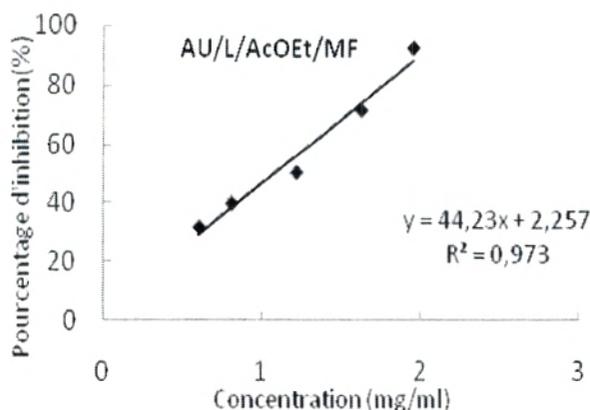
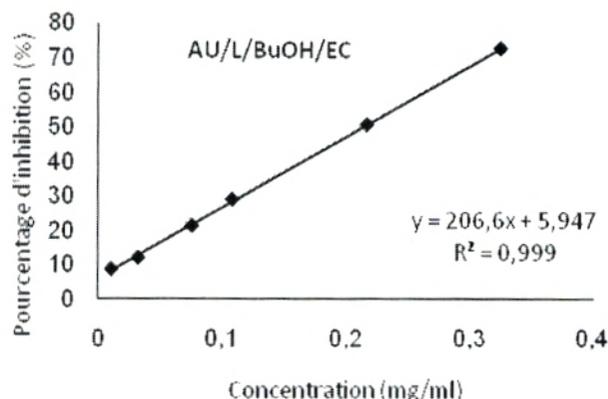
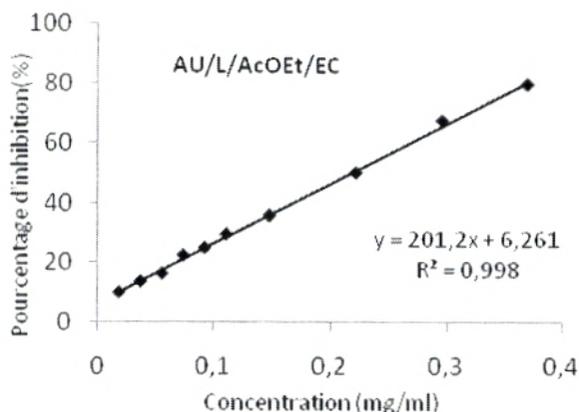


La capacité de la réduction du radical libre DPPH[•] pendant le temps de 30 min par les extraits des deux plantes est représentée par les graphes de la figure 35 et la figure 37 des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations en extrait et en acide ascorbique (**figure 38**).

L'IC₅₀, paramètre couramment employé pour mesurer l'activité antioxydante, est pour chaque extrait la concentration nécessaire pour la réduction de 50% du radical DPPH dans une période de temps définie, une valeur faible d'IC₅₀ correspond à une activité antioxydante plus élevée de l'extrait. Les IC₅₀ sont donc calculés à partir de ces graphes (**figure 35, 37 et 38**).

L'activité anti-radicalaire qui est définie comme l'inverse de l'IC₅₀ (1/IC₅₀) des différents extraits, est représenté par les histogrammes, figures **36 et 39**. Elle est utilisé pour mieux différencier et classer les extraits d'antioxydants, les histogrammes représenteront donc une comparaison entre les activités anti-radicalaires des différents extraits et celui de l'acide ascorbique (**Maisuthisakul et al., 2007**).

On a observé que les fractions dans l'acétate d'éthyle (AcOEt) ont donné de meilleurs résultats que celles dans le n-butanol (BuOH), et ceci a été aussi obtenu dans d'autre études, même remarque que pour le FRAP, l'activité antioxydante augmentera avec l'augmentation de la polarité du solvant (**Benhammou *et al.*, 2008 ; Tian *et al.*, 2009 ; Fabri *et al.*, 2009**).



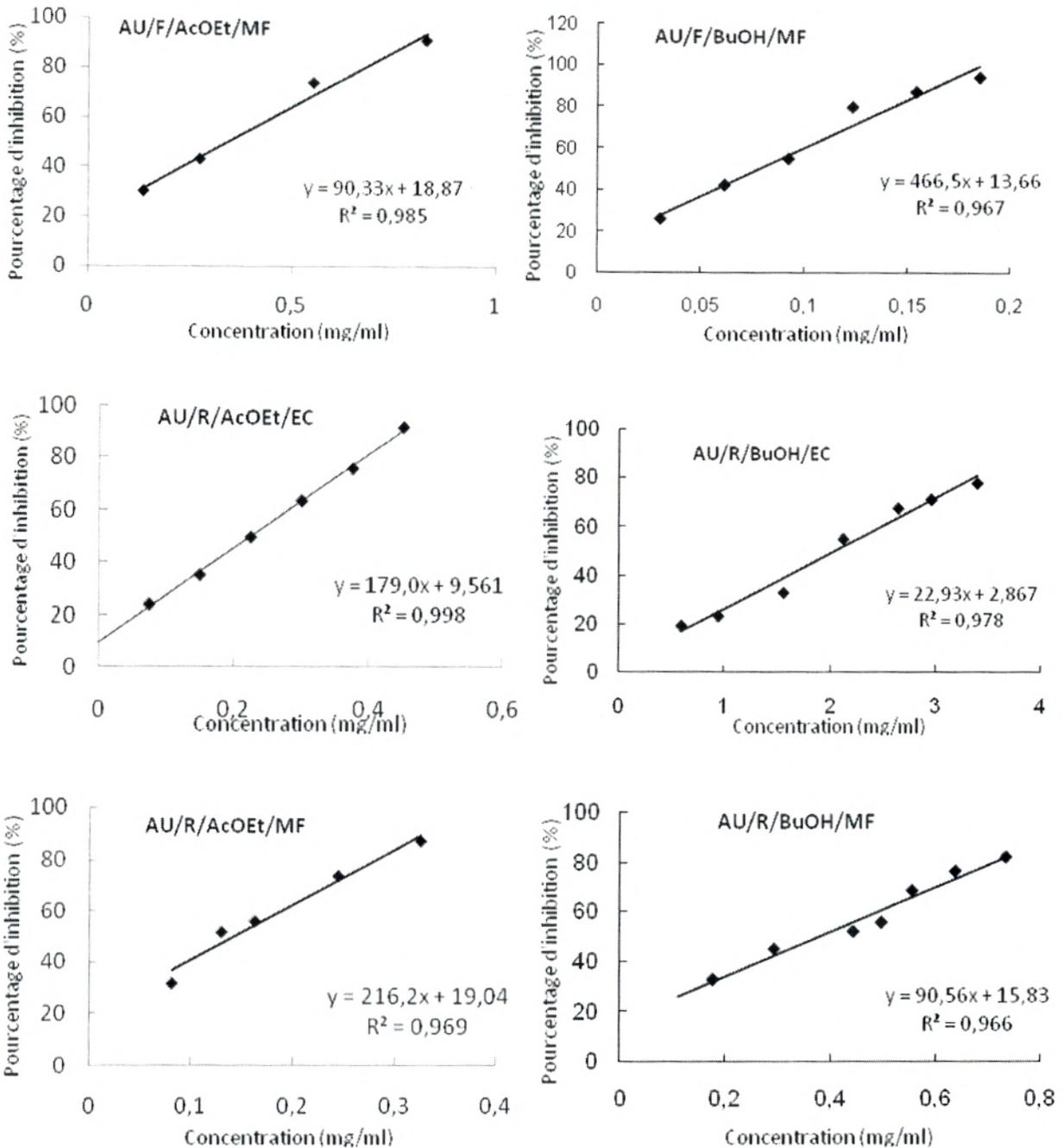


Figure 35 : Graphes illustrants le pourcentage d'inhibition des différents extraits de l'*Arbutus unedo* L.

Pour l'arbusier, le meilleur résultat obtenu a été celui de la fraction de l'acétate d'éthyle des fleurs (IC₅₀ égale à 0,002 mg/ml pour EC et 0,0019 mg/ml pour la MF) qui a donné une activité antioxydante supérieur à celui de l'acide ascorbique (0,0030 mg/ml), ensuite celui des rameaux et puis des feuilles (0,0054 pour EC et 0,027 mg/ml pour MF). Les fractions butanoliques ont donné des activités antioxydantes plus faible que celle de l'acide ascorbique qui sont dans

l'ordre suivant : fleurs > rameaux > feuilles avec des concentrations inhibitrices du DPPH' à 50% égale à 0,0044 pour EC et 0,0086 mg/ml pour la MF ; 0,051 pour EC et 0,0094 mg/ml pour la MF ; 0,0053 pour EC et 0,014 pour la MF mg/ml respectivement.

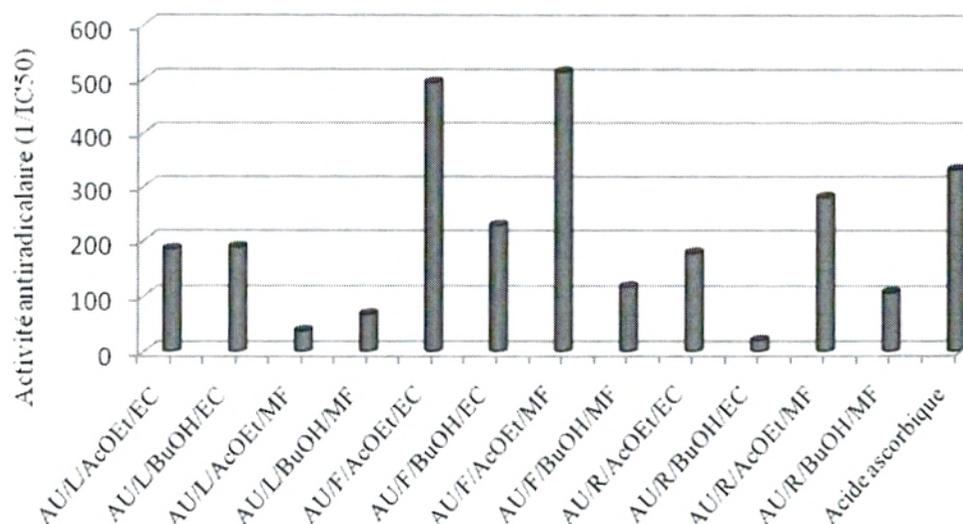


Figure 36 : Activité anti-radicalaire des extraits acétate d'éthyle et n-butanol de *Arbutus unedo* L.

On a observé aussi que les résultats des fractions des différents extraits obtenues par extraction à chaud sont plus élevés que celles obtenues par macération à froid, à l'exception des rameaux où c'était l'inverse (0,0056 mg/ml pour EC et 0,0035 mg/ml pour MF).

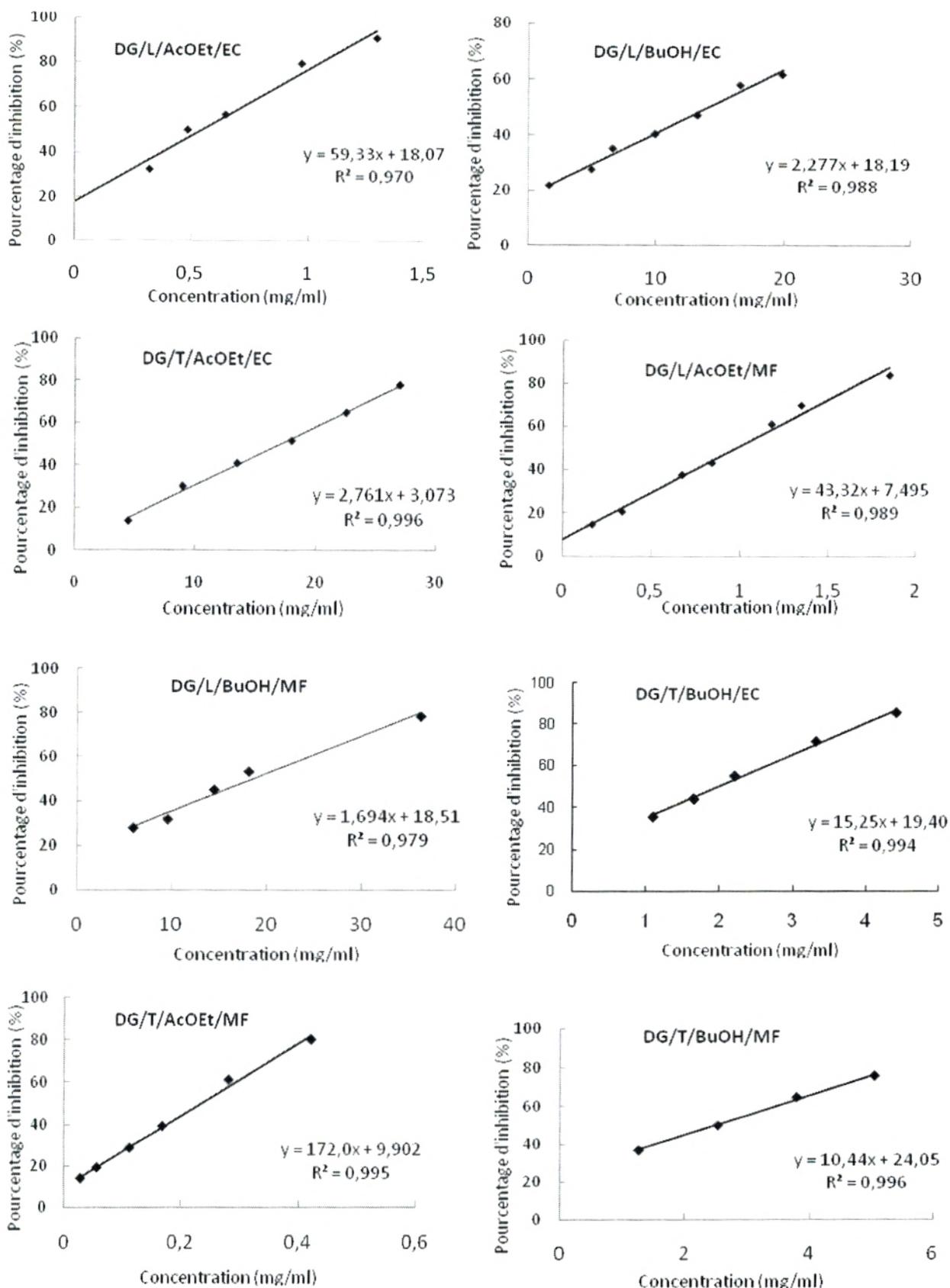


Figure 37 : Graphes illustrant les pourcentages d'inhibition des différents extraits du *Daphne gnidium*

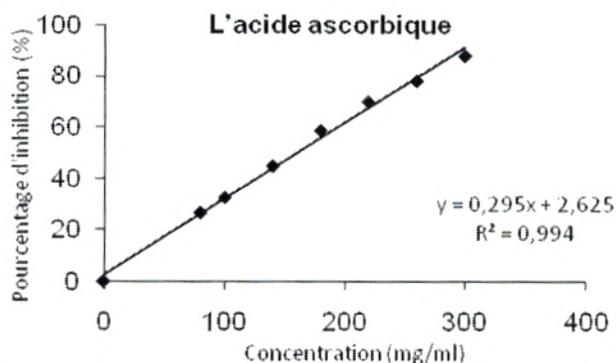


Figure 38 : Graphe illustrant les pourcentages d'inhibition de l'acide ascorbique

Tous les résultats de l'activité anti-radicalaire obtenus pour le *D. gnidium* ont été nettement plus faibles que le résultat de l'activité de l'acide ascorbique à réduire le DPPH à l'exception de la fraction d'acétate d'éthyle des tiges (172,42 ml/mg) mais elle reste moins importante que celle de l'acide ascorbique (331,16 ml/mg).

Concernant les extraits des feuilles, les activités anti-radicalaires des fractions AcOEt ont donné de meilleurs résultats que ceux dans le butanol qui sont de l'ordre de 74,32 pour EC et 40,76 ml/mg pour MF, les fractions butanoliques ont données les valeurs suivantes : 2,86 pour EC et 2,15 ml/mg pour MF.

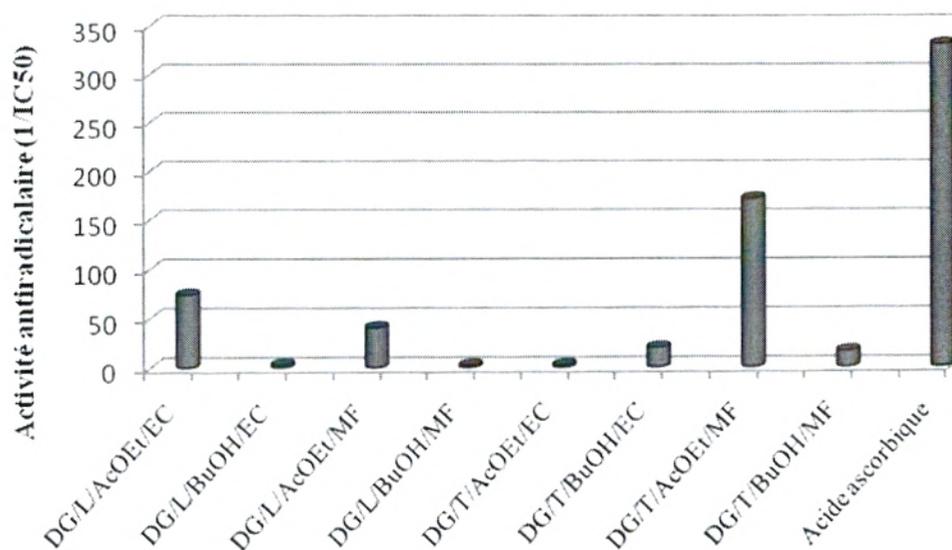


Figure 39 : Activité antiradicalaire des extraits acétate d'éthyle et n-butanol du *Daphne gnidium* L.

Pour l'*A.unedo* la fraction d'AcOEt a montré une importante activité que celle du BuOH et que les extraits de l'extraction à chaud ont une activité plus élevée que ceux de la macération à froid. Même que les tiges ont présenté des résultats inverses (MF > EC). Pour ce résultat on suppose que par la macération à froid on a pu obtenir un composé en petite quantité mais qui est doté d'une grande activité ou qui influence sur l'activité du mélange en lui apportant un effet synergique (**Iacopini et al., 2008**).

Cette exception a été aussi rencontrée dans les résultats de la réduction du fer par la méthode de FRAP pour ces mêmes extraits (tiges pour *D. gnidium* et Rameaux pour *A. unedo*).

Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant. L'activité des flavonoïdes pour le piégeage de ce radical dépend de la présence des groupements hydroxyles, et plus particulièrement du 3-OH. Aussi les flavonoïdes les plus puissants sont ceux qui comportent le groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3. La présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo est aussi connue comme responsable de la délocalisation des électrons du cycle B et augmentera ainsi la capacité du piégeage d'un radical.

Une meilleure activité requiert essentiellement la structure 3',4'-ortho-dihydroxy sur le cycle B et le groupement 4-carbonyl sur le cycle C qui confère la stabilité au radical flavonoxy (A' dans la réaction 17), ce dernier va réagir avec d'autres radicaux (réaction de couplage radical-radical) pour donner une structure stable (une quinone dans le cas des flavonoïdes, voir figure 10, Chapitre 2) (**Harborne et Williams, 2000 ; Sharififar et al., 2009**).

3. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène (*H₂O₂ scavenging activity*)

Bien que le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre proprement dit, mais c'est une source importante de radicaux libres hydroxyles qui sont toxiques, surtout en présence d'ions métalliques comme le cuivre ou le fer.

Aussi, le peroxyde d'hydrogène peut traverser les membranes cellulaires et peut donc oxyder et endommager de nombreux composés cellulaires.

Pour notre présente étude, on soumet cette molécule qui est plutôt toxique à l'effet des antioxydants (concentration égale à 0,1 µg/ml) présents dans les extraits végétaux et on suit

l'évolution de la réaction en fonction du temps (40 minutes) puis on calcule le pourcentage du piégeage du H₂O₂ qui est égale à $[(A_C - A_T) / A_C] \times 100$

A_C : Absorbance à 230 nm du contrôle et A_T : Absorbance à 230 nm du test.

La diminution de ce pourcentage est proportionnelle à la diminution de l'absorbance. Cette dernière est due à la molécule de H₂O₂ qui absorbe dans l'UV à 230 nm (Malgalhaes *et al.*, 2008).

Les résultats du Tableau 20 montrent que au cours de la cinétique (40 minutes) l'absorbance (à 230 nm) diminue en fonction du temps et cela prouve que le peroxyde d'hydrogène dont elle est due cette absorbance a été effectivement converti en H₂O par les antioxydants présents dans les extraits des plantes.

Tableau 22 : Cinétique de l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits bruts méthanoliques des deux plantes (les valeurs représentent les pourcentages d'inhibitions)

Echantillons	Temps (min)				
	0	10	20	30	40
BHA	90,65	75,86	61,98	53,27	45,63
DG/L/EC	66,14	42,43	37,45	28,41	09,26
DG/L/MF	34,45	33,29	26,54	18,69	14,66
DG/T/EC	68,11	46,34	20,69	18,79	13,83
DG/T/MF	11,74	09,51	05,91	05,51	05,02
AU/L/EC	24,03	18,31	14,37	09,59	03,83
AU/L/MF	25,46	19,61	04,01	03,72	02,09
AU/F/EC	39,73	36,05	18,81	10,79	06,60
AU/F/MF	21,64	15,61	09,63	07,83	02,19
AU/R/EC	26,98	09,70	05,15	02,29	00,89
AU/R/MF	20,91	18,65	16,18	13,94	11,12

La figure 40, montre qu'à la concentration de 0,1 µg/ml et au temps initial (t=0), les extraits bruts méthanoliques du *D.gnidium* par extraction à chaud (feuilles 66,14 % et tiges 68,11 %) ont une bonne activité pour le piégeage de H₂O₂ mais un peu plus faible au contrôle BHA (90,65 %) et que tous les extraits par macération à froid des deux plantes ont montré une activité inférieure à celle de l'extraction à chaud.

Pour l'*A. unedo* (extraction à chaud) les pourcentages d'inhibitions obtenus des différentes parties de la plante sont dans l'ordre suivants : feuilles > rameaux > fleurs qui sont de : 39,73 ; 26,98 et 25,46 % respectivement.

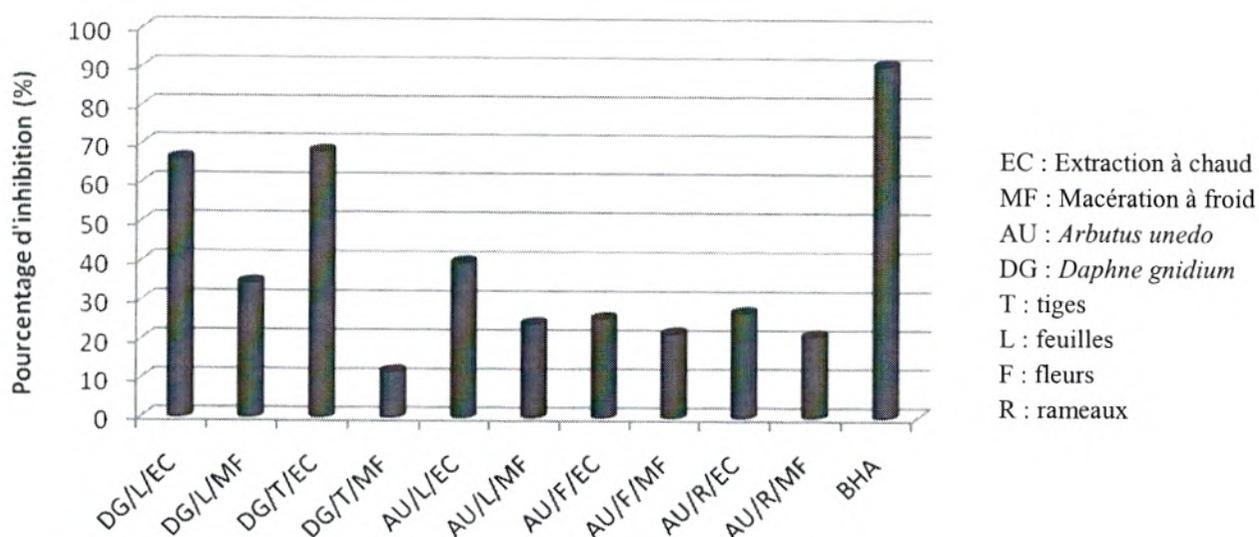


Figure 40 : L'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène pour l'extrait brut méthanolique des deux plantes au temps initial ($t=0$)

Il est bien établi que le peroxyde d'hydrogène est dangereux puisqu'il a la capacité de donner le radical hydroxyle toxique et donc il est indispensable d'insister sur son élimination.

En effet, il est déjà prouvé que les polyphénols alimentaires protègent les cellules animales et bactériennes de la toxicité induite par H_2O_2 . Nos résultats indiquent que les composés antioxydants (flavonoïdes) dans nos extraits sont de bons donneurs d'électrons, ce qui permet l'accélération de la conversion du H_2O_2 en H_2O et donc l'élimination du H_2O_2 (Shon *et al.*, 2007 ; Atmani *et al.*, 2009).

4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (*β -carotene bleaching method*)

L'acide linoléique présent dans le mélange réactionnel, produit des hydroperoxydes comme radicaux libres durant l'incubation à $50^\circ C$. La présence d'antioxydants dans le milieu comme ceux présent dans nos extraits réduit l'oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes. Ces derniers qui sont formés dans le système seront donc neutralisés par les antioxydants.

Dans cette étude nous avons évalué l'activité antioxydante des différentes parties de nos deux plantes par la méthode de décoloration du β -carotène. Le β -carotène présente une forte activité biologique et est importante comme composé physiologique puisqu'elle est le précurseur

du rétinol. Ainsi le taux de dégradation ou de décoloration du β -carotène dépend de la capacité antioxydante de nos extraits.

Les hydroperoxydes de l'acide linoléique attaquent la molécule de β -carotène et, par conséquent, subit une décoloration rapide en l'absence d'antioxydants. Cette diminution de la coloration correspond à une diminution de l'absorbance suivie spectrophotométriquement (**Kubola et Siriamornpun, 2008**).

Les résultats de l'effet antioxydant de nos différents échantillons sur l'auto-oxydation de l'acide linoléique sont représentés dans les graphes ci-dessous (**figure 41, 42**).

L'histogramme (**Figure 43**) représente le pourcentage d'inhibition pour chaque extrait par rapport à celui du BHA à la même concentration de 2,5mg/ml.

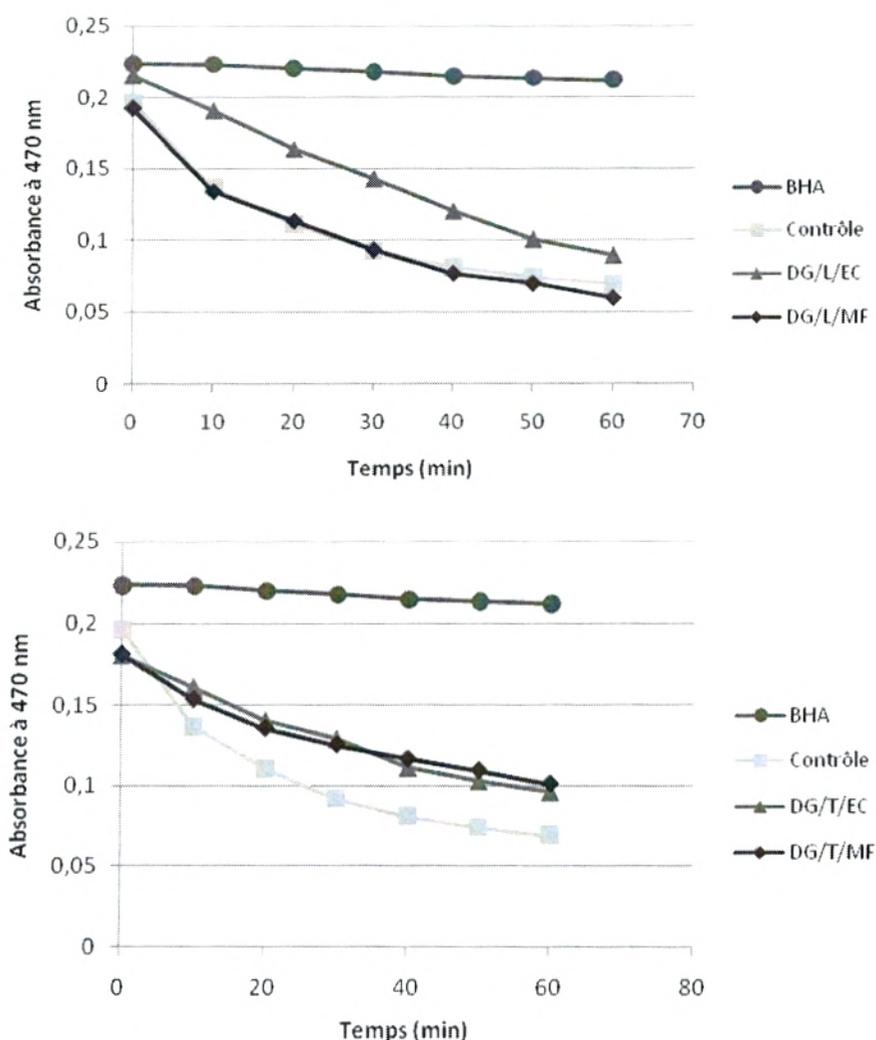


Figure 41 : Activité antioxydante des extraits bruts méthanoliques des tiges et feuilles pour *Daphne gnidium* issus de l'extraction à chaud et de la macération à froid avec le BHA comme antioxydant de référence.

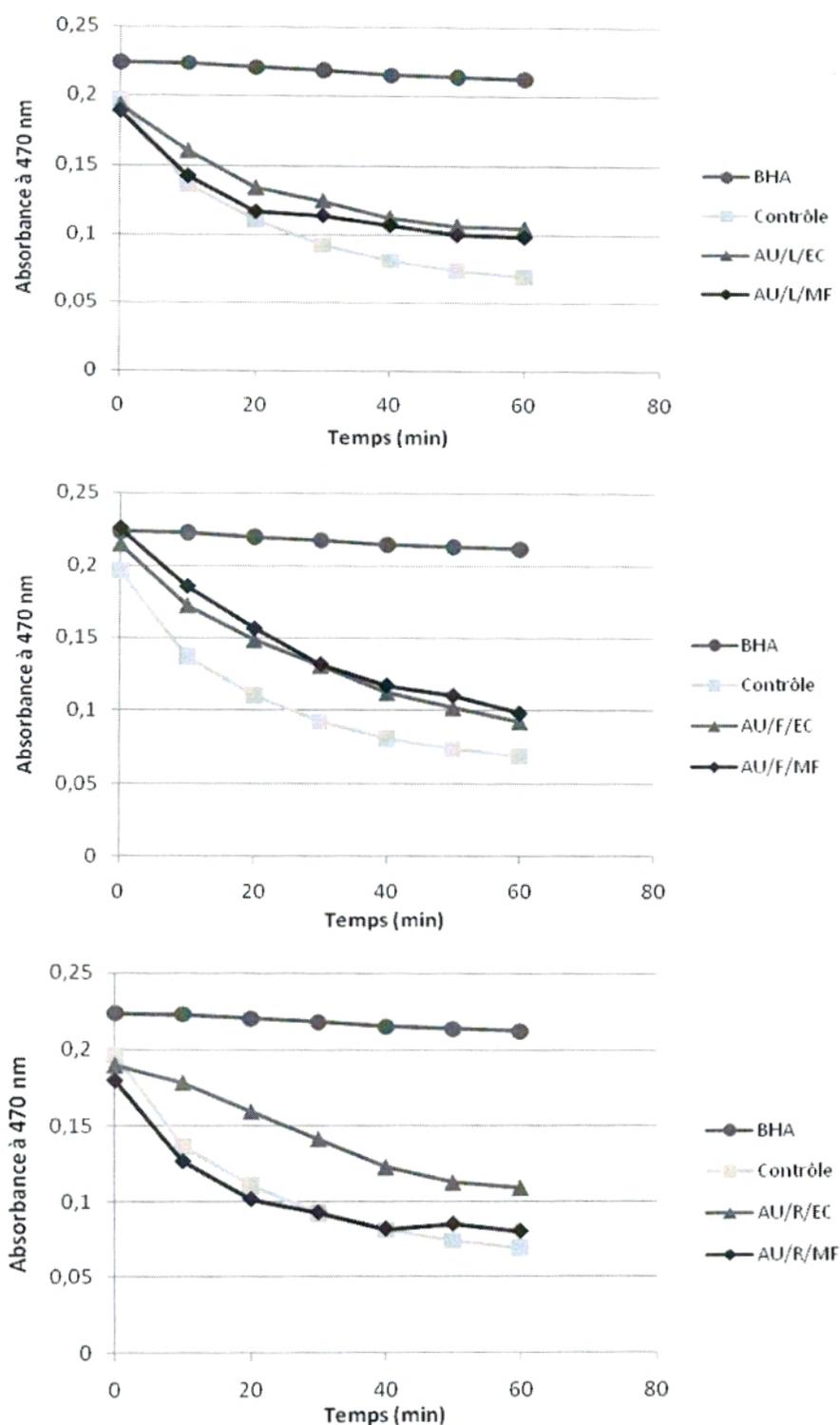


Figure 42 : Activité antioxydante des extraits bruts méthanoliques des feuilles, fleurs et rameaux de *Arbutus unedo* issus de l'extraction à chaud et de la macération à froid avec le BHA comme antioxydant de référence.

Tous les extraits ont eu des activités antioxydantes inférieures à celle du standard, le BHA, mais elle reste toutefois modérée pour quelques-uns en les comparant avec le contrôle.

Les extraits de la macération à froid des différentes parties des deux plantes étudiées ont montré presque une même activité que les extraits de l'extraction à chaud, à l'exception des rameaux de *Arbutus unedo* et des feuilles du *Daphne gnidium* qui étaient plutôt proches du contrôle négatif qui ne contient aucun antioxydant.

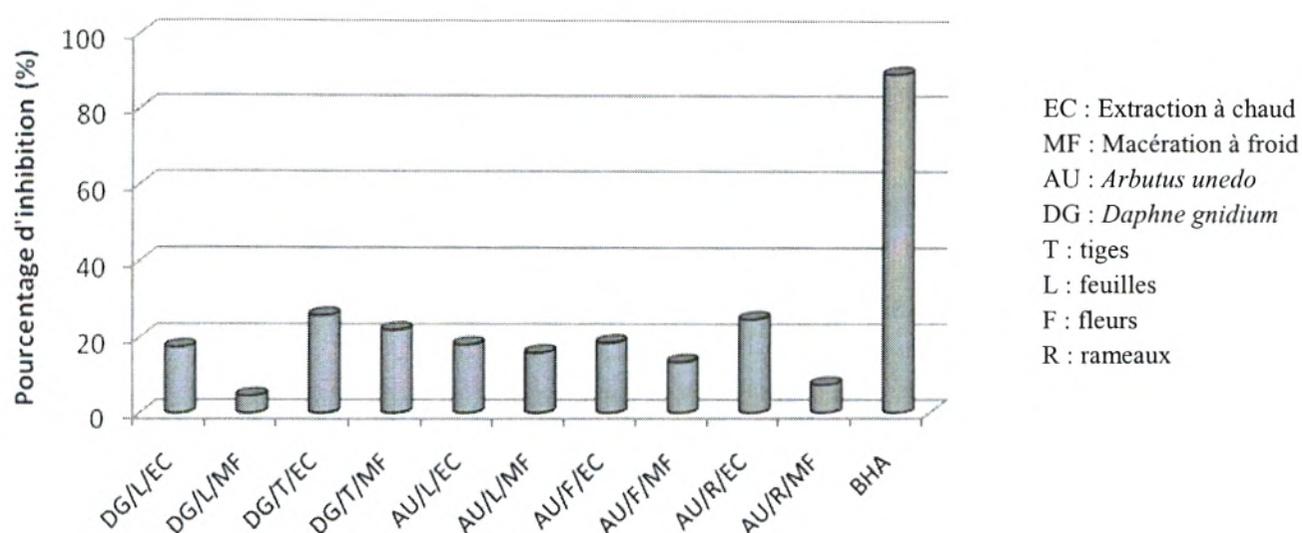


Figure 43 : Pourcentage d'inhibition de la décoloration de la β -carotène.

Comme le confirme l'histogramme, les extraits ont une activité modérée par rapport au BHA (89,4 %) qui est pour les extraits du *D. gnidium* par extraction à chaud de l'ordre de 17,5 % pour les feuilles et 25,9 % pour les tiges, de même pour *A. unedo* elle est de 24,9 % ; 18,7 % ; 18,2 % pour les rameaux, les fleurs et les feuilles, respectivement.

Les extraits méthanoliques de ces plantes font preuve d'une capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique même qu'elle n'est pas aussi élevée que celle du BHA.

Les lipides membranaires sont riches en acides gras polyinsaturés qui sont les plus susceptibles au processus oxydatif. Et spécialement, les acides linoléique et arachidonique sont une cible de la peroxydation lipidique.

Cette méthode nous permet donc de voir la capacité des antioxydants présents dans le mélange réactionnel à stabiliser les hydroperoxydes lipidiques et par conséquent voir s'ils sont apte à prévenir l'oxydation lipidique. Comme ces hydroperoxydes peuvent s'attaquer à la β -carotène qui est une molécule importante physiologiquement, ils peuvent s'attaquer à d'autres composés comme les lipides (acides gras polyinsaturés), les protéines et même les acides nucléique **(Kubola et Siriamornpun, 2008 ; Sharififar et al., 2009)**.

La réaction en chaîne des radicaux libres est bien connue qu'elle est le mécanisme commun pour la peroxydation lipidique, de ce fait, la capacité des antioxydants à l'inhiber est due à leur propriétés de piègeurs de radicaux libres. Ceci caractérise aussi les produits alimentaires contenant des antioxydants qui par piégeage et neutralisation des radicaux libres maintiennent la bonne qualité du produit.

Les flavonoïdes sont connus qu'ils jouent un rôle important dans la stabilisation de la peroxydation lipidique.

La différence dans la solubilité des flavonoïdes dans le système micellaire eau-lipide de ce modèle influence les résultats obtenus par ce test, et la répartition des composés entre les deux phases peut influencer les résultats de l'oxydation. Ainsi, les antioxydants hydrophobes sont rapportés qu'ils sont plus efficace que les antioxydants hydrophiles dans ce test de décoloration du β -carotène et cela en s'orientant vers la phase lipidique et l'interface lipide-eau, combattant ainsi la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation de la β -carotène, et comme l'activité antioxydante obtenue est plus ou moins faible à celle du BHA, on peut conclure que celle-ci est due à cette différence de solubilité **(Miraliakbari et Shahidi, 2008 ; Sharififar et al., 2009)**.

Les résultats obtenus par ces quatre systèmes pour tester l'activité antioxydante à savoir : l'étude de la capacité du piégeage du radical DPPH, la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène, l'étude du pouvoir réducteur par la méthode de la réduction du fer (FRAP) et l'étude de la capacité à inhiber la peroxydation lipidique par la méthode de la décoloration du β -carotène, sont dues aux composés phénoliques, et plus particulièrement aux flavonoïdes, puisqu'on a utilisé un mélange de solvant spécifique à leurs extractions, et aussi parce que beaucoup d'auteurs confirment leur contribution à cette activité **Ding et al., 2008 ; Iacopini et al., 2008 ; Vasco et al., 2008 ; Alén_Ruiz et al., 2009 ; Borneo et al., 2009**.

Sachons que les flavonoïdes sont connus par leurs activités antiradicalaire et antioxydante et que les extraits des plantes contenant un mélange de ces composés ont donné des résultats plus

ou moins satisfaisantes, on peut conclure que les résultats ont prouvé que l'activité antioxydante de ces extraits dépend non seulement du contenu phénolique total mais que les composés phénoliques peuvent agir en synergie, antagonisme ou peuvent indépendamment affecter toute l'activité du mélange (**Iacopini et al., 2008**).

L'utilisation de divers systèmes expérimentaux a prouvé que les capacités antioxydante des flavonoïdes sont dues à leurs propriétés redox qui se traduisent dans les capacités de donner des électrons et des hydrogènes, en plus de leurs potentiels à chélater les ions métalliques pro-oxydantes et leurs capacités de protection des systèmes de défenses antioxydants (**Harborne et Williams, 2000 ; Atmani et al., 2009**).

Conclusion générale

Bien qu'une grande partie du XXème siècle ait été consacrée à la mise au point de composés antioxydants de synthèse, la recherche de nouveaux antioxydants naturels via le screening de sources végétales et surtout de plantes médicinales a résulté dans la découverte d'un grand nombre de ces composés utiles qui commencent à jouer un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines et aussi un rôle dans l'industrie alimentaire.

L'extraction des flavonoïdes a été mise au point par deux méthodes d'extraction l'une à chaud et l'autre à froid des différents organes des deux plantes qui après calcul du rendement en extrait sec et le dosage de leur contenu flavonoïdique a permis de conclure que l'extraction à chaud a donné de bons résultats qu'à froid, pour l'*A. unedo* les rendements pour les extraits des feuilles, des fleurs et des rameaux qui sont de l'ordre de 24,7 ; 18,7 et 11,8 % (p/p) respectivement pour l'extraction à chaud était supérieur que ceux de la macération à froid qui ont donné 22,1 ; 17,1 et 11,5 % (p/p) respectivement.

Ainsi la teneur des flavonoïdes pour l'*A.unedo* sont classés comme suite : rameaux > feuilles > fleurs ils sont de l'ordre de 222,02 ; 175,3 et 126,4 respectivement en mg EQC /g de matière végétale sèche pour l'extraction à chaud et pour la macération à froid : 147,7 ; 143,9 et 111,7 mg EQC /g de matière végétale sèche pour feuilles, rameaux et fleurs respectivement.

Pour le *D. gnidium* et en ce qui concerne l'extraction à chaud la teneur en flavonoïdes a été de l'ordre de 129,2 mg EQC /g de matière végétale sèche pour les tiges et 112,4 mg EQC /g de matière végétale sèche pour les feuilles. Et de même pour la macération à froid les tiges (100,9 mg EQC /g de matière végétale sèche) contiennent plus de flavonoïdes que les feuilles (99,99 mg EQC /g de matière végétale sèche).

Ainsi l'analyse qualitative des flavonoïdes des deux plantes par chromatographie sur couche mince nous a révélé la présence d'acides phénoliques dans les rameaux et les fleurs de l'*A.unedo* et une flavone pour le *D.gnidium* et ça pour un système et un autre nous a révélé la présence en plus d'acides phénoliques de flavonols et de flavan-3-ols pour le Daphné et seulement une flavonol pour l'Arbousier, et ça été confirmé par les spectres d'absorption en ultraviolet.

D'après cette analyse on a pu conclure que les fractions dans l'acétate d'éthyle contiennent plus de composés que les fractions dans le n-butanol.

Concernant l'activité antioxydante des fractions d'acétate d'éthyle été plus élevée que celle des fractions butanolique.

Le pouvoir réducteur des extraits des fleurs de l'*A.unedo* (D.O = $3,061 \pm 0,001$ pour EC ; $3,107 \pm 0,01$ pour MF) été plus élevé que celui (D.O égale à $2,580 \pm 0,051$) de l'acide ascorbique, il en est de même pour le piégeage du radical DPPH[•] (IC50 des fleurs = $0,002$ mg/ml pour EC et $0,0019$ mg/ml pour la MF, IC50 de l'acide ascorbique = $0,0030$ mg/ml).

Pour la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène, les extraits méthanoliques du Daphné par extraction à chaud (feuilles 66,14 % et tiges 68,11 %) ont montré une activité considérable par rapport au BHA (90, 65 %).

Les extraits bruts méthanoliques des deux plantes dans la méthode de décoloration du β -carotène, ont montré une activité inférieure à celle du BHA (89, 4 %), mais reste toutefois non négligeable. Pour le *D. gnidium* par extraction à chaud le pourcentage d'inhibition était de l'ordre de 17,5 % pour les feuilles et 25,9 % pour les tiges, de même pour l'*A. unedo* il est de 24,9% ; 18,7% ; 18,2 % pour les rameaux, les fleurs et les feuilles, respectivement.

Selon les résultats obtenus dans cette étude, il est indiqué clairement que les extraits de *D. gnidium* et l'*A. unedo* ont de bonnes activités antioxydante et capacité de piégeage des radicaux libres pour les différents systèmes antioxydants *in vitro*. Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique^s comme elle peut trouver aussi une application dans l'industrie alimentaire.

De plus, ces deux plantes médicinales peuvent être utilisées comme une source facilement accessible d'antioxydants naturels pour remplacer les antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ou dans les préparations médicamenteuses.

Les différents mécanismes antioxydants avec lesquels les extraits des deux plantes on réagit sont attribués à la propriété redox de leur flavonoïdes, qui joue un rôle important dans le piégeage, la capture et la destruction des radicaux libres et du peroxyde d'hydrogène.

Même si ces flavonoïdes apparaissent comme responsables de l'activité antioxydante pour les deux plantes, sauf qu'il n'est pas aussi clair de quel composé est dû cette activité. Par conséquence, il est suggéré qu'un travail postérieur doit permettre l'isolation et l'identification du contenu en antioxydants pour les deux plantes à savoir l'*A. unedo* et le *D. gnidium*. En outre, l'activité antioxydante *in vivo* avec ces différents mécanismes doit nécessairement être investie dans la perspective future de notre travail.

- Alén-Ruiz, F., García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, M.C., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines, *Food Chemistry* 113: 53–60, **2009**.
- Al-Fayez, M., Cai, H., Tunstall, R., Steward, W.P., Gescher, A.J., Differential modulation of cyclooxygenase-mediated prostaglandin production by the putative cancer chemopreventive flavonoids tricetin, apigenin and quercetin, *Cancer Chemother Pharmacol*, 58: 816–825, **2006**.
- Almajano, M.P., Carbó, R., López Jiménez, J. A., Gordon, M.H., Antioxidant and Antimicrobial activities of tea infusions, *Food Chemistry*, 108: 55–63, **2008**.
- Andersen, O.M., Markham, K.R., Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications, Published by *CRC Press Taylor & Francis Group*, p 2. **2006**.
- Ardestani, A., Yazdanparast, R., Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on *in vitro* protein glycoxidation, *Food and Chemical Toxicology*, 45 : 2402-2411, **2007**.
- Ardestani, A., Yazdanparast, R., Flavonoids as potential therapeutic agents for type 1 diabetes *Medical Hypotheses*. **2007**. Article in Press.
- Atmani, D., Chafer, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbach, N., Atmani, D., Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants, *Food Chemistry*, 112: 303- 309, **2009**.
- Atoui, A., Mansouri, A., Boskou, G., Kefalas, P. Tea and herbal infusions: Their antioxydant activity and phenolic profile, *Food Chemistry*, 89: 27-36, **2005**.
- Ayaz, F.A., Kucukislamoglu, M., Reunanen, M., Sugar, Non-volatile and Phenolic Acids Composition of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Fruits, *J. Food Composition and Analysis* 13 : 171-177. **2000**.
- Basile, A., Ferrara, L., Del Pezzo, M., Mele, G., Sorbo, S., Bassi, P., Montesano, D., Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart, *Journal of Ethnopharmacology* 102: 32–36. **2005**.
- Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R., Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, *J. Plant And Soil*, 203 : 27-36. **1998**.
- Benhammou, N., Etude des activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles et des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica* et *Inula viscosa* de la région de Tlemcen, Thèse de Magistère en Biologie Option: Produits Naturels, Activités biologiques et Synthèse, **2006**. p 117.
- Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Panovska, T.K., Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf., *Advances in Food Sciences*, 29 (3): 155-161, **2007**.

- Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Panovska, T.K., Antioxydant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts, *African Journal of Pharmacy*, 2 (2): 22-28, **2008**.
- Beniston, N.T., Beniston, W.S., Fleurs d'Algérie, *Entreprise National du livre*, **1984**.
- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., Golob, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey, *Food Chemistry*, 105: 822-828. **2007**.
- Borel, J.P., Maquart, F.X., Le Peuch, C., Randoux, A., Gillery, P., Bellon, G., Monboisse, J.C., Biochimie Dynamique, édition *De Boeck Université*, **1997**.
- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K., In "Flavonoids and other Polyphenols, Methods in Enzymology, Vol 335", (Parker, L., ed) p 166, *CRC press, Berkeley, California*, **2001**.
- Borneo, R., León, A.E., Aguirre, A., Ribotta, P., Cantero, J.J., Antioxidant capacity of medical plants from provence of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system, *Food Chemistry*, 112 : 664-670, **2009**.
- Boullard, B., Dictionnaire : Plantes et Champignons, Edition ESTEM, **1997**, p 55.
- Boullard, B., Plantes Médicinales du Monde; Réalités et Croyances, Edition ESTEM, **2001**. p50, 80
- Bruneton, J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3e édition, Edition *Lavoisier TEC et DOC*, **1999**.
- Chaaib-Kouri, F., Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae), Thèse de doctorat, Institut de Pharmacognosie et Phytochimie, Université de Genève, LAUSANNE, **2004**.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Science*, 74 : 2157–2184, **2004**.
- Castaldi, S., Carfora, A., Fiorentino, A., Natale, A., Messere, A., Miglietta, F., Cotrufo, M.F., Inhibition of net nitrification activity in a Mediterranean woodland: possible role of chemicals produced by *Arbutus unedo*, REGULAR ARTICLE, *Plant Soil*, DOI 10.1007/s11104-008-9750-x, **2008**.
- Cottiglia, F., Loyl, G., Garau, D. Floris, C., Casu, M., Pompei, R., Bonsignore, L., Antimicrobial Evaluation of Coumarins and Flavonoids from the Stems of *Daphne gnidium* L., *Phytomedicine*, Vol. 8(4): 302–305, **2001**.
- Curtay, J.P., Robin, J.M., Intérêt des Complexes Antioxydants, Centre d'Etude et de Développement de la Nutrithérapie. *Nutrithérapie Info*. Octobre **2000**.
- Da Silva Pinto, M., Maria Lajolo, F., Inés Genovese, M., Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.), *Food Chemistry*, 107: 1629–1635, **2008**.

- DeGraft-Johnson, J., Kolodziejczyk, K., Krol, M., Nowak, P., Krol, B., Nowak, D., Ferric-Reducing Ability Power of Selected Plant Polyphenols and their Metabolites: Implications for Clinical Studies on the Antioxidant Effects of Fruits and Vegetable Consumption, *Basic & Clinical pharmacology & Toxicology*, 100: 345-352, **2007**.
- Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Cottiglia, F., Bonsignore, L., Dessì, M.A., Chemical Composition and Antioxidant Activity of Extracts from *Daphne gnidium* L. *Journal of the American Oil Chemistry's Society*, 80 (1): 65-70, **2003**.
- Dib, M.A., Contribution a l'étude de l'activité antimicrobienne de quelques polyphénols présents dans *Arbutus unedo* L., Thèse de Doctorat, Tlemcen, **2008**. p 140.
- Ding, Z. T., Fang, Y. S., Tai, Z.G., Yang, M. H., Xu, Y. Q., Li, F., Cao, Q. E., Phenolic content and radical scavenging capacity of 31 species of ferns, Short report, *Fitoterapia* 79: 581–583, **2008**.
- Djazairi, A., كشف الرموز في بيان الأعشاب للشيخ عبد الرزاق ابن حمدوش الجزائري، مكتبة الرشاد - مطبعة دار الكتاب - الدار البيضاء **1963**
- Edeas, M., Les polyphénols et les polyphénols de thé, *Phytothérapie*, 5: 264–270, **2007**.
- El Haouari, M., López,J.J., Mekhfi,H., Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets, *J. Ethnopharmacology* 113 : 325-331, **2007**.
- Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Braga, F.G., Coimbra, E.S., Scio, E., *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects, *Bioresource Technology*, 100 : 428-433, **2009**.
- Favier, A., Le Stress Oxydant ; Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique : *Mécanismes biochimiques*, 108- 115, **2003**.
- Fiorentino, A., Castaldi, S., D'Abrosca, B., Natale, A., Carfora,A., Messere, A., Monaco,P., Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland, *Biochemical, Systematics and Ecology* 35 : 809-811, **2007**.
- Fontaine, E., « Production et Elimination des Radicaux Libres Oxygénés », Laboratoire de Bioénergétique fondamentale et appliquée, Université Joseph Fourier, Grenoble. . Unité de nutrition parentérale, département de médecine aiguë spécialisée. Mise à jour **1998**. Valable en line sur : <http://www.em-consulte.com/article>, Novembre 2008.
- Galati, E.M., Monforte, M.T., Kirjavainen, S., Forestieri, A.M., Trovato, A., Tripodo, M.M., Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid: anti-inflammatory and analgesic activity, *Farmaco*. 40 (11):709-12, **1994**.
- Gallego, J.G., Campos, S.S., Tuñón, M.J., Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids, *Nutrición Hospitalaria*, 22 (3): 287-93, **2007**.

- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D., Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *Mécanismes biochimiques*, 91-96, **2003**.
- Ghedira, K., Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169, **2005**.
- Guignard, J.L., Botanique : Systématique Moléculaire, édition Masson, **2001**.
- Girotti-chanu, C., Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *MICROTEA Debillis*. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé. **2006**, p 137.
- Halliwell, B., Are Polyphenols Antioxidants or Pro-oxidants ? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? Review, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 107–112, **2008**.
- Halliwell, B., Free Radicals and Antioxidants: a personal view. *Nutritional Review*, 52: 253-265, **1994**.
- Halliwell, B.B., Poulsen, H.E., Oxidative Stress In: "Cigarette Smoke and Oxidative Stress" (Halliwell, B.B. et Poulsen, H.E. eds.) p1, Edition *Springer*, **2006**.
- Hamlat L.N. Flavonoïdes et acides phenoliques de Pistacia lentiscus ; Thèse de Magister. Ecole normale supérieure Kouba, Alger, **2006**, p 153.
- Harborne, J. et Williams, C., Advances in Flavonoid Research since 1992, *Phytochemistry* 55: 481-504, **2000**.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584, **2002**.
- Hennebelle, T., Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants, Thèse de doctorat, Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille1, **2006**, p 304.
- Hininger-Favier, I., « Le Stress oxydant », Laboratoire de Biologie du stress Oxydant. Faculté de Pharmacie. Grenoble, Mise à Jour **2004**. Valable en line sur : <http://www2.ujf-grenoble.fr/pharmacie>. Novembre 2008.
- Hsiao, Y.C., Hsieh, Y.S., Kuo, W.H., Chiou, H.L., Yang, S.F., Chiang, W.L., Chu, S.C., The tumor-growth inhibitory activity of flavanone and 2'-OH flavanone *in vitro* and *in vivo* through induction of cell cycle arrest and suppression of cyclins and CDKs, *Journal of Biomedical Science* 14:107–119, **2007**.
- Hubert, J., Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, spécialité: Qualité et sécurité des aliments, **2006**, p 174.

- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L., Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 589– 598, **2008**.
- Iio, M., Moriyama, A., Matsumoto, Y., Takaki, N., Fukumoto, M., Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids, *Agric. Biol. Chem.*, 49 (7): 2173-2176, **1985**.
- Iserin, P., Encyclopédie des Plantes Médicinales; Identification, Préparation, Soins, Edition Larousse, **2001**. p 170.
- Judd, W.S, Campbell, C.S., Kellogg, E.A, Stevens, P., Botanique systématique : une perspective phylogénétique, Editions *DeBæck Université*, **2002**.
- Karağozler. A., Erdag. B., Çalmaz Emek. Y., Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, *Food Chemistry*, 111: 400-407, **2008**.
- Kubola, J., Siriamornpun, S., Phenolic contents and antioxydant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*, *Food chemistry*, 110: 881-890, **2008**.
- Lagnika, L., Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises, thèse de Docteur de l'Université Louis Pasteur Strasbourg, **2005**, p 248.
- Laguerre, M., López-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P., Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante, *Fondamental, OCL*, 14 (5) : 278-292, **2007**.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre J.P., Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique, *Pathologie Biologie* 52 : 314– 322, **2004**.
- Lhuillier, A., Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* hook.f ex oliver, *agauria polyphylla* Baker (*ericaceae*), *tambourissa trichophylla* Baker (*monimiaceae*) et *embelia concinna* Baker (*myrsinaceae*). Docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse, spécialité : sciences des Agroressources, **2007**, p 214.
- Li, H. Y., Hao, Z. B., Wanga, X. L., Huang, L., Li, J. P., Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance, *Bioresource Technology* 100 : 970– 974, **2009**.
- Liu, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H., Zeng, X., Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng, *Food Chemistry*, 112 : 35-41, **2009**.
- Maisuthisakul, P., Suttajit, M., Pongsawatmmit, R., Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants, *Food Chemistry*, 100: 1409- 1418, **2007**.
- Majhenić, L., Skerget, M., Knez, Z., Antioxydant and antimicrobial activity of guarana seed extracts, *Food Chemistry*, 104: 1258-1268, **2007**.

- Males, Z., Medic-Saric, M., Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. Kit. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24 : 353–359, **2001**.
- Maleš, Z., Plazibat, M., Vundac, V.B., Žuntar, I., Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree –*Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*), *Acta pharm.* 56 : 245-250, **2006**.
- Malgalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J., Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta*, 613 : 1-19, **2008**.
- Marfak, A., Radiolyse Gamma des Flavonoides. Etude de Leur Reactivite avec les Radicaux issus des Alcools : Formation de Depsides. Docteur de l'universite de limoges Spécialité : Biophysique, Université de Limoges, Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé, Faculté de Pharmacie, **2003**. p220.
- Markham, K.R., Techniques of Flavonoid Identification. *Biological techniques series*, **1982**.
- Marxen, K., Vanselow, K.H., Lippemeir, S., Hintze, R., Ruser, A., Hansen, U.P., Determination of DPPH Radical Oxidation caused by Methanolic Extracts of some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements, *Sensors* 7: 2080 – 2095, **2007**.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mohamed Mustapha, N., Muhammad, K., Ming, C.H., Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo, *J Appl Phycol*, 20:367–373, **2008**.
- Mekhfi, H., El Haouari, M., Legssyer, A., Bnouham, M., Aziz, M., Atmani, F., Remmal, A., Ziyat, A., Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants, *J. Ethnopharmacology* 94 : 317-322, **2004**.
- Milane, H., La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur. Domaine : Pharmacochimie, **2004**, p 268.
- Miraliakbari, H., Shahidi, F., Antioxidant activity of minor components of tree nut oils, *Food Chemistry* 111: 421–427, **2008**.
- Mohammedi, Z., Etude du pouvoir Antimicrobien et Antioxydant des Huiles Essentielles et Flavonoïdes de quelques Plantes de la région de Tlemcen, Thèse de Magistère en Biologie Option: Produits Naturels, Activités biologiques et Synthèse, **2006**, p 140.
- Morris, R., Plante for a future, Edible, Medicinal and Useful plants for Healthier World valable online sur : <http://www.pfaf.org/database/plants>, Mise à Jours : **2007**.
- Nève, J., Optimisation of dietary intake of antioxidants, Nutrition clinique et métabolisme, *Nutrition clinique et métabolisme* 16 : 292-300, **2002**.
- Nowik, W., HPLC-PDA characterisation of *Daphne gnidium* L. (*Thymeleaceae*) dyeing extracts using two different C-18 stationary phases, *J. Sep. Sci.* 28 : 1595-1600, **2005**.

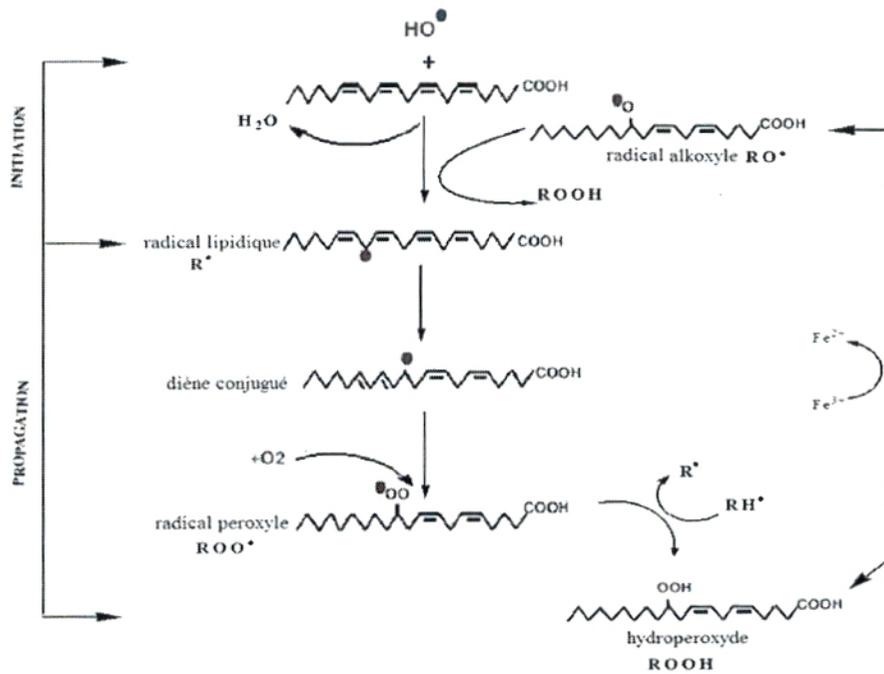
- Onyilagha, J., Bala, A., Hallet, R., Gruber, M., Soroka, J., Westcott, N., Leaf flavonoids of the cruciferous species, *Camelina sativa*, *Crambe* spp., *Thlaspi arvense* and several other genera of the family Brassicaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31: 1309-1322, **2003**.
- Özcan, M.M., Haciseferoğullari, H., The strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents, *J. Food Engineering* 78 : 1022-1028, **2007**.
- Özkan, G., Kuleaoan, H., Çelik, S., Göktürk, R.S., Ünal, O., Screening of Turkish endemic *Teucrium montbretii* subsp. *pamphylicum* extracts for antioxidant and antibacterial activities, *Food Control*, 18: 509–512, **2007**.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N., Antioxidant activity of *Smilax excels* L. leaf extracts, *Food Chemistry*, 110, 571-583, **2008**.
- Pabuçcuoğlu, A., Kivçak, B., Baş, M., Mert, T., Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves, *Fitoterapia* 74: 597-599, **2003**.
- 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. *J. Food Composition and Analysis*, **2008**. In press.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., Huang, F., Antioxydant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel, *Food Chemistry*, 106: 1264-1270, **2008**.
- Parker, L., Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxydants, p3. Part B, Volume 300, Edition *Academic Press*, University of California, Berkeley, California, **1999**.
- Pereira, R.M.S., Andrades, N.E.D., Paulino, N., Sawaya, A.C. H. F., Eberlin, M.N., Marcucci, M.C., Favero, G.M., Novak, E.M., Bydlowski, S.P., Synthesis and Characterization of a Metal Complex Containing Naringin and Cu, and its Antioxidant, Antimicrobial, Anti-inflammatory and Tumor Cell Cytotoxicity, *Molecules*, 12: 1352-1366, **2007**.
- Peri, C., Pompei, C., Estimation of different phenolic groups in vegetable extracts, short communication, *Phytochemistry* 10 : 2187-2189, **1971**.
- Quezel, P., Santa, S., Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, TOME II, *Centre National de la recherche scientifique*, France, Paris, **1963**.
- Ranarivelo, Y., Les grandes Familles Chimiques de Produits Naturels, Cours de discipline universitaire à distance, Chapitre : les flavonoïdes, Extraction - Isolement –Purification, <http://www.refer.mg/cours/yr/pages/m32.html>, Mise à jours: 26/01/2004. Université d'Antananarivo Madagascar, Septembre 2007.
- Rapisarda, A., Germanò, M. P., Iauk, L., La Rosa, M., Sanogo, R., Ragusa, S., *Daphne gnidium* L. Bark and Leaf Extracts: Skin Damage by Topical Application, *Phytotherapy Research*, 12: 49–51, **1998**.

- Read, M.A., Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. *The American Journal of Pathology*, 147(2) : 235-7, **1995**.
- Rice-Evans, C.A., Miller, J., Paganga, G., Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic acids, Review Article, *Free Radical Biology & Medicine*, 20(7), 933-956, **1996**.
- Rijke, E., Out, P., Niessen, W., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. Analytical separation and detection methods for flavonoids (Review), *Journal of Chromatography A*. 1112: 31-63, **2006**.
- Rodríguez-Pérez, J., Traveset, A., A multi-scale approach in the study of plant regeneration: Finding bottlenecks is not enough. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 9 : 1–13, **2007**.
- Scherer, R., Godoy, H.T., Antioxydant Activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food Chemistry*, 112 : 654-658, **2009**.
- Shaghghi, M., Manzoori, J.L., Jouyban, A., Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method, *Food Chemistry*, 108: 695–701, **2008**.
- Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M., Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L., *Food Chemistry*, 112: 885-888, **2009**.
- Shon, M., Lee, J., Choi, J., Choi, S., Nam, S., Seo, K., Lee, S., Sung, N., Park, S., Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *chungkukjang* , *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 113-118, **2007**.
- Soares, A.F., Effet du Stress Oxydant sur le Fonctionnement des Adipocytes : Adiponectines et Prostaglandine, Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé, **2005**, p 133.
- Souchard, J.P., Arnal, J.F., Rochette, L., Les radicaux Libres et le Stress Oxydatif Radicalaire. Techniques permettant la mise en évidence d'un stress oxydatif en biologie, In : "Biologie et Pathologie du Cœur et des Vaisseaux" (Pinet, F., *et al.*, eds) p245, *Médecine- Science Flammarion*, **2002**.
- Su, M.S., Shyu, Y.T., Chien, P.J., Antioxidant activities of citrus herbal product extracts, *Food Chemistry*, 111; 892-896, **2008**.
- Suhaj, M., Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: (6-7), 531-537.**2006**.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibech, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., Antioxydant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species, *Food Chemistry*, 104: 1372- 1378, **2007**.

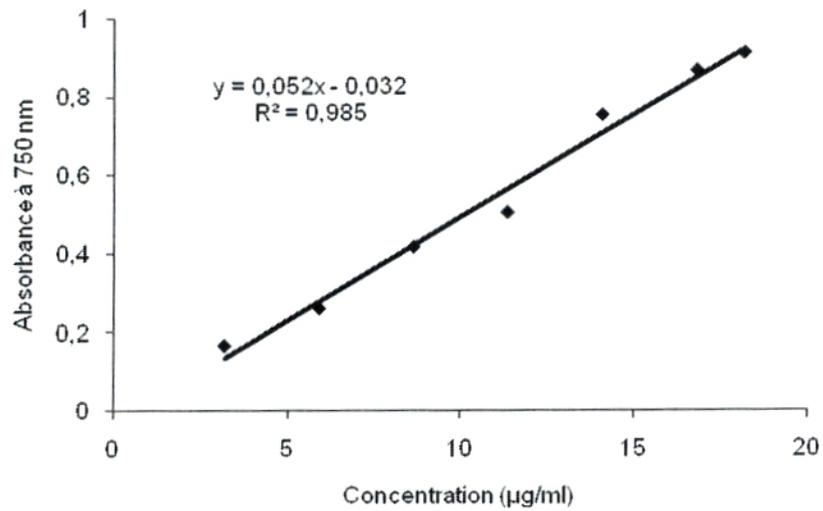
- Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y., Luo, Y., Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities, *Food Chemistry*, 113: 173-179, **2009**.
- Van acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van Der Vijgh, W.J.F., and Bast, A., Structural Aspect of Antioxidant Activity of Flavonoids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (3) : 331-342, **1996**.
- Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Eldin, A., Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador, *Food Chemistry* 111: 816–823, **2008**.
- Vermerris, W., Nicholson, R., Isolation and Identification of Phenolic Compounds, *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, florida USA, 151-196, **2006**.
- www.tous-les-fruits.com, mise à jour **2007**, visité en Février 2008.
- www.bioeco.free.fr, mise à jour **2005**, visité en décembre 2007.
- www.crdp2.ac.besancon.fr, mise à jour **2004**, visité en Février 2008.
- www.plantyfolia.fr, mise à jour **2006**, visité en décembre 2007.
- www.topwalks.net, mise à jour **2006**, visité en décembre 2007.

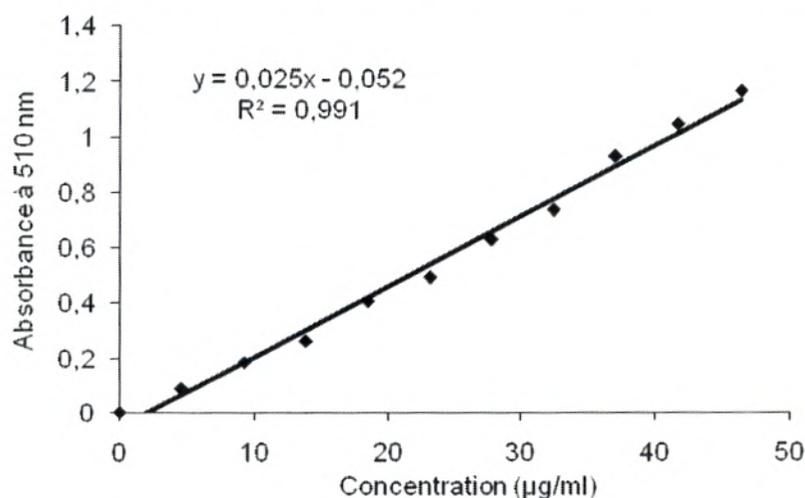
Annexe

Annexe1 : Mécanisme de la Peroxydation Lipidique



Annexe2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols



Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes**Annexe 4** : Valeurs du piégeage du radical DPPH. Exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de l'*Arbutus unedo* L. en fonction des concentrations (g/ml)

Concentration en g/L	0,092	0,074	0,055	0,037	0,027	0,018	0,013	0,004
Extraits								
D.O	0,797	0,674	0,501	0,357	0,295	0,222	0,161	0,098
AU/L/AcOEt/EC	$\approx 0,010$	$\approx 0,002$	$\approx 0,010$	$\approx 0,015$	$\approx 0,007$	$\approx 0,002$	$\approx 0,000$	$\approx 0,003$

Concentration en g/L	0,323	0,215	0,107	0,075	0,032	0,010		
Extraits								
D.O	0,307	0,556	0,799	0,885	0,991	1,029		
AU/L/BuOH/EC	$\approx 0,021$	$\approx 0,042$	$\approx 0,053$	$\approx 0,004$	$\approx 0,001$	$\approx 0,011$		

Concentration en g/L	1,94	1,62	1,21	0,81	0,60			
Extraits								
D.O	0,055	0,21	0,37	0,45	0,51			
AU/L/AcOEt/MF	$\approx 0,002$	$\approx 0,001$	$\approx 0,033$	$\approx 0,026$	$\approx 0,00$			

Concentration en g/L	1,37	0,91	0,45	0,32	0,13	0,022		
Extraits								
D.O	0,082	0,272	0,665	0,736	0,94	1,03		
AU/L/BuOH/MF	$\approx 0,002$	$\approx 0,021$	$\approx 0,026$	$\approx 0,027$	$\approx 0,009$	$\approx 0,009$		

Concentration en g/L	0,165	0,143	0,114	0,100	0,071			
Extraits								
D.O	0,065	0,098	0,182	0,260	0,417			
AU/F/AcOEt/EC	$\approx 0,001$	$\approx 0,005$	$\approx 0,000$	$\approx 0,007$	$\approx 0,012$			

Concentration en g/L	0,32	0,20	0,16	0,10	0,05	0,02	0,008	
Extraits								
D.O	0,148	0,325	0,466	0,580	0,684	0,738	0,760	
AU/F/BuOH/EC	$\approx 0,034$	$\approx 0,008$	$\approx 0,004$	$\approx 0,018$	$\approx 0,004$	$\approx 0,004$	$\approx 0,005$	

Concentration en g/L	13,82	8,29	5,52	2,76	1,38			
Extraits								
D.O	0,055	0,064	0,188	0,408	0,499			
AU/F/AcOEt/MF	=0,003	=0,001	=0,007	=0,004	=0,002			

Concentration en g/L	0,18	0,15	0,12	0,09	0,06	0,03		
Extraits								
D.O	0,047	0,105	0,165	0,371	0,475	0,609		
AU/F/BuOH/MF	=0,004	=0,001	=0,002	=0,055	=0,000	=0,01		

Concentration en g/L	0,32	0,24	0,16	0,13	0,08			
Extraits								
D.O	0,09	0,19	0,31	0,34	0,49			
AU/R/AcOEt/EC	=0,004	=0,042	=0,00	=0,006	=0,011			

Concentration en g/L	0,73	0,63	0,55	0,49	0,44	0,29	0,17	0,11
Extraits								
D.O	0,14	0,18	0,24	0,35	0,37	0,43	0,53	0,61
AU/R/BuOH/EC	=0,037	=0,024	=0,002	=0,016	=0,024	=0,008	=0,016	=0,003

Concentration en g/L	0,45	0,37	0,30	0,22	0,15	0,07		
Extraits								
D.O	0,05	0,14	0,22	0,30	0,39	0,46		
AU/R/AcOEt/MF	=0,000	=0,002	=0,009	=0,000	=0,004	=0,003		

Concentration en g/L	3,39	2,95	2,63	2,12	1,55	0,94	0,59	
Extraits								
D.O	0,17	0,23	0,26	0,36	0,53	0,61	0,64	
AU/R/BuOH/MF	=0,002	=0,021	=0,004	=0,000	=0,003	=0,009	=0,007	

Annexe 5 : Valeurs du piégeage du radical DPPH. Exprimées en densités optiques (D.O) par les extraits du *Daphne gnidium* L. en fonction des concentrations (g/ml)

Concentration en g/L	1,29	0,96	0,64	0,48	0,32		
Extraits							
D.O	0,058	0,133	0,283	0,328	0,444		
DG/L/AcOEt/EC	=0,006	=0,020	=0,026	=0,001	=0,009		
Concentration en g/L	19,83	16,53	13,22	9,91	6,61	4,95	1,65
Extraits							
D.O	0,312	0,342	0,431	0,485	0,529	0,591	0,639
DG/L/BuOH/EC	=0,015	=0,016	=0,026	=0,013	=0,048	=0,006	=0,0360
Concentration en g/L	1,84	1,34	1,17	0,84	0,67	0,33	0,16
Extraits							
D.O	0,103	0,193	0,248	0,364	0,400	0,507	0,546
DG/L/AcOEt/MF	=0,007	=0,009	=0,002	=0,009	=0,009	=0,002	=0,008
Concentration en g/L	36,23	18,11	14,49	9,66	6,03		
Extraits							
D.O	0,179	0,386	0,453	0,562	0,594		
DG/L/BuOH/MF	=0,004	=0,018	=0,027	=0,000	=0,000		
Concentration en g/L	27,02	22,51	18,01	13,51	9,00	4,50	
Extraits							
D.O	0,155	0,248	0,341	0,416	0,494	0,607	
DG/T/AcOEt/EC	=0,017	=0,014	=0,002	=0,001	=0,004	=0,003	
Concentration en g/L	6,62	4,41	3,31	2,20	1,65	1,10	
Extraits							
D.O	0,038	0,097	0,188	0,299	0,371	0,428	
DG/T/BuOH/EC	=0,000	=0,002	=0,003	=0,016	=0,016	=0,009	
Concentration en g/L	0,42	0,28	0,16	0,11	0,05	0,02	
Extraits							
D.O	0,146	0,285	0,446	0,524	0,594	0,633	
DG/T/AcOEt/MF	=0,051	=0,019	=0,019	=0,024	=0,001	=0,000	
Concentration en g/L	7,58	5,05	3,79	2,52	1,26		
Extraits							
D.O	0,063	0,197	0,287	0,409	0,518		
DG/T/BuOH/MF	=0,008	=0,002	=0,034	=0,012	=0,015		

Annexe 6 : Valeurs du pouvoir réducteur exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de l'*Arbutus unedo* L. pour les différentes concentrations étudiées.

Concentrations	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,75 mg/ml
AU/L/AcOEt/EC	1,450 ±0,016	1,889 ±0,008	2,433 ±0,090
AU/L/BuOH/EC	0,969 ±0,068	1,717 ±0,018	2,053 ±0,070
AU/L/AcOEt/MF	0,682 ±0,017	1,490 ±0,003	1,903 ±0,009
AU/L/BuOH/MF	0,421 ±0,027	0,848 ±0,039	1,753 ±0,009
AU/F/AcOEt/EC	0,950 ±0,017	2,196 ±0,003	3,061 ±0,001
AU/F/BuOH/EC	0,518 ±0,007	1,033 ±0,019	1,949 ±0,009
AU/F/AcOEt/MF	1,094 ±0,017	2,576 ±0,098	3,107 ±0,010
AU/F/BuOH/MF	1,354 ±0,017	2,205 ±0,094	2,355 ±0,017
AU/R/AcOEt/EC	0,215 ±0,012	0,457 ±0,098	1,143 ±0,003
AU/R/BuOH/EC	0,251 ±0,006	0,255 ±0,002	0,3165 ±0,007
AU/R/AcOEt/MF	1,038 ±0,050	2,022 ±0,068	2,983 ±0,007
AU/R/BuOH/MF	0,536 ±0,015	0,952 ±0,064	2,142 ±0,003
Acide ascorbique	0,888 ±0,071	1,905 ±0,004	2,580 ±0,051

Annexe 7 : Valeurs du pouvoir réducteur exprimées en densités optique (D.O) par les extraits du *Daphne gnidium* L. pour les différentes concentrations étudiées.

D.O des extraits	0,1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,75 mg/ml
DG/L/AcOEt/EC	0,193 ±0,016	0,334 ±0,036	0,758 ±0,010
DG/L/BuOH/EC	0,003 ±0,006	0,004 ±0,009	0,012 ±0,009
DG/L/AcOEt/MF	0,256 ±0,017	0,485 ±0,033	1,107 ±0,010
DG/L/BuOH/MF	0,014 ±0,027	0,037 ±0,019	0,163 ±0,070
DG/T/AcOEt/EC	0,293 ±0,017	0,570 ±0,098	1,389 ±0,003
DG/T/BuOH/EC	0,037 ±0,070	0,059 ±0,094	0,189 ±0,007
DG/T/AcOEt/MF	0,238 ±0,017	0,479 ±0,098	1,036 ±0,007
DG/T/BuOH/MF	0,055 ±0,017	0,071 ±0,020	0,169 ±0,003

Annexe 8 : Valeurs de l'activité antioxydante de la décoloration de la β -carotène exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de l'*Arbutus unedo* L.

Temps (minutes)	BHA	Contrôle	DG/L/EC	DG/L/MF	DG/T/EC	DG/T/MF
0	0,223	0,196	0,216	0,192	0,180	0,181
10	0,222	0,136	0,190	0,133	0,160	0,153
20	0,220	0,110	0,163	0,113	0,140	0,135
30	0,217	0,092	0,143	0,093	0,128	0,125
40	0,214	0,081	0,120	0,076	0,111	0,116
50	0,213	0,073	0,100	0,070	0,103	0,109
60	0,212	0,068	0,089	0,059	0,096	0,101

Annexe 9 : Valeurs de l'activité antioxydante de la décoloration de la β -carotène exprimées en densités optique (D.O) par les extraits du *Daphne gnidium* L.

Temps (minutes)	BHA	Contrôle	AU/L/EC	AU/L/MF	AU/F/EC	AU/F/MF	AU/R/EC	AU/R/MF
0	0,223	0,196	0,193	0,189	0,214	0,226	0,190	0,179
10	0,222	0,136	0,160	0,142	0,172	0,185	0,178	0,126
20	0,220	0,110	0,134	0,117	0,148	0,156	0,159	0,101
30	0,217	0,092	0,124	0,114	0,130	0,131	0,141	0,092
40	0,214	0,081	0,112	0,107	0,112	0,117	0,123	0,081
50	0,213	0,073	0,106	0,100	0,102	0,110	0,112	0,085
60	0,212	0,068	0,105	0,098	0,092	0,098	0,109	0,080

المخلص

الدراسات حول البحث عن مضادات الأكسدة الطبيعية، الدراسة الحالية تهدف إلى تقييم النشاط المضاد للأكسدة للفلافونويدات المستخلصة من نباتين من منطقة تلمسان: *Arbutus unedo* L. (البنج) و *Daphne gnidium* L. (أزاز).
لص الفلافونويدات بواسطة طريقتين: الإستخلاص بالحرارة و النقع لمختلف أعضاء النباتين. بعد حساب المرود للمستخلص الخام و التحليل لمحتواهما تمكنا من الإستنتاج أن الإستخلاص بالحرارة يعطي المرودية الأفضل.
لإستخلاص بالحرارة محتوى فلافوني مقدّر ب 129,2 مغ معادل الكاتشين/غ بالنسبة لسيقان *D. gnidium* و 112,4 مغ معادل الكاتشين/غ لأوراقه. فيما يخص *A. unedo* يمكن ترتيب المحتوى الفلافوني لمختلف أعضاء النبتة كالتالي: الأغصان < الأوراق < الأزهار (222,02 ; 175,3 و 175,3 مغ معادل الكاتشين/غ على الترتيب).
توغرافيا على الطبقة الرقيقة تم الكشف عن وجود حمض غاليك، حمض باراكوماريك و البيروكاتيكول في أغصان *A. unedo*، حمض باراكوماريك، و جزيئة الروتين في الأزهار و الأوراق. كما تم الكشف عن حمض غاليك، البيروكاتيكول و الكاتشين في سيقان *D. gnidium* و جزيئة الروتين في الأغصان. وقد تم تأكيد هذه النتائج بواسطة إمتصاص الطيف في المجال ما فوق البنفسجي.
س النشاط المضاد للأكسدة للنباتين، القدرة الإرجاعية لمستخلصات أزهار *A. unedo* كانت معتبرة مقارنة مع حمض الأسكوربيك، و كذا بالنسبة لتثبيط DPPH. كما بينت دراسة القدرة على تثبيط ثاني أكسيد الهيدروجين أن مستخلص الكحول المتيلي لمختلف أعضاء نبتة *D. gnidium* أظهر نتائج معتبرة مع جزيئة البوتيل هيدروكسي أنيزول (BHA)، في حين أن مستخلصات الكحول المتيلي للنباتين أظهرت نتائج ضعيفة بالمقارنة مع جزيئة BHA نزع اللون للبيتا كاروتين.
المفتاحية: *Arbutus unedo* L., *Daphne gnidium* L., النشاط المضاد للأكسدة، الفلافونويدات.

Résumé

Dans le cadre des études portant sur la recherche d'antioxydants naturels, la présente étude a été effectuée sur deux plantes médicinales de la région de Tlemcen : *Arbutus unedo* L. (Lenj) et *Daphne gnidium* L. (Azaz) et cela dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de leurs flavonoïdes.

L'extraction des flavonoïdes a été effectuée par deux méthodes : l'extraction à chaud et la macération à froid des différents organes des deux plantes, qui après calcul du rendement en extrait sec et le dosage de leur contenu flavonoïdique, a permis de conclure que l'extraction à chaud a donné de meilleurs résultats par rapport à la macération à froid.

Pour le *D. gnidium* et en ce qui concerne l'extraction à chaud la teneur en flavonoïdes a été de l'ordre de 129,2 mg EQC/g de matière végétale sèche pour les tiges et 112,4 mg EQC/g pour les feuilles. Pour l'*A. unedo*, les teneurs en flavonoïdes sont classées comme suit : rameaux > feuilles > fleurs et qui sont de l'ordre de 222,02 ; 175,3 et 126,4 mg EQC/g respectivement.

Ainsi, l'analyse qualitative des flavonoïdes des deux plantes par chromatographie sur couche mince nous a révélé la présence de l'acide gallique, l'acide *para*-coumarique et le pyrocatechol dans les rameaux de l'*A.unedo* L., l'acide *para*-coumarique, la quercétine et la rutine dans les fleurs et les feuilles. Pour le *D. gnidium* L. on a pu identifier la présence de l'acide gallique, du pyrocatechol et de la catéchine dans les tiges et la rutine pour les feuilles, ceci a été confirmé par les spectres d'absorption en ultraviolet.

Concernant l'activité antioxydante des parties des deux plantes étudiées, le pouvoir réducteur des extraits des fleurs de l'*A.unedo* été plus élevé que celui de l'acide ascorbique, il en est de même pour le piégeage du radical DPPH.

Pour la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène, les extraits bruts méthanoliques du Daphné ont montré une activité considérable par rapport au BHA (butylhydroxyanisole).

Les extraits bruts méthanoliques des deux plantes dans la méthode de décoloration du β -carotène, ont montré une activité inférieure à celle du BHA, mais toutefois non négligeable.

Mots clés : *Arbutus unedo* L., *Daphne gnidium* L., activité antioxydante, flavonoïdes.

Abstract

In the framework of the studies relating to the search for natural antioxidants, the present study was undertaken on two medicinal plants of the area of Tlemcen : *Arbutus unedo* L. and *Daphne gnidium* L. and this with the aim of evaluating the antioxidant activity of their flavonoids.

The flavonoids extraction was carried out by two methods: the hot extraction and the extraction in cold of the different organs of the two plants, which after calculation of yield in dry extract and the proportioning of their flavonic content made it possible to conclude that the hot extraction are giving best results.

For the hot extraction of *D. gnidium*, flavonoids contents were in stems 129.2 mg EQC/g dry weight plant extract and 112.4 mg EQC/g in leaves. For *A. unedo*, flavonoids contents were in the following order: branches > leaves > flowers (222.02, 175.3 and 126.4 mg EQC/g respectively).

Thus, the qualitative analysis of the flavonoids of the two plants by thin layer chromatography exposed us the presence of gallic acid, *para*-coumaric acid and pyrocatechol in branches of *A. unedo* and *para*-coumaric acid, quercetin and rutine in flowers and leaves. In *D. gnidium*, we were able to identify gallic acid, pyrocatechol and catechin in stems and leaves, this is was confirmed by the ultraviolet spectra.

Concerning the antioxidant activity of the different parts of both plants, the reducing power of the flowers extract of *A.unedo* is highest then for ascorbic acid, the same thing for the scavenging activity the free radical DPPH.

For the hydrogen peroxide scavenging activity, the methanolic crud extracts of *D. gnidium* showed important activity compared to the BHA (butylhydroxyanisole).

The methanolic crud extracts of the two plants in the β -carotene bleaching method showed low activity compared to BHA but however it was not void.

Key words: *Arbutus unedo* L., *Daphne gnidium* L., antioxidant activity, flavonoids.