



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira de Bejaia
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie Physico-Chimique

Mémoire de fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Pharmacologie Moléculaire

Thème

**Etude de l'activité antioxydante des Extraits des
feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* (Néflier du Japon).**

Présenté Par :

M^{elle} : NAIT MOULOUD Yamina

M^{elle} : IKKEN Kamilia

Membres du Jury :

Présidente : M^{me} Benmassaoud Y.

Promotrice: M^{elle} Adrar S.

Examinatrices: M^{me} Alioui- Zemouri S.

M^{me} Bennai Y.

Garde et lieu :

M.A.A(UAMB)

M.A.B (UAMB)

M.A.B (UAMB)

M.A.B (UAMB)

2013-2014

*R*emerciements

Avant tout, nous remercions dieu le tout-puissant, de nous avoir donné la force et la patience de pouvoir mener ce modeste travail.

*Au terme de la réalisation de ce mémoire, nous tenons particulièrement à présenter nos remerciements les plus sincères à notre promotrice **M^{elle} ADRAR** pour avoir dirigé ce travail, pour ses précieux conseils, son orientation, ses encouragements, sa disponibilité, son aide et sa patience avec nous.*

*Nos remerciements vont également à **M^{me} Benmassaoud** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Nous remercions également **M^{me} Bennai** et **M^{me} Zemmouri** d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

*Nous remercions profondément **M^r Naït mouloud M.** et **M^r Yalioua A.** pour leur aide.*

En fin nous tenons à remercier tous nos ami(e)s et collègues pour leurs soutiens tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

Yamina et Kamilia.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mon père et ma mère.

Mon oncle Brahim et sa famille

Mon frère (Djimi), mes sœurs (Djidji, Nacima et Katia) et ma petite

Princesse Alicia

Mes beaux frères (Louanas et Hacem)

A mes grands parents

A ma meilleure amie Zouzou

A tout mes amies. Merci pour votre fidélité et votre joie de vivre.

*A toi Kamilia ma chère binôme, merci pour
tout les moments qu'on a passé ensemble.*

Yamina, N

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mon père et ma mère sans qui, ce travail ne serait pas réalisé

Pour vous qui m'avez tant aimé.

Mon frère (Fatah) et ma sœur (Cylia)

A mon cher Fiancé Arab et sa famille

A mes meilleurs amie Zouzou et Katia.

A tout mes amies. Merci pour votre fidélité et votre joie de vivre.

*A toi Yamina ma chère binôme, merci
pour tout les moments qu'on a passé ensemble.*

Kamilia.I

Sommaire

liste des figures

liste des tableaux

Introduction	01
Synthèse Bibliographique	02
Chapitre I : Généralité sur <i>Eriobotryajaponica L</i>	02
I-1- Généralité sur les Rosacées.....	02
I-2-Description botanique d' <i>Eriobotryajaponica</i>	03
I-2-1-Caractéristique des différentes parties de la plante.....	04
I-2-2-Systématique d' <i>Eriobotryajaponica L</i>	05
I-2-3-Nom vernaculaire de l'espèce.....	05
I-3-Distribution générale d' <i>Eriobotryajaponica L</i>	05
I-4-Composition biochimique d' <i>Eriobotryajaponica L</i>	06
I-5-Usage thérapeutique de la plante.....	09
I-6- Activités biologiques d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	09
Chapitre II : Radicaux libres et Antioxydants	11
II-1-Les radicaux libres (RL).....	11
II-1-1-Définition.....	11
II-1-2-Les radicaux libres en biologie.....	11
II-1-3-Génération des espèces réactives de l'oxygénée (ERO) et du nitrogène (ERN).....	12
II-1-4-Stress oxydant.....	13
II-1-5-Conséquence du stress oxydant.....	14
II-1-6-Pathologies liée au stress oxydant.....	17
II-2-Les antioxydants.....	18
II-2-1-Définition des antioxydants.....	18
II-2-2-Les différents types d'antioxydants.....	18
II-2-2-1-Les antioxydants enzymatiques.....	19
II-2-2-2-Les antioxydants non enzymatiques.....	20
II-3-Les composés phénoliques.....	23
II-3-1-Définition des composés phénoliques.....	23
II-3-2-Biosynthèse des polyphénols.....	24
II-3-3Classification des composés phénoliques.....	24

II-3-4-Activités biologiques des composés phénoliques.....	28
II-3-5-Mécanisme d'action des composés phénoliques.....	29

Partie expérimentale

I-Matériel et méthodes	31
I-1-Préparation du matériel végétal.....	31
I-2- Extraction des composés phénoliques.....	32
I-3-Dosage des différents groupes de composés phénoliques.....	33
I-3-1- Dosage des phénols totaux.....	33
I-3-2- Dosage des flavonoïdes.....	35
I-3-3-Dosage des tannins (proanthocyanidines).....	36
I-4- Activité antioxydante des extraits.....	37
I-4-1- Activité « scavenging » du radical DPPH [•]	37
I-4-2- Le pouvoir réducteur.....	38
I-4-3- Evaluation de l'activité anti-radicalaire par le test de réduction du radical-cation ABTS ^{•+}	40
I-5- Analyse statistique.....	41
II-Résultats et discussion	
II-1-Rendement de l'extraction.....	42
II-2-Dosage des composés phénoliques.....	43
II-2-1-Dosage des phénols totaux.....	43
II-2-2- Dosage des flavonoïdes.....	45
II-2-3- Dosage des proanthocyanidines.....	46
II-3-Activité antioxydantes d' <i>Eriobotryajaponica L.</i>	48
II-3-1-Activité scavenging du radical DPPH [•]	48
II-3-2-Le pouvoir réducteur.....	50
II-3-3-Activité scavenging du radical ABTS ^{•+}	52
Conclusion et perspective	55
Références bibliographique	57
Annexe	71

Liste des abréviations

ABTS : acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique

ADN : Acide désoxyribonucléique

BHA : Butylated hydroxyanisole

Ca²⁺ : Calcium ionique

DPPH : 1,1-Diphényl-2-Picryl-Hydrazyl

ERN : Espèce Réactive de Nitrogène

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène

Fe²⁺ : Fer ferreux

Fe³⁺ : Fer ferrique

FeCl₃ : chlorure ferrique

GPx : Glutathion peroxyde

GSH : Glutathion

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogenase

NOS : Nitric Oxide Synthases

RL : Radical Libre.

SOD : Superoxyde-dismutase

XO : Xanthine Oxydase.

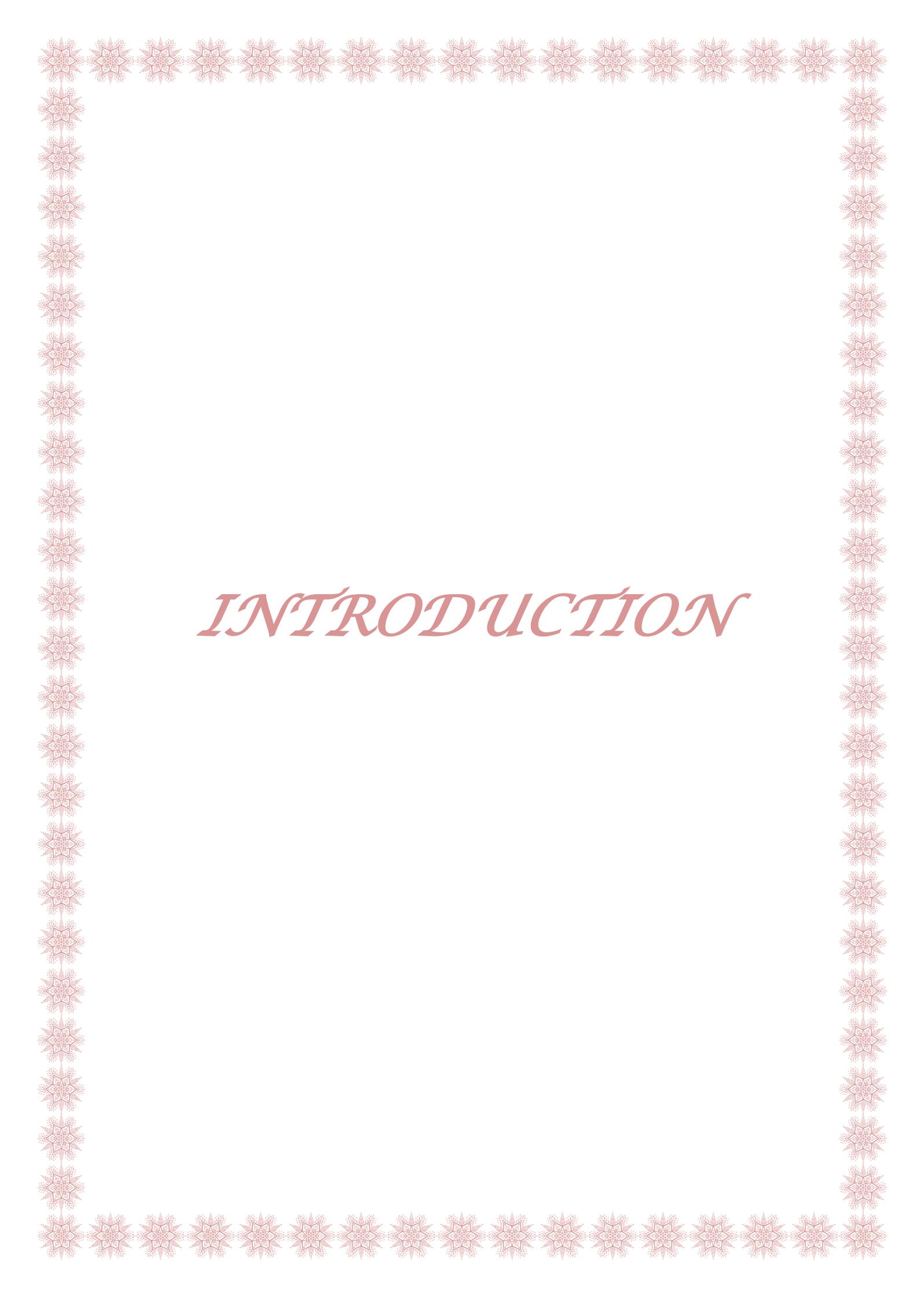
Liste des figures

Figure 1: Photographies de quelques espèces de <i>Rosacées</i>	2
Figure 2: Photographies des parties aériennes d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	3
Figure 3: Distribution géographique d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	6
Figure 4: Structures chimiques des composés triterpéniques des feuilles d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	7
Figure 5 : Structure des sesquiterpènes trouvés dans les feuilles d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	8
Figure 6 : Formation de radicaux libres au cours d'une réaction redox	11
Figure 7 : Formation des radicaux libres par divers mécanismes	13
Figure 8 : Schéma général des marqueurs d'oxydation des lipides, des acides aminés et des acides nucléiques au cours du stress oxydant	14
Figure 9 : Les étapes de peroxydation lipidique	15
Figure 10 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules	16
Figure 11 : Modification des LDL dans la paroi artérielle menant à la plaque	18
Figure 12 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses anti oxydantes	19
Figure 13 : Structure chimique de la vitamine C (acide ascorbique).....	21
Figure 14 : Structure chimique de α - tocophérol	21
Figure 15 : Pouvoir antioxydant de α - tocophérol	22
Figure 16 : Principaux caroténoïdes antioxydants	23
Figure 17 : Structure chimique des principaux acides phénoliques	25
Figure 18 : Structure chimique de quelque coumarine	25
Figure 19 : Deux exemples de tannins hydrolysables	26
Figure 20 : Exemple de structure d'un tannin condensé	27
Figure 21 : Structure chimique des flavonoïdes	28
Figure 22 : Mécanisme d'action d'un antioxydant phénolique	29
Figure 23 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques.....	30
Figure 24 : Photographies des feuilles d' <i>Eriobotrya japonica</i>	31
Figure 25 : Protocole d'extraction des composés phénoliques totaux	32

Figure 26 : Protocole de dosage des composés phénoliques	34
Figure 27 : Protocole de dosage des flavonoïdes	35
Figure 28 : Protocole de dosage des tannins (proanthocyanidines).....	36
Figure 29 : Forme oxydée et réduite du DPPH	37
Figure 30 : Protocole de l'activité scavenging du radical DPPH	38
Figure 31 : Protocole de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	39
Figure 32 : Formation et piégeage de radical ABTS ^{•+} Par un antioxydant donneur de H ⁺	40
Figure 33 : Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS ^{•+}	41
Figure 34 : Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i>	44
Figure 35 : Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> ...	45
Figure 36 : Représentation graphique des quantités en proanthocyanidines dans les différents extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i>	47
Figure 37 : Activité scavenging du radical DPPH par les extraits d' <i>Eriobotrya Japonica</i> et des standards (BHA et l'acide ascorbique)	48
Figure 38 : Représentation graphique de l'évaluation du pourcentage d'inhibition du DPPH• en fonction de la concentration en extrait organique du chloroforme des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i>	50
Figure 39 : Représentation graphique de l'évaluation du pourcentage d'inhibition du DPPH• en fonction des différent concentration de l'acide ascorbique en fonction de BHA.....	50
Figure 40 : Activité inhibitrice du radical ABTS ^{•+} par les extraits d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> et des standard.....	51
Figure 41 : Activité scavenging du radical ABTS à différentes concentration des extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> et celle de standard Trolox.....	51
Figure 42 : Pouvoir réducteur de l'antioxydant de synthèse la BHA	52
Figure 43 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> et de BHA	54

Liste des Tableaux

Tableau 1: principales caractéristiques des différentes parties d' <i>Eriobotrya japonica L.</i>	4
Tableau II: Taxonomie d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	5
Tableau III: principaux noms vernaculaires d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	5
Tableau IV: Caractéristiques des ERO et ERN	12
Tableau V : Activité biologiques des composés phénoliques	29
Tableau V I : Les pourcentages d'extraction pour chaque extrait d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	42



INTRODUCTION

Introduction

Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances à activités biologiques et pharmacologiques très variées, ce sont de véritable panacées et pharmacies naturelles (**Hambaba et al., 2012**).

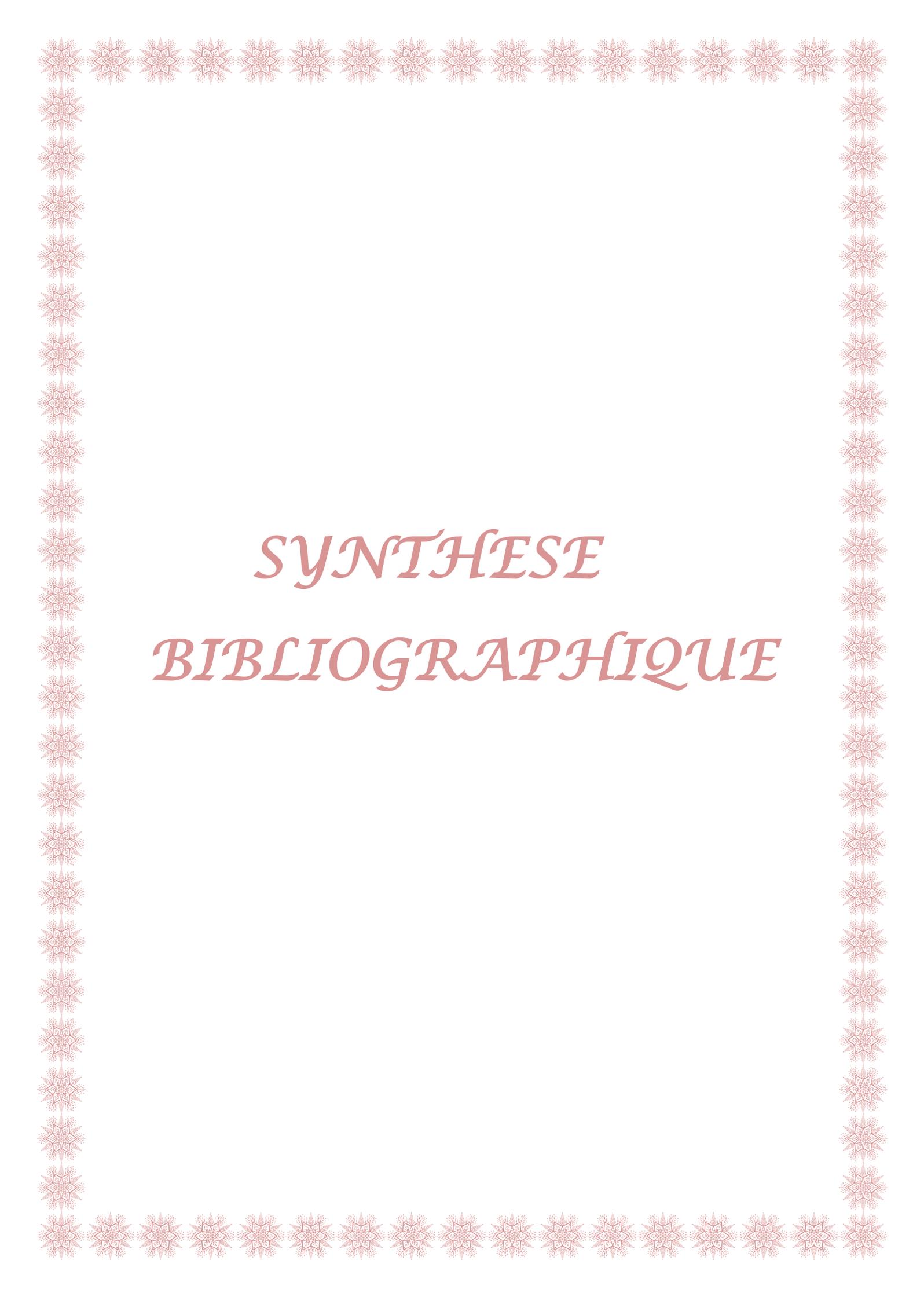
Elles sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs (**Xiaorui, 1998**).

Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré. Il est considéré aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels : le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Alain, 2003**).

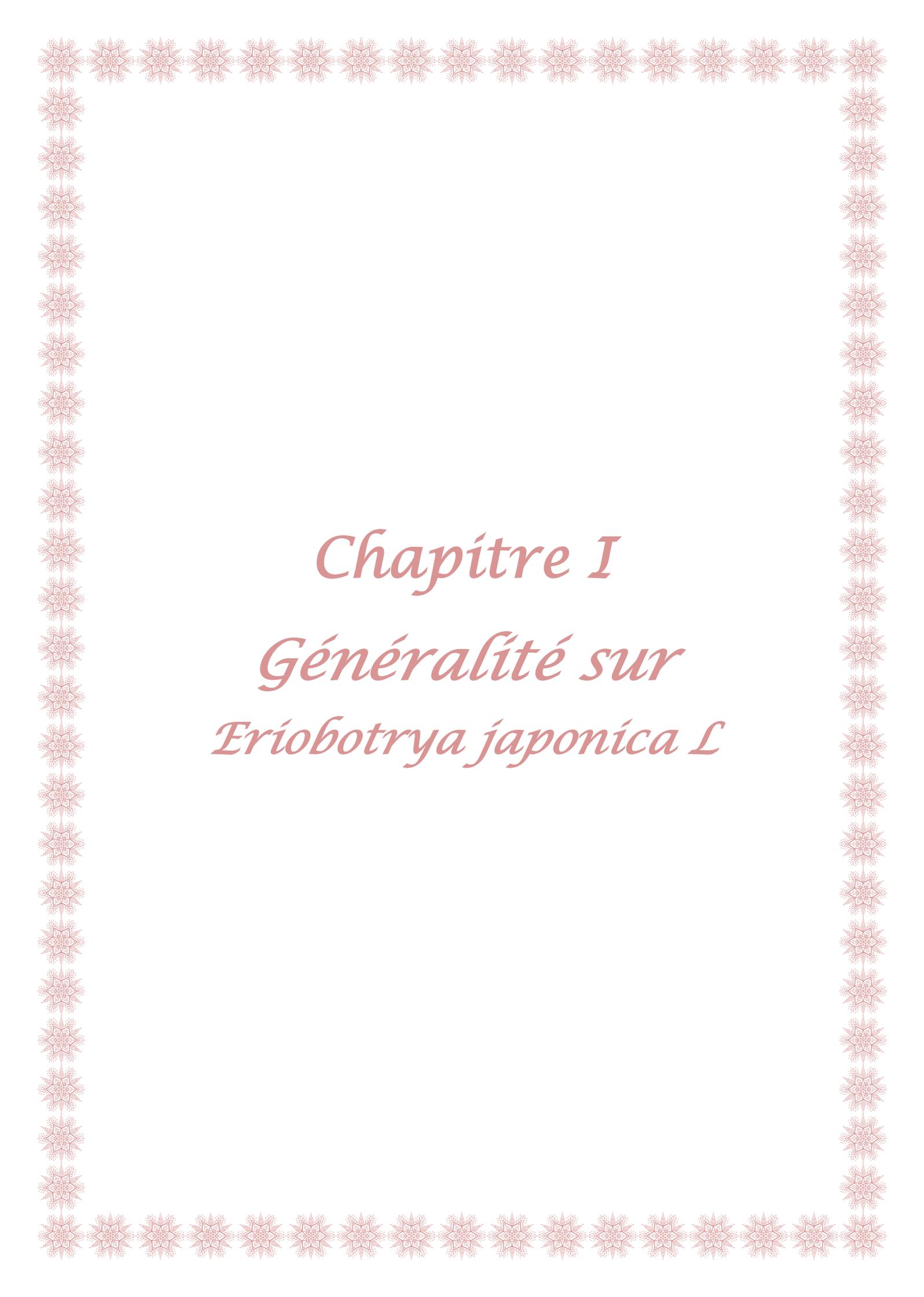
Une grande partie des recherches actuelles porte sur l'étude des molécules antioxydantes comme les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols (**Athamena et al., 2010**). En effet, les polyphénols sont des composés naturels largement répandus dans le règne végétal, qui ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires ; ils sont également utilisés comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Bougandoura et Bendimerad, 2012**).

Eriobotrya japonica L. est une plante médicinale appartient à la famille des *rosacées*, utilisé en médecine traditionnelle pour traité plusieurs maladies (**Alshaker et al., 2011**).

Par conséquent notre travail repose sur l'évaluation de la teneur en composés phénoliques des extraits des feuilles *d'Eriobotrya Japonica L* et l'évaluation de leur activité antioxydante par la réalisation des tests suivants : étude de l'activité scavenging du radical DPPH• et ABTS•+ et du pouvoir réducteur.



SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE



Chapitre I
Généralité sur
Eriobotrya japonica L

I-Généralités sur *Eriobotrya japonica L.***I-1-Généralités sur les *Rosacées* :**

Les *Rosacées* sont une famille assez pauvre en plantes médicinales (**Paris et Dillemann, 1960**), elle comporte surtout les espèces arborescentes ou arbustives, quelques unes seulement sont herbacées. Les arbres ou arbustes de cette famille comprennent les fruitiers les plus précieux des pays tempérés (**Guillaume, 2010**).

Les fleurs de *Rosacées* sont régulières, généralement à 5 pétales de couleur blanche, rose ou rouge, les étamines sont nombreuses, les ovaires sont formés d'un ou plusieurs carpelles. Les fruits des espèces ligneuses cultivées sont charnus et possèdent une ou plusieurs graines c'est ainsi que l'on parle des arbres à pépins : pommier, poirier et des arbres à noyau : cerisier, abricotier, pêcher, Prunellier, amandier (figure01) (**Pesson et Touveaux, 1984**).

*Prunus persica**Prunus spinosa**Sorbus aucuparia**Geum urbanum***Figure(01) :** photographies de quelques espèces de *Rosacées* (**Pichard et Rolland, 2009**).

I-2-Description botanique d'*Eriobotrya japonica* L. :

Eriobotrya japonica L. est un arbuste ou petit arbre fruitier (Hui-ya et al., 2010) à feuilles persistantes (Orwa et al., 2009), qui atteint environ 07mètre de hauteur (figure02). Il fleurit à l'automne ou au début de l'hiver, et ses fruits mûrissent à la fin de l'hiver ou au début du printemps (Ercisli et al., 2012). Il pousse bien dans presque tous les sols à bon drainage et aussi dans les sols acides et alcalins. En général, on peut le trouver dans les climats maritimes entre les altitudes 20° et 35° au nord et au sud, mais il peut croître à la latitude 45° (Chalak et al., 2014).



Figure(02) : photographies des parties aériennes d'*Eriobotrya japonica* L (Harrison, 2009).

I-2-1-caractéristiques des différentes parties de la plante :

Tableau I : principales caractéristiques des différentes parties d'*Eriobotrya japonica L.*

Organe	Caractéristique	Référence
Feuilles 	<ul style="list-style-type: none"> – persistantes – 12 à 30 cm de long et 3 à 9 cm de large – couleur toujours verte – bordées de quelques dents espacées. 	(Edward et <i>al.</i> , 1993; Junko et <i>al.</i> , 2007) (Tonelli et Gallouin, 2013)
Fruits 	<ul style="list-style-type: none"> – appelé la nèfle – de forme ovale, arrondie ou piriforme – surface lisse ou duveteuse – chaque fruit contient de trois à cinq grosses graines – couleur jaune pâle à orange vif – parfumée et légèrement acidulée – mesure environ 8cm de long et 4cm de diamètre dans sa partie la plus renflée. 	(Ercisli et <i>al.</i> , 2012) (Etienne, 1994)
fleurs 	<ul style="list-style-type: none"> – odorantes – de couleur blanche et délicate – contient généralement 5 pétales. 	(Orwa et <i>al.</i> , 2009) (Pesson et <i>al.</i> , 1984; Tonelli et Gallouin, 2013)
graines 	<ul style="list-style-type: none"> – couleur brune – forme allongée de 1 à 2cm de long. 	(Orwa et <i>al.</i> , 2009)

I-2-2-systématique d'*Eriobotrya japonica L.* :**Tableau II :** Taxonomie d'*Eriobotrya japonica L.*

Rang taxonomique	Nomenclature
Règne	Végétal.
classe	Dicotylédones (Tonelli et Gallouin, 2013).
Ordre	Pomées (Tonelli et Gallouin, 2013).
Famille	Rosacées (Niska et al., 2010).
Sous-famille	Maloideae (Cuevas et al., 2007).
Genre	<i>Eriobotrya</i>
Espèce	<i>Eriobotrya japonica L.</i>

I-2-3-noms vernaculaires de l'espèce :**Tableau III :** principaux noms vernaculaires d'*Eriobotrya japonica L.*

Langue	Nom	Référence
Français	Néflier du japon	(Claude, 2010)
	Bibassier	(Lim, 2012)
Anglais	Loquat	(Edward et al., 1993)
China	Pipa	(Kazunori et al., 2007)
japon	Biwa	(Lim, 2012)
Allemand	Japanische mispel	(Lim, 2012; Tonelli et Gallouin, 2013)
Espagnol	Nispolero	(Lim, 2012; Tonelli et Gallouin, 2013)
Italien	Nespolo del giappone	(Tonelli et Gallouin, 2013)

I-3-Distribution générale d'*Eriobotrya japonica L.* :

Le Néflier du Japon est indigène dans les montagnes du centre-est de la chine, dans les zones humides du japon où il est connu depuis toujours (Kazunori et al., 2007).

Il est également répondu dans le nord de l'inde, là où les conditions climatiques lui étaient favorables, ensuite il a été introduit en France par le botaniste Suédois Thunberg en 1784 (Tonelli et Gallouin, 2013). Vues les conditions climatiques favorables de la méditerranée pour sa culture, le Néflier du japon s'est bien adapté dans presque toute la

région ainsi qu'aux États-Unis, le Venezuela, le Brésil et en Australie (figure03) (Chalak et al., 2014).



Figure(03) : Distribution géographique d'*Eriobotrya japonica* L. (Orwa et al., 2009).

I-4-Composition biochimique d'*Eriobotrya japonica* L. :

❖ Fruits :

La nèfle est un fruit comestible composé de :

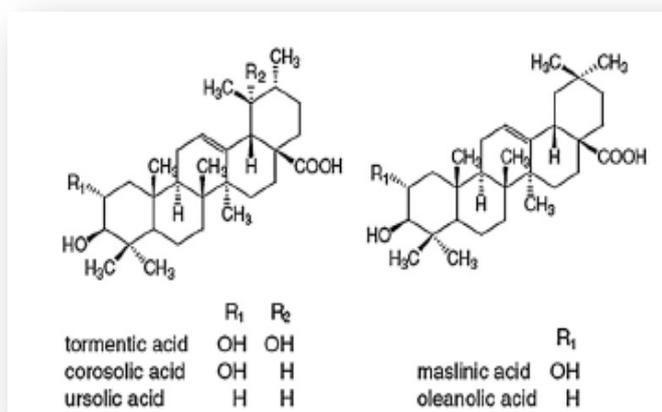
- 78,0% d'eau ;
- 10,6% d'hydrates de carbone ;
- 10,2% de fibre ;
- 0,5% de graisse (lipides complexes) ;
- 0,4% de protéines ;
- 0,3% d'autres composantes (Shahi et al., 2009).

❖ Feuille :

Un certain nombre de composés biologiquement actifs ont été rapportés dans les feuilles de cette plante, par exemple, des polyphénols (tanins, flavonoïdes), des triterpènes, sesquiterpènes et les glycosides de Megastigmane (Jin et al., 2001; Alshaker et al., 2011).

✓ **Triterpènes :**

Les feuilles d'*Eriobotrya japonica* contiennent une grande quantité de triterpènes (environ 50mg/g de poids sec) (Tamiguchi et al., 2002), y compris l'acide tormentique (TA), l'acide corosolique (CA), l'acide ursolique (UA), l'acide maslinique (MA) et l'acide oléanolique (OA) (figure 04) (Er-Na et al., 2009; Hui-ya et al., 2010).



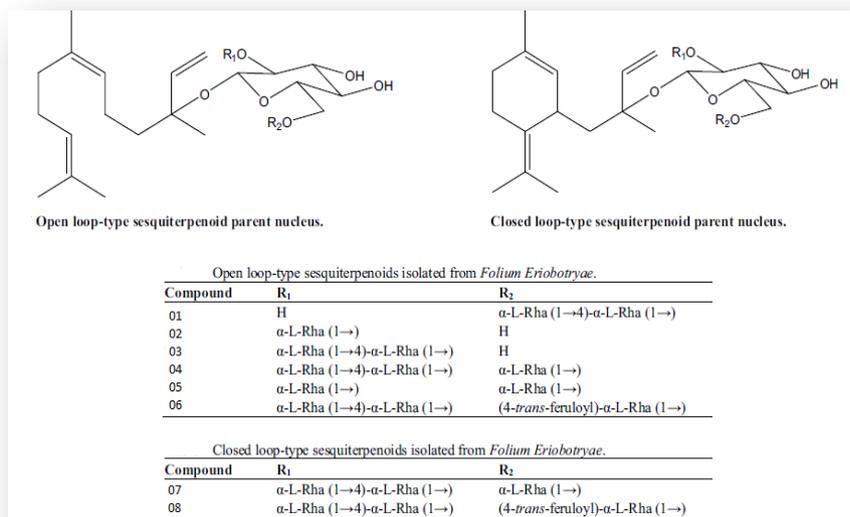
Figure(04) : structures chimiques des composés triterpéniques des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.*(Hui-ya et al., 2010).

✓ **Huile essentielle :**

Une grande quantité de composés se trouve dans l'huile essentielle des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.*, comme le nérolidol, le farnesol, l' α -pinène, le β -pinène, le camphène, le β -myrcène, le *p*-cymène, le linalol, l'oxyde trans-linalol, l' α -ylangène, l' α -frnesene, le β -farnésène, le camphre, le nérol, le Gera-Niol, l' α -cadinol, le cis- β , γ hexénol, dont 61à74% et représentés par le nérolidol (Chen and Li,2008).

✓ **Sesquiterpènes :**

De nombreux sesquiterpènes ont été trouvés dans les feuilles d'*E. Japonica L.* dont la plupart d'entre eux sont des sesquiterpènes glycosides caractérisés par le nérolidol ou l'isohumbertiol comme l'aglycone et par des chaînes oligosaccharidiques ramifiées constituées d'Al-rhamnopyranosyl et de B-D-glucopyranosyl (figure05) (Takuhiko et al., 2013).



Figure(05) : Structure des sesquiterpènes trouvés dans les feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* (Chen and Li, 2008).

✓ polyphénols :

L'extrait aqueux d'*Eriobotrya japonica* fournit une source riche en composés phénoliques polaires tels que les procyanidines et les flavonoïdes glycosidiques (Alshaker et al., 2011).

Selon Hideyuki et al., (2000) et Yanping et al., (2008), les feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* sont composée de plusieurs polyphénols tels que l'acide chlorogénique, l'acide 3-O-caféoylquinique, l'acide 4-O-caféoylquinique, l'acide 4-O-pcoumaroylquinique, la quercétine, l'isoquercitrine, la quercétine 3-O-sophorosides, le kaempférol 3-O-sophorosides, le kaempférol 3-O- α -rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D -glucopyranoside, la (2)-épicatechine, la procyanidine B-2, la procyanidine C-1, le 1-O-féruoyl- β -D-glucopyranose et le 4-O- β -glucopyranosyl-cis-acide *p*-coumarique.

I-5-Usage thérapeutique de la plante :

Traditionnellement, les feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* ont une longue histoire d'utilisation médicinale en Asie du Sud-est comme un anti-inflammatoire (**Huang et al., 2006; Jin et al., 2011; Kim et al., 2011**), un antivirale et un anticancéreux (**Jin et al., 2011**).

Elles sont utilisées aussi pour traiter les pathologies respiratoires, digestives et le diabète et il s'est avéré qu'elles sont efficaces dans le traitement de la bronchite chronique (**Alshaker et al., 2011**).

I-6- Activités biologiques d'*Eriobotrya japonica L.* :

Les feuilles du néflier du Japon sont fréquemment utilisées dans de nombreux médicaments à base de plantes chinoises pour les traitements de la toux et de l'asthme (**Yanping et al., 2008**).

Les activités anticancéreuse, anti-inflammatoire, hypoglycémique (**Yanping et al., 2008**) et la capacité antioxydante des parties de la plante sont principalement apportées par ses constituants phénoliques, principalement les composés flavonoïdes (**Kazunori et al., 2007; Yanping et al., 2008; Hui-Ya et al., 2010**).

✓ Activité sur l'obésité :

Jin et al., (2011), ont montré que les extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* exercent un effet anti-obésité par la régulation des facteurs de transcription tels que l'adipogène PPAR γ et le C/EBP α dans les adipocytes 3T3-L1.

✓ Activité anti-inflammatoire :

Les feuilles d'*E. Japonica L.* ont des composants efficaces qui pourraient supprimer la réponse inflammatoire induite par le LPS à travers l'inhibition de la production de NF- κ B, TNF- α , IL-1 (**Huang et al., 2006**).

✓ **Activité anti-cancéreuse :**

Takuhiro et al., (2013) ont constaté que le (AC) dérivé des feuilles d'*E. Japonica L.* est le triterpène antiprolifératif le plus puissant dans des lignées cellulaires de leucémie, mais pas dans des lignées cellulaires de fibroblastes de peau normale, et cela se fait par l'induction de l'apoptose médiée par un dysfonctionnement mitochondrial et l'activation des caspases.

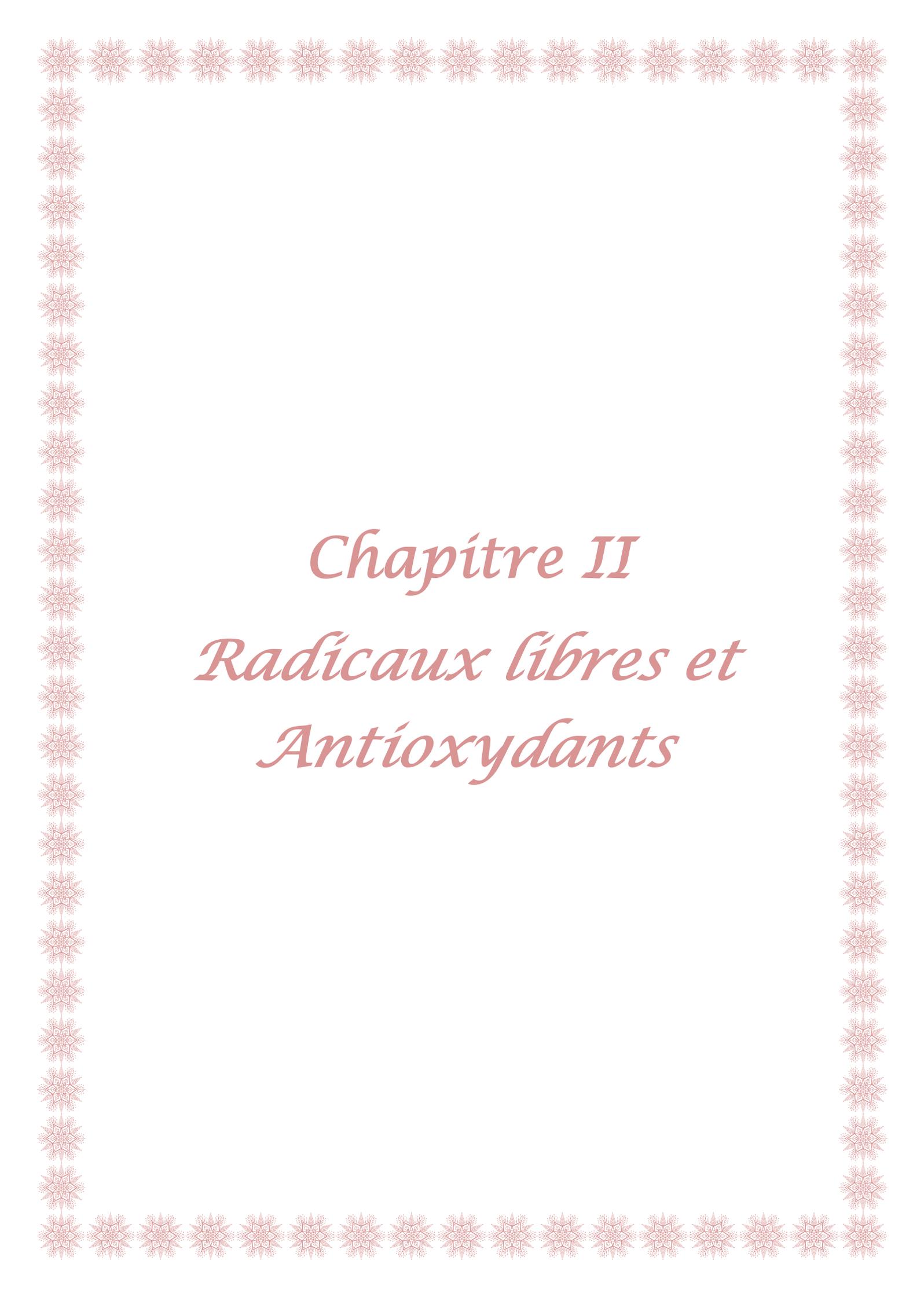
✓ **Activité antidiabétique :**

Les deux triterpènes polyhydroxylés (AC et AP) ont été capables de réduire les niveaux de glucose dans le sang chez des rats à glycémie normale (**Qa'dan et al., 2009**).

L'extrait d'éthanol à 70% des feuilles d'*E. Japonica L.* a un effet hypoglycémiant significatif chez les souris devenues diabétiques par l'alloxane et le total des sesquiterpènes a un effet significatif sur l'abaissement du niveau de glucose dans le sang des souris normales/souris devenues diabétiques (**Qa'dan et al., 2009**).

✓ **Activité antioxydante :**

Les travaux de **Yanping et al.,(2008)** ont montré que l'administration d'un extrait éthanolique des feuilles d' *Eriobotrya Japonica L.* à des rats inhibe l'augmentation de la peroxydation des lipides et restaure l'activité de la superoxyde dismutase, ce qui signifie qu'il est capable de réduire les dommages causés par les radicaux libres.



Chapitre II
Radicaux libres et
Antioxydants

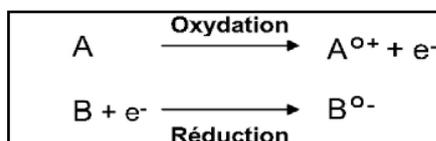
Chapitre II : les radicaux libres et antioxydants

II-1-radicaux libres :

II-1-1-Définition :

Un radical libre est une espèce chimique, ayant un nombre impair d'électrons sur l'orbite externe (**Gardès-Albert, 2003; Pelli et Lyly, 2003**), ce qui lui confère une grande instabilité et une forte réactivité (**Vansant, 2004**). Il possède un temps de demi-vie extrêmement court (10^{-9} - 10^{-6} S) (**Tessier et Marconnet, 1995**).

Ils peuvent se former au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical (figure06). En effet, ce radical libre aura tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité, donc l'oxydation de ces derniers (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).



Figure(06) : Formation de radicaux libre au cours d'une réaction redox (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

II-1-2- les radicaux libres en biologie :

Les radicaux libres tels que les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'azote (ERN) sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable (**Alain, 2003**). À faibles concentrations, ils sont des régulateurs des voies de signalisation et de l'expression des gènes au niveau des cellules vasculaires et jouent ainsi un rôle important dans les processus physiologiques et pathologiques de ces cellules (**Bonnefont-Rousselot et al., 2002**). Par exemple, au niveau musculaire, les travaux de Reid et al. (2001), montrent que l'exposition de fibres musculaires au H₂O₂ augmente toutes les caractéristiques de la contraction musculaire : pic de force, temps de demi relaxation. Les EOR participeraient également à l'amélioration du captage musculaire du glucose et à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire, mais

la production peut devenir excessive se qui peut provoquer des dommages dans l'organisme (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les ERO et ERN les plus souvent impliquées en physiopathologie sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($OH\cdot$), l'oxyde nitrique ($ON\cdot$) et le per-oxynitrite ($ONOO^-$) (Tableau IV) (Huet et Duranteau, 2008).

Tableau(IV) : Caractéristiques des ERO et des ERN.

Espèces	Symboles	Caractéristiques	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	<ul style="list-style-type: none"> - Radical peu réactif ; - toxique ; - oxyde les catécholamines ; - peut former OH°. 	(Tessier et Marconnet, 1995)
peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	<ul style="list-style-type: none"> - non radicalaire ; - faiblement stable ; - toxique ; - diffusible et antiseptique ; - peut former OH°. 	(Goudable et Alain, 1997)
radical hydroxyle	$OH\cdot$	<ul style="list-style-type: none"> - Très réactif, - peu diffusible ; - initiateur principal de la lipo-peroxydation, altère les protéines et l' ADN. 	(Tessier et Marconnet, 1995; Cillard et Cillard, 2006)
oxyde nitrique	$ON\cdot$	<ul style="list-style-type: none"> - hautement diffusible ; - peut former $ONOO^-$. 	(Massion et al., 2002)
per-oxynitrite	$ONOO^-$	<ul style="list-style-type: none"> - puissant oxydant ; - agent de nitration. 	(Ré et al., 2005)

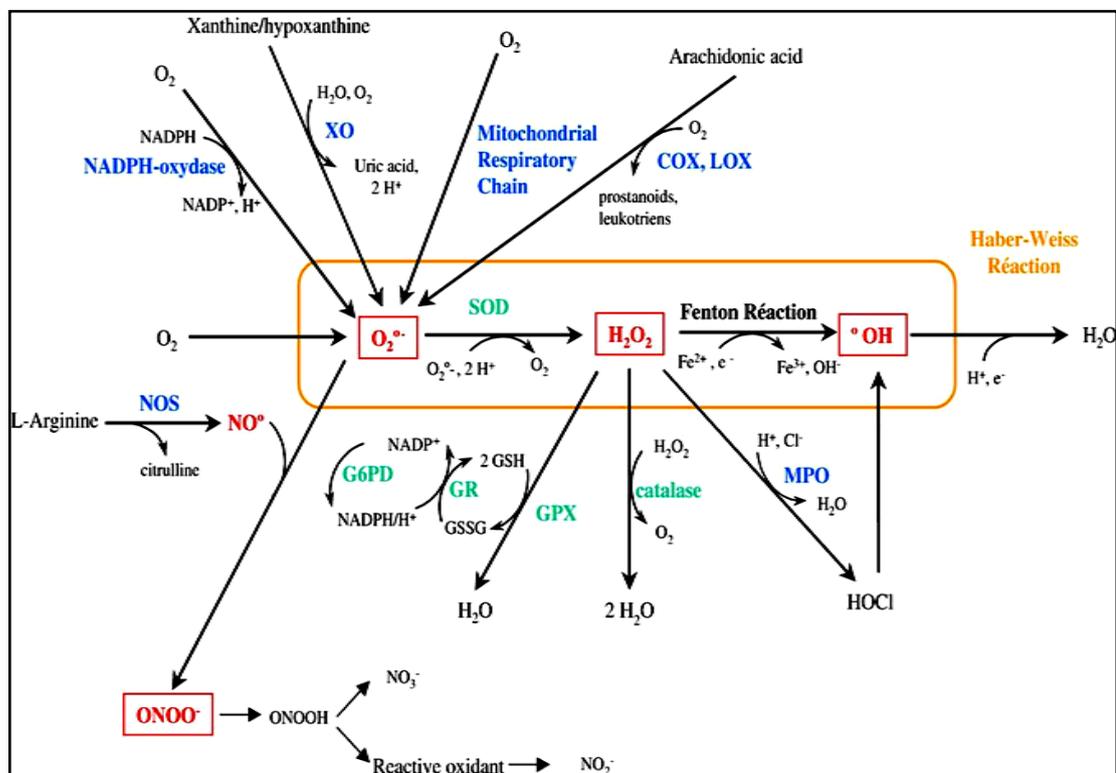
II-1-3-Génération des ERO et des ERN :

Les radicaux libres sont produits au cours de nombreuses réactions engagées dans les mécanismes physiologiques, (respiration mitochondriale), cette production peut devenir excessive dans les mécanismes pathologiques (inflammation, infection, toute pathologie

dégénérative et vieillissement accéléré) ou par l'exposition à des facteurs exogènes (Curtay et Robin, 2000; Afonso et al., 2007).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des métabolites réduits de l'oxygène qui sont beaucoup plus toxiques que l'oxygène lui-même (Gardès-Albert, 2003)

La formation du chef de file des espèces oxygénées réactives (l'anion superoxyde) va alors conduire au cours de véritables chaînes d'oxydoréductions à la formation de nombreuses espèces très réactives (figure07) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).



Figure(07) : formation des radicaux libres par divers mécanismes (la chaîne respiratoire mitochondriale, NADPH-oxydase, Xanthine /hypoxanthine, cyclooxygénase et la lipoxygénase produisent l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), la NO synthase qui forme l'oxyde nitrique (NO^{\bullet}), la réaction de fenton et la Myéloperoxydase (MPO) produisent le (OH^{\bullet}) (Margaill, 2005).

II-1-4-stress oxydatif :

Le stress oxydatif est un terme général utilisé pour décrire une situation de dommages (Pelli et Lyly, 2003) qui se définit par un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire, en faveur des premiers (Pincemail et al., 2001; Robert, 2006). Il est causé, soit par des espèces

radicalaires et leurs dérivés secondaires qui se multiplient ou par des mécanismes anti-radicalaires qui s'essouffent c'est-à-dire baisse de l'activité antioxydante (Adjélé et Leyli, 2003; Guichardant et al., 2006).

II-1-5-Conséquences du stress oxydant :

Les scientifiques élaborent de multiples expériences *in vitro* qui montrent la toxicité des radicaux libres responsables de dégâts cellulaires importants via le déclenchement de cassures et de mutations au sein de l'ADN, l'inactivation de diverses enzymes, la modification des structures protéiques, l'oxydation des sucres et l'induction de la peroxydation lipidique (figure08) (Pincemail et al., 2002; Defraigne et Pincemail, 2007).

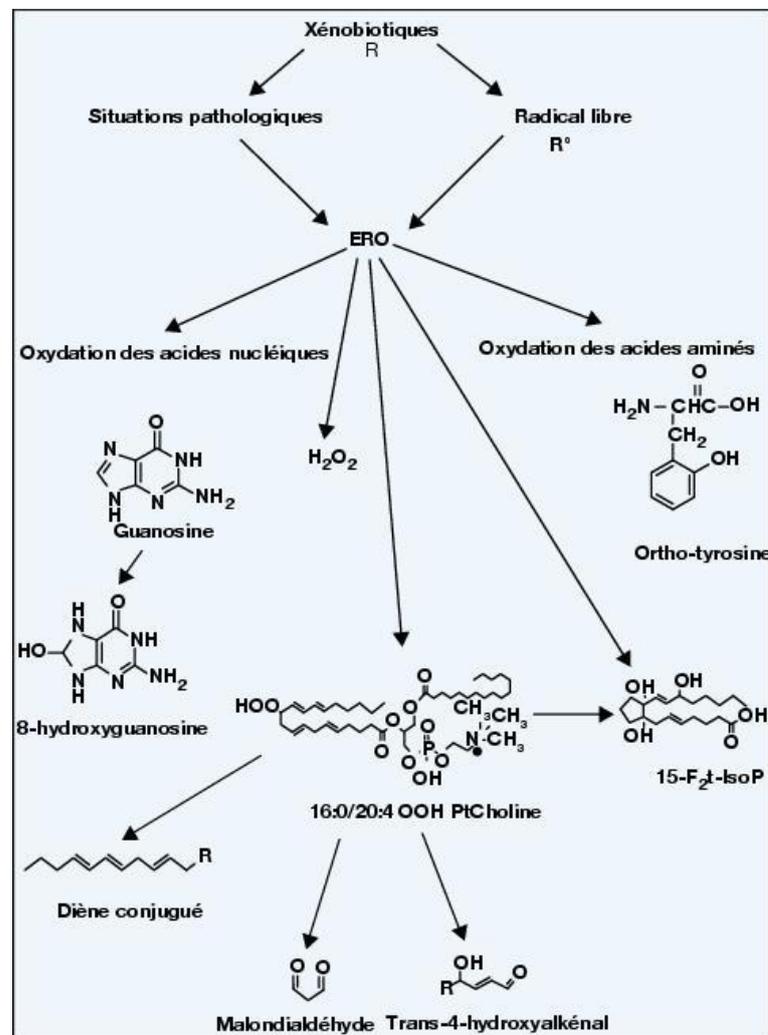


Figure (08) : Schéma général des marqueurs d'oxydation des lipides, des acides aminés et des acides nucléiques au cours du stress oxydant (Michelet et al., 2008).

- **peroxydation lipidique :**

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonedialdéhyde ou l'hydroxynonanal (**Alain, 2003**).

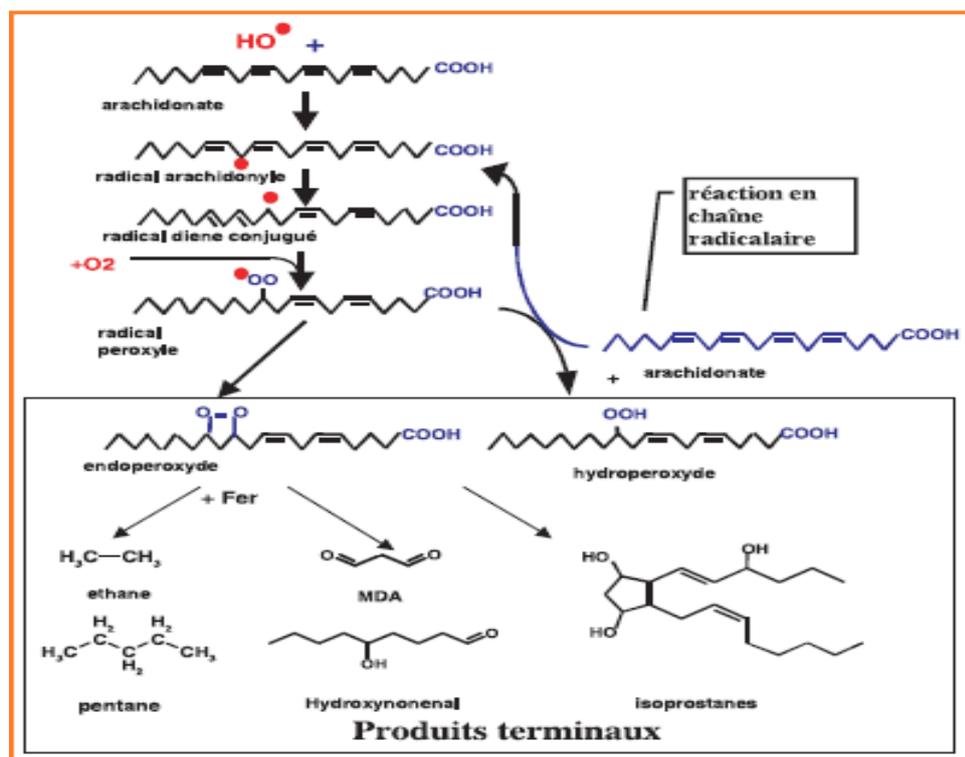


Figure (09) : Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (**Alain, 2003**).

- **Oxydation de l'ADN :**

Les modifications oxydative de l'ADN sont multiples sur les bases ou les sucres, et elles sont la cause principale de l'effet mutagène associé aux situations de stress (**Radicella et al., 2009**).

L'addition d' $\text{OH}\cdot$ sur la guanine peut se produire soit en position 8 soit en position 4. L'addition en position 8 conduit à la formation du radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyle qui est le précurseur de la 8-oxo-guanine. De façon similaire, l'addition en position 8 d' $\text{OH}\cdot$ sur l'adénine conduit à la formation de la 8-oxo-adénine (Radicella et al., 2009).

Ils peuvent conduire, via l'arrachement d'un atome d'hydrogène, à la formation d'une coupure de brin par libération du 2-désoxyribose ou par l'altération du sucre qui reste relié à l'extrémité 3' ou 5' du squelette phosphodiester ou à la formation d'un site abasique (sucre altéré mais relié par l'extrémité 3' et 5' au squelette phosphodiester) (figure10) (Amiad, 2013).

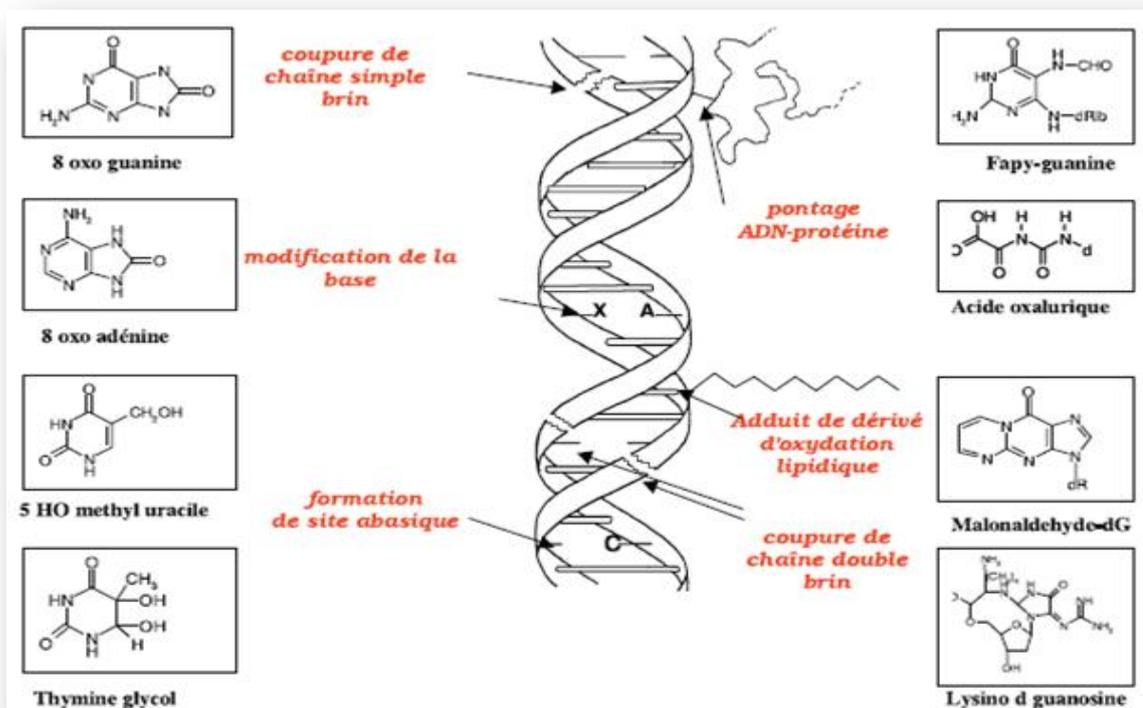


Figure (10) : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par $\text{OH}\cdot$ peuvent être générées. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines) (Alain, 2003).

II-1-6-Pathologies liées au stress oxydant :

Le stress oxydant est la principale cause initiale de nombreuses maladies souvent liées au vieillissement : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire. Le stress oxydant est aussi un des Facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles telles le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardio-vasculaires (**Adjélé et Leyli, 2003**).

❖ Athérosclérose :

L'OMS définit l'athérosclérose comme une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibres consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires(**Beaudeau et al., 2006**).

Les ERO produits par les monocytes dans l'intima provoquent l'oxydation des LDL qui peuvent être éliminées par les macrophages. Ces derniers vont, soit maintenir un équilibre sans épaississement de l'intima, soit, suite au débordement de ce système d'élimination, se transformer en cellules spumeuses ; en effet, ces cellules présentent un récepteur aux LDL oxydées (dit scavenger), qui n'étant pas régulé par le contenu intracellulaire en cholestérol, accumule des lipides sous forme de vacuoles lipidiques. Celles-ci deviennent de plus en plus grandes, entraînant la mort cellulaire et la libération du contenu lipidique dans l'intima à l'origine de l'épaississement de l'intima puis de cœur lipidique de la plaque athérosclérose constituée (figure 11) (**Baudin, 2006**).

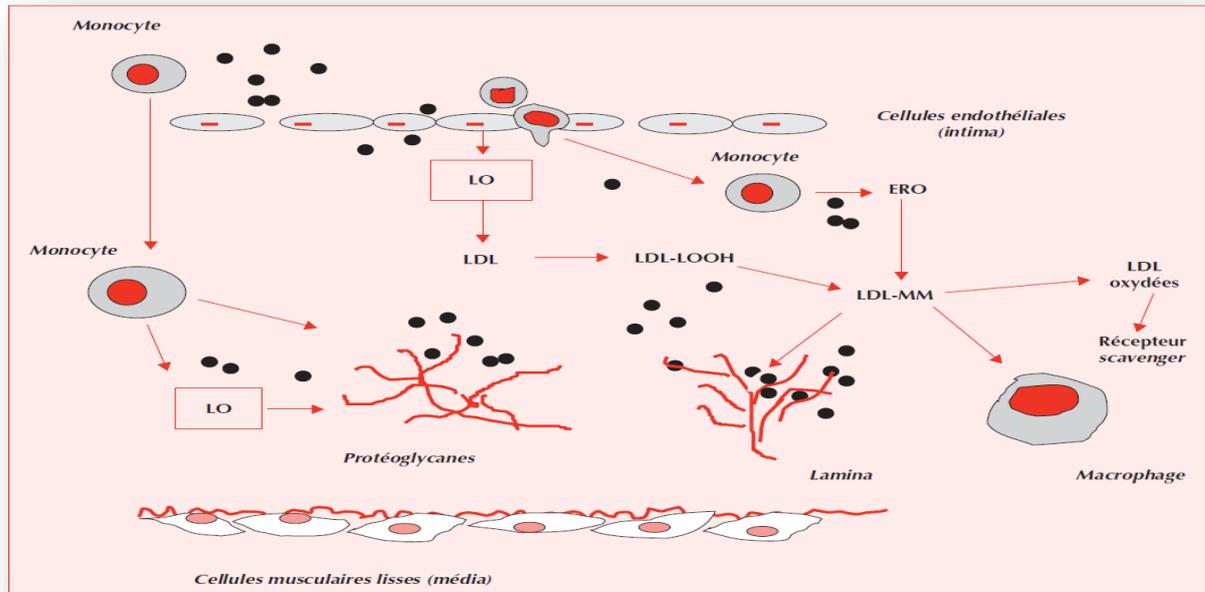


Figure (11) : Modification des LDL dans la paroi artérielle menant à la plaque (Baudin,2006).

II-2-Les antioxydants :

II-2-1-Définition :

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Vansant, 2004; Mette, 2006).

II-2-2-Les différents types d'antioxydants :

La production physiologique d'ERO est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (superoxyde dismutases (SODs), catalase, glutathion peroxydases (GPx's), couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, hème oxygénase, peroxyrédoxine...) (Pincemail et al., 2002; Gardés-Albertet al., 2003) et de molécules anti oxydantes non enzymatiques de petite taille (glutathion, les vitamines E et C, la bilirubine, l'acide lipoïque) (figure12) (Barouki, 2006).

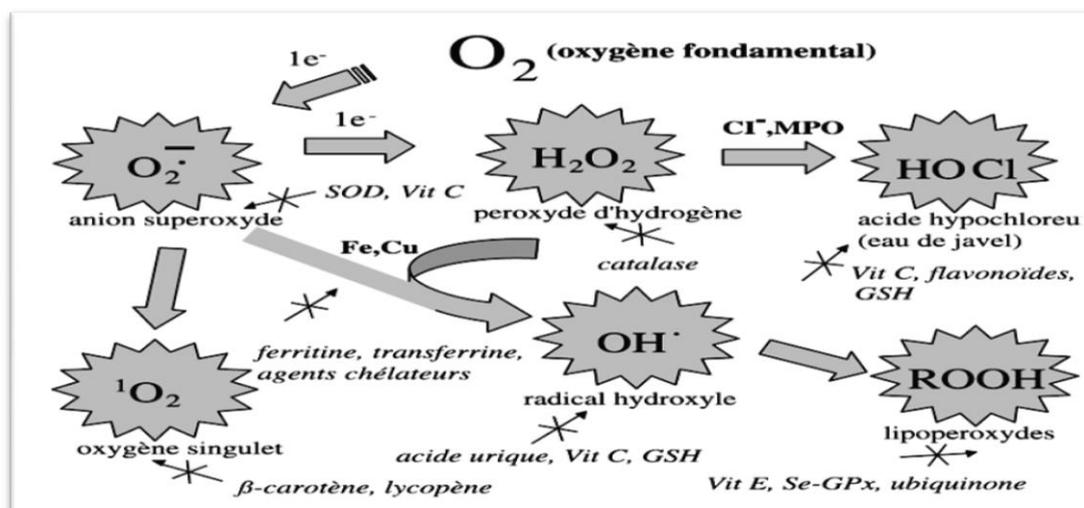


Figure (12) : régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses anti oxydantes (Pincemail et al., 2002).

II-2-2-1-Les antioxydants enzymatiques :

- **La superoxyde dismutase (SOD) :**

L'enzyme superoxyde dismutase (SOD) est impliquée dans la neutralisation de l' $O_2^{\bullet -}$ en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), évitant ainsi la formation de dérivés plus toxiques comme le peroxynitrite ($ONOO^-$) ou le radical hydroxyle ($HO\bullet$) (Guichardant et al., 2006; Afonso et al., 2007).

Il en existe trois types: une SOD contenant du cuivre et du zinc (Cu/Zn-SOD), localisée dans le cytosol des cellules eucaryotes et dans les globules rouges; une SOD contenant du manganèse (Mn) située dans les mitochondries, et un facteur de haut poids moléculaire à activité SOD (EC-SOD) situé dans le plasma et les poumons humains (Pincemail et al., 1998).

- **La catalase :**

C'est une enzyme tétramérique, principalement présente dans les peroxysomes de diverses cellules, dans les plaquettes et le stroma des érythrocytes. Elle transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau (Kirkman et Gaetani, 1984; Gardès-Albert et al., 2003), selon la réaction :



- **Les glutathion peroxydase(GPx) :**

La GPx se trouve principalement dans des organites cellulaires bien individualisés comme les peroxysomes, la membrane mitochondriale externe reforme les glutathion peroxydase capable de catalyser la désamination oxydative de certaines amines (**Gardès-Albert et al., 2003**). Elle métabolise Le H_2O_2 en H_2O et agit également sur les hydro peroxydes qui proviennent de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (acide linoléique, linoléique et arachidonique) (**Vansant, 2004; Afonso, 2007**).

Elle agit par son groupement sélénol, deux molécules de GPx sont nécessaires à la transformation d'une molécule d'hydro peroxyde. Comme ces deux GSH s'oxydent en GSSG (forme oxydée), il est indispensable que la GPx soit couplée au système de régénération du GSH (forme réduite active) qui est catalysée par la glutathion réductase NADPH2-dépendante (**Baudin, 2006**).

II-2-2-2-Les antioxydants non enzymatiques :

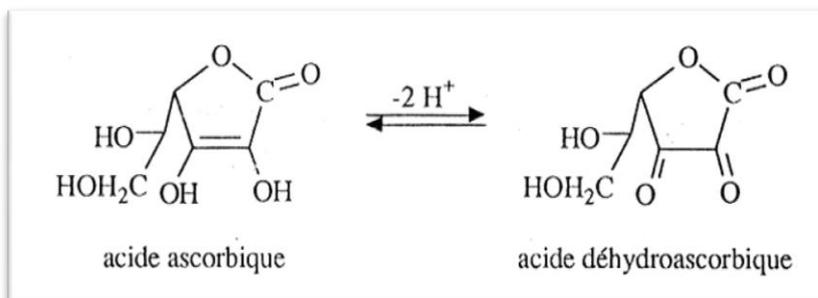
- **La vitamine C :**

La vitamine C (acide ascorbique) est l'antioxydant hydrosoluble largement répandue dans les fruits et les légumes (figure14). Elle est toutefois instable à la chaleur et à la lumière UV (**Lubochinsky, 2000**).

- ✓ **Mécanisme d'action de la vitamine C :**

La vitamine C a la propriété d'être fortement réductrice, Cette molécule agit sur l'oxygène par oxydoréduction grâce à sa fonction ène-diol et se transforme en acide déhydroascorbique (figure13) qui a la même activité biologique que l'acide ascorbique (**Lubochinsky, 2000**).

Elle permet la régénération de la vitamine E et du glutathion nécessaire à la glutathion-peroxydase (**Curtay et Robin, 2000**).

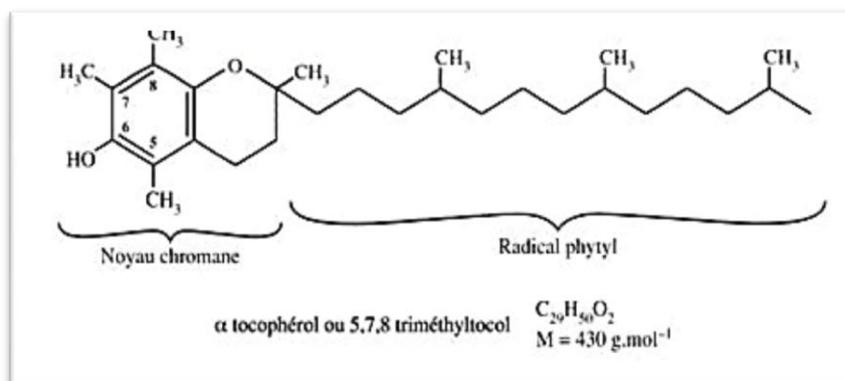


Figure(13) : transformation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique par une oxydation (**Lubochinsky, 2000**).

La vitamine E :

La vitamine E (tocophérols) est une vitamine liposoluble que l'on rencontre surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines. Les fruits, les légumes et la viande contiennent également une petite quantité de vitamine E (**Zazzo, 2002; Vansant, 2004**). Elles sont formées d'un noyau chromane porteur de radicaux méthyles et d'une chaîne terpénique (**Frénot et Vierling, 2001**).

Elle désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les α , β , γ et δ -tocophérols, dont la forme la plus active et la plus répandue est celle d' α - tocophérol (figure14) (**Curtay et Robin, 2000**).



Figure(14) : structure chimique de l' α - tocophérol (**Frénot et Vierling, 2001**).

✓ Mécanisme d'action de la vitamine E :

La concentration en vitamines E dans le plasma est de 10mg.L^{-1} (valeur corrélée avec celle des lipides totaux), transportées par les β -lipoprotéines, elle est stockée dans le foie, les glandes surrénales, les tissus adipeux et les cellules du sang. Elle est éliminée par voie biliaire et urinaire (Frénot et Vierling, 2001).

Le rôle antioxydant des tocophérols est surtout net vis-à-vis des phospholipides membranaires (1 molécule de tocophérol protège 1 000 molécules d'AGPI) (Figure15) (Frénot et Vierling, 2001).

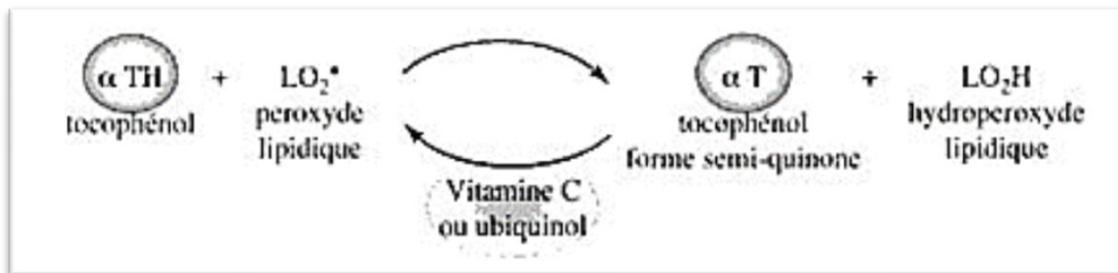


Figure (15) : pouvoir antioxydant de l' α - tocophérol. (Frénot et Vierling, 2001).

• Caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles de couleur jaune, orangée à rouge. Malgré l'identification de plus de 600 caroténoïdes spécifiques, seul un nombre limité d'entre eux sont présents en quantité sensible dans le sang et les tissus humains (Curtay et Robin, 2000). Ils peuvent être des hydrocarbures purs appelés carotènes (lycopène, β -carotène...) ou posséder un groupement fonctionnel oxygéné et dans ce cas, s'appeler xanthophylles (astaxanthine, lutéine...) (figure16). Ils sont considérés parmi les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet (Laguerre et al., 2007).

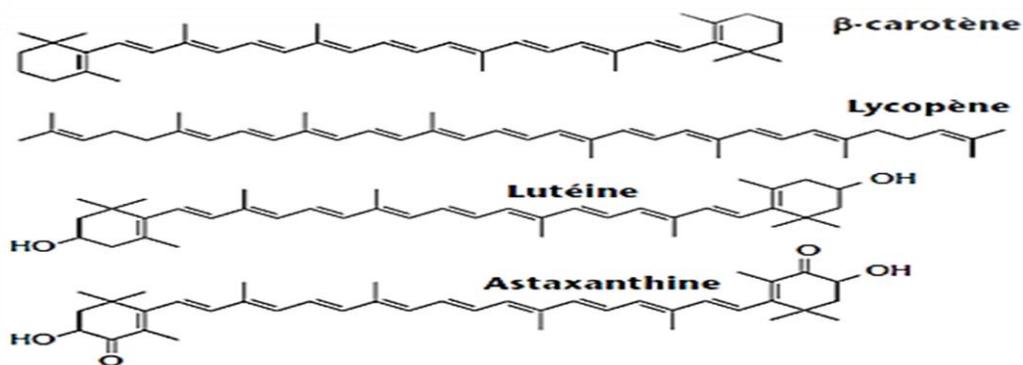
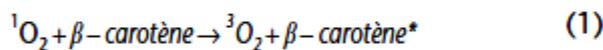


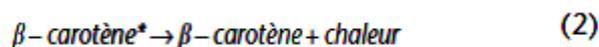
Figure (16) : Principaux caroténoïdes antioxydants (Marc *et al.*, 2004).

✓ Mécanisme d'action :

Les caroténoïdes exercent une activité d'antioxydante par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes distincts bien que probablement complémentaires par exemple (antioxydant piègeur d'oxygène singulet). Ce dernier mode d'action s'exerce par la désactivation de 1O_2 en 3O_2 (réaction1) (Laguerre *et al.*, 2007).



Ensuite, le $\beta\text{-carotène}^*$ grâce à son long système polyénique conjugué, dissipe son excès d'énergie au travers l'interaction vibrationnelles et rotationnelles avec son environnement (réaction 2) (Laguerre *et al.*, 2007).



II-3-Les composés phénoliques :

II-3-1-Définition:

Les polyphénols représentent un groupe de métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés dans le règne végétal (Macheix *et al.*, 2005; Collin et Crouzet., 2011). Ils sont présents dans les fruits, les légumes, les graines, les fleurs et aussi les herbes où ils contribuent à la couleur et aux propriétés sensorielles telles que l'amertume et l'astringence (Motamed et Texier, 1999; Ojeil *et al.*, 2010).

Ils sont caractérisés par la présence au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (**Brzowska et Hanower, 1976; Bruneton, 2009**).

II-3-2-biosynthèse des polyphénols :

Selon **Jean, (2009)**, les composés phénoliques sont synthétisés à partir de deux grandes voix :

- ✓ **Voie des Shikimates (acide shikimique) :** c'est la voie la plus courante, elle conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines.
- ✓ **Voie des acétates :** qui conduit à des poly- β -cétoesters de longueur variable (les polyacétates) qui engendrent, par cyclisation des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, orcinols, depsides, depsidones, xanthonnes, quinones, etc.

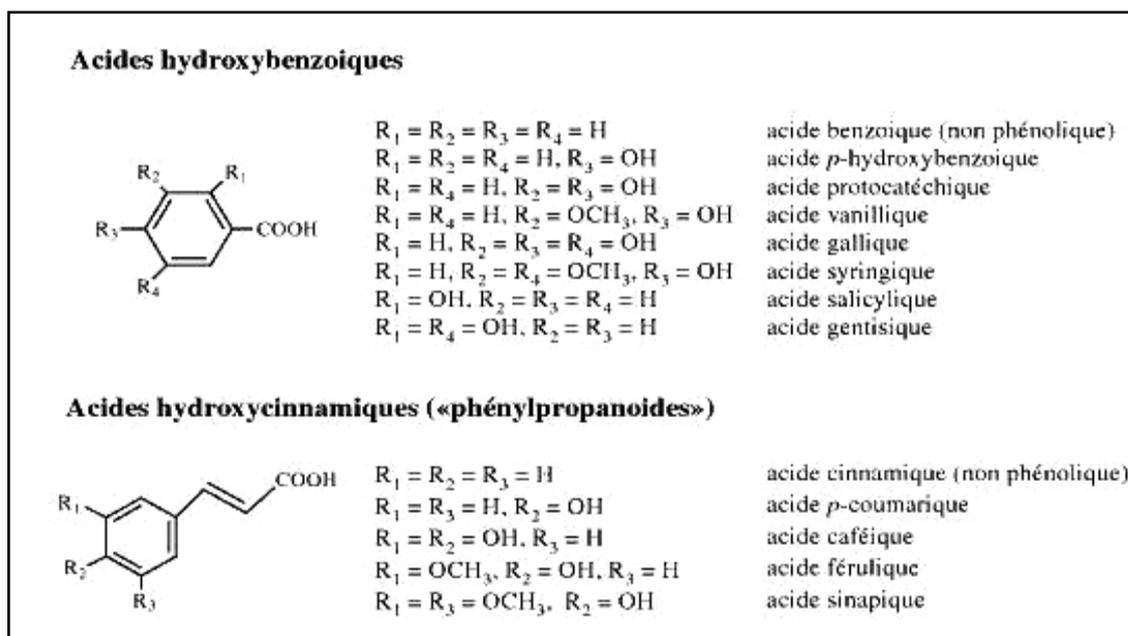
La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du Shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte comme les flavonoïdes (**Bruneton, 2009**).

II-3-3-Classification des composés phénoliques :

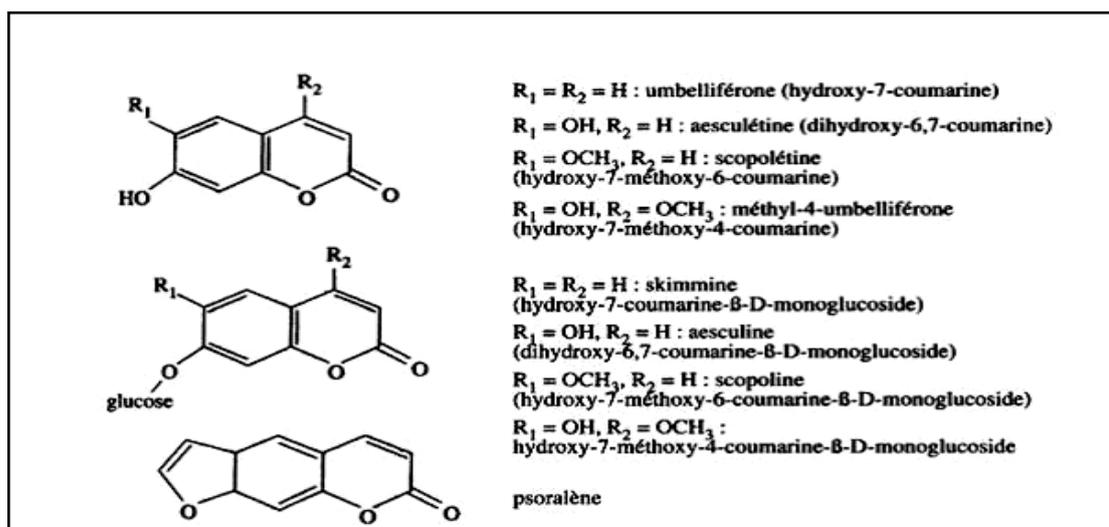
Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques. A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**). Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (**Ribéreau-Gayon, 1998**).

❖ Les acides phénoliques ou phénols simples :

Parmi les acides phénoliques, on distingue les dérivés de l'acide benzoïque, ceux de l'acide cinamique (figure17), et des coumarines (figure18) (**Collin et Crouzet, 2011**).



Figure(17) : Structure chimique des principaux acides phénoliques (Macheix et al., 2005).



Figure(18) : Structure chimique de quelques coumarines (Collin et Crouzet, 2011).

❖ Les tanins :

Les tanins constituent un sous-ensemble des substances polyphénoliques végétales de masse moléculaire suffisamment élevée et possédant un nombre suffisant d'hydroxyles phénoliques et d'autres groupements carboxyles pour former des complexes solides avec les protéines et d'autres macromolécules (Woodward et Reed, 1989). On les trouve dans les fruits et l'écorce des arbres (Ojeil et al., 2010). La plupart de leurs propriétés découlent de

leur capacité à former des complexes avec les macromolécules, en particulier les protéines (Gazengel-Amme et Orecchioni, 2013).

On distingue deux grands groupes de tannins différent à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Woodward et Reed, 1989; Besançon *et al.*, 2000).

- **Les tannins hydrolysables :**

Les tannins hydrolysables (T_H) sont des polyesters de l'acide gallique ou ellagique associés à des sucres ou des polyols (Descheemaeker, 2004). Ils sont des piègeurs de radicaux libres et de l'ion superoxyde (Gazengel-Amme et Orecchioni, 2013).

Parmi les formes simples de tannins hydrolysables on trouve le penta-galloylglucose (figure19), molécule très réactive qui est à l'origine de la plupart des formes complexes, et la castalagine chez la châtaignier ou le chêne (Macheix *et al.*, 2005).

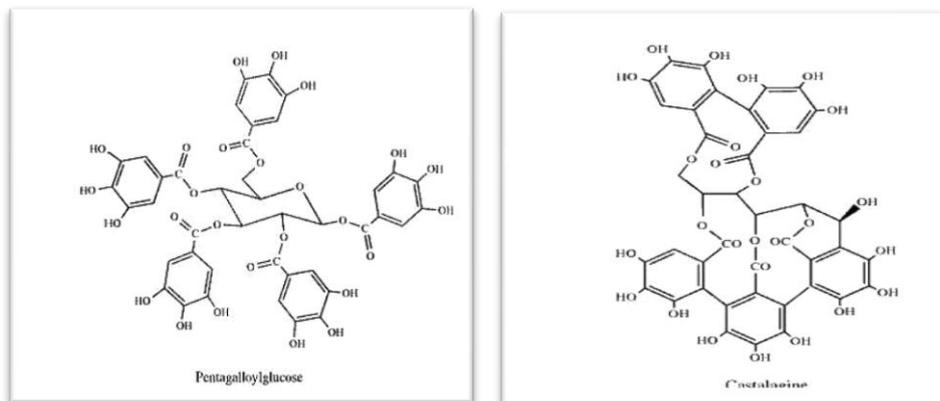
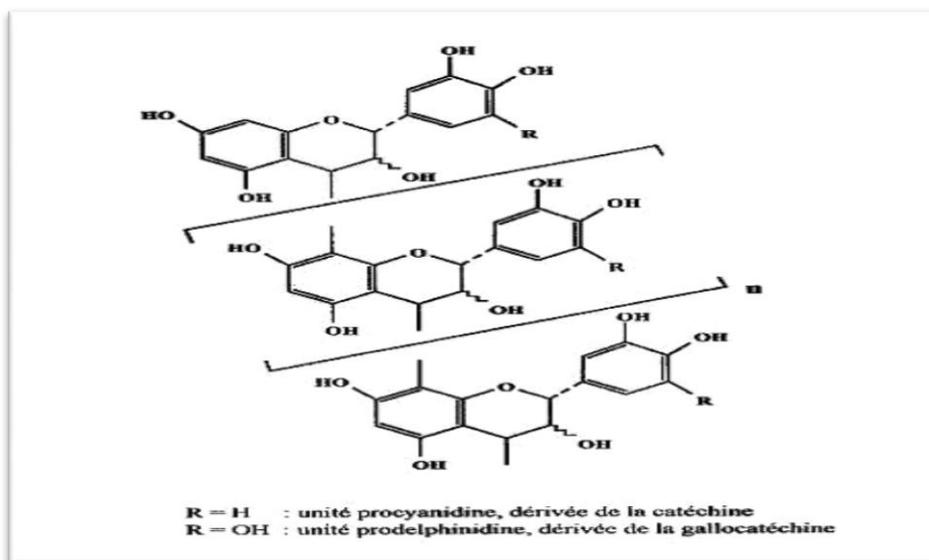


Figure (19) : Deux exemples de tannins hydrolysables (Macheix *et al.*, 2005).

- **Les tanins condensés :**

Les tannins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères ou des polymères des catéchines (figure20) (Descheemaeker, 2004).

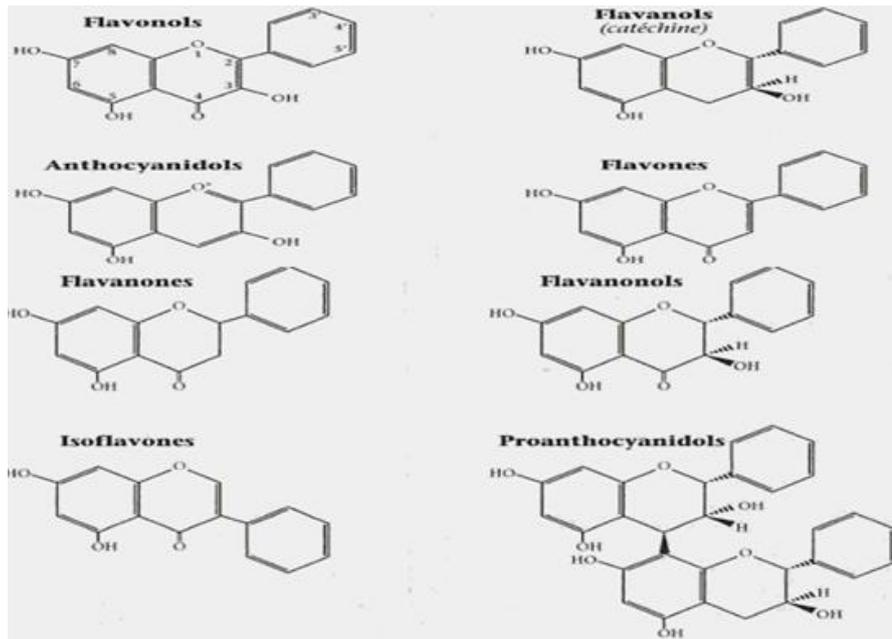


Figure(20) : Exemple de structure d'un tannin condensé (Macheix et al., 2005).

❖ Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes appelés aussi bioflavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) (Figure21) (Collin et Crouzet, 2011).

Ils englobent une large gamme et diversifiée de dérivés phénoliques hydrosolubles dont la plupart ont une action antioxydante. Ils sont constitués de deux anneaux aromatiques liés par trois atomes de carbone qui forment un composé hétérocyclique oxygéné. Ils sont divisés en six sous-catégories: les flavonols; les flavones; les isoflavones; les flavonols (catéchines et proanthocyanidines); les flavanones; les anthocyanidines (Charles et Benbrook, 2005).



Figure(21) : Structure chimique des flavonoïdes (Besançon et al., 2000).

II-3-4-Activités biologiques des polyphénols :

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leur effet antioxydant qui est du à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène, ou décomposition des peroxydes (macheix et al., 2005), ce qui leur confère divers propriétés physiologiques (Tableau V).

Tableaux(V) : Activités biologiques des composés phénoliques :

Polyphénols	Activités	Référence
Acides phénols	<ul style="list-style-type: none"> - Activité antioxydante - Antiagrégants plaquettaires, - Anti-allergènes 	(Motamed et Texier, 1999). (Martin et Andriantsitohaina, 2002)
Coumarines	<ul style="list-style-type: none"> - Neurosédatives - Diurétiques - Activité antioxydant 	(Motamed et Texier, 1999)
Flavonoïdes	<ul style="list-style-type: none"> - Antioxydantes - Anti-inflammatoire - Anti cancérogènes - Hypotenseurs et diurétiques 	(Bruneton, 2009)
Tanins	<ul style="list-style-type: none"> - Anti-nutriments - Anti-diarrhéiques - Antioxydant 	(Bruneton, 2009)

II-3-5-Mécanismes d'action des composés phénoliques :

- Piégeage des radicaux libres :

Les composés phénoliques sont des molécules capables d'interrompre la chaîne autocatalytique de l'oxydation en bloquant les radicaux lipidiques $R\cdot$ et $ROO\cdot$ par transfert d'un atome d'hydrogène $H\cdot$ pour reformer RH et $ROOH$. De même, ils peuvent transformer les radicaux alcoyles $RO\cdot$ en ROH , bloquant ainsi la formation des aldéhydes (figure22) (De Reynal et Multon, 2009).

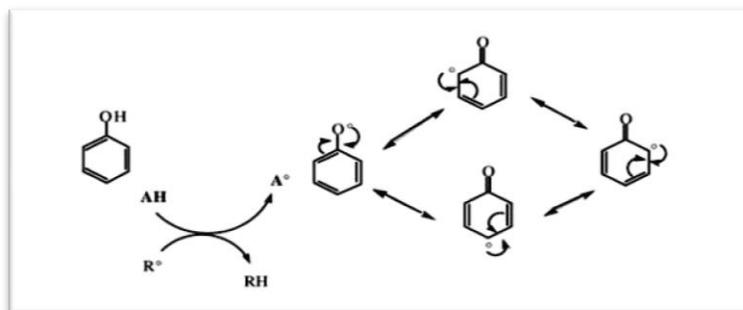


Figure (22) : Mécanisme d'action d'un antioxydant phénolique. (De Reynal et Multon, 2009)

- **Chélation des ions métalliques :**

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) 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 les superoxydes dismutases). Mais, ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène (Alain, 2003), selon la réaction:



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques grâce à leur structure chimique qui contient des sites essentiels pour la chélation de ces ions (figure23) (Marfak, 2003).

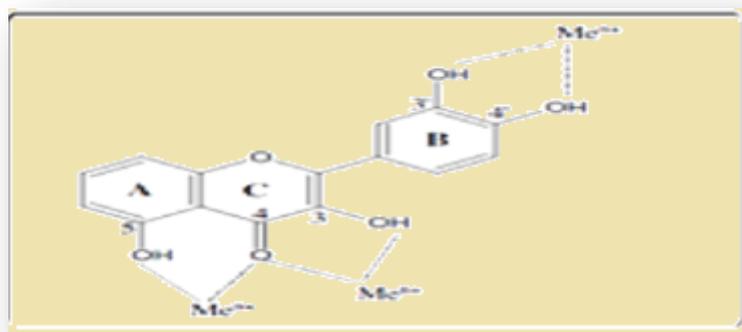


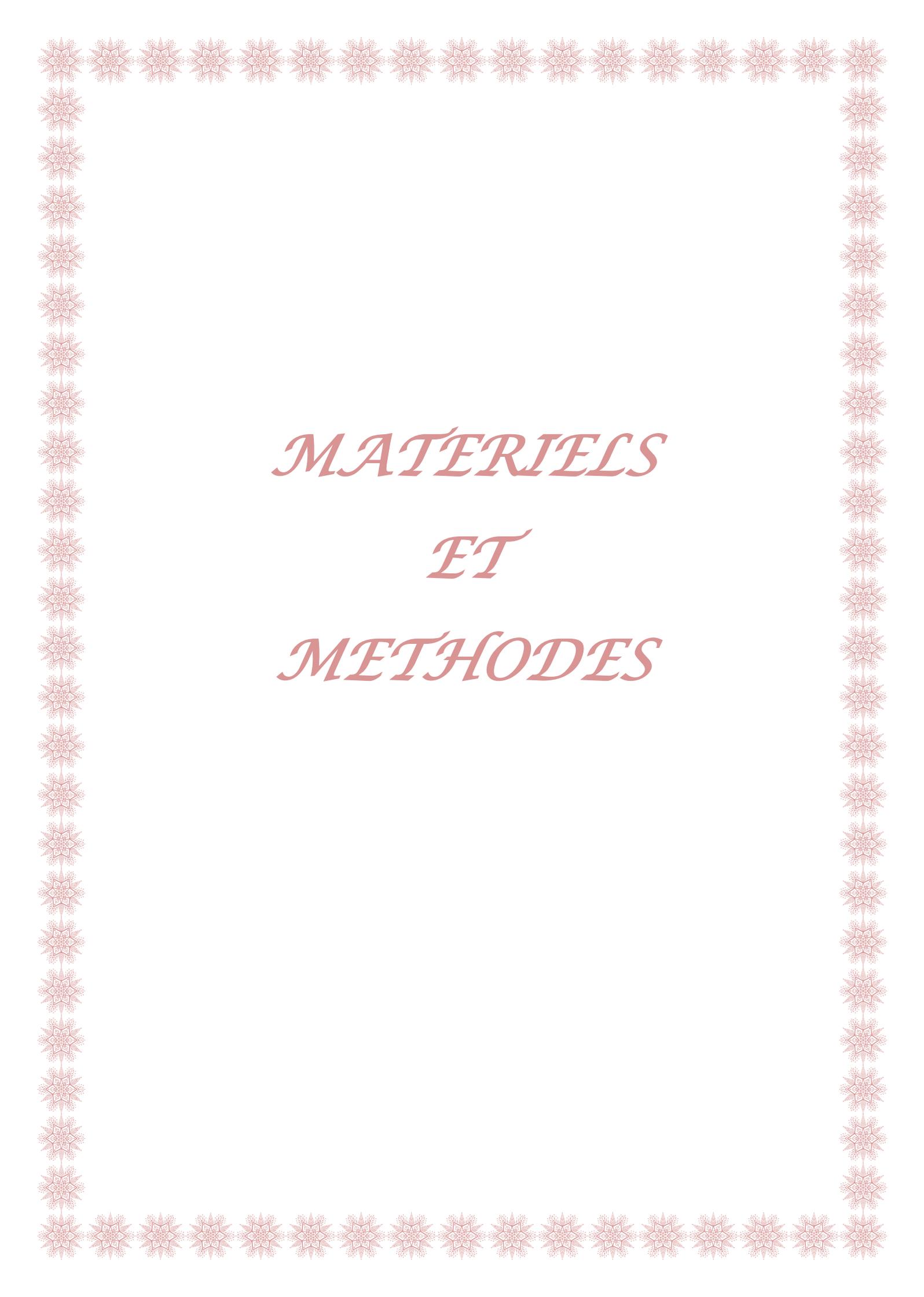
Figure (23) : Les flavonoïdes et leur sites proposés pour la chélation des ions métalliques (1 : Un noyau catéchol sur le cycle B, 2 : les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, 3 : les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C) (Marfak, 2003).

- **Inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres:**

Quelques flavonoïdes sont aussi de forts inhibiteurs de certaines enzymes métaboliques qui génèrent des produits de radicaux libres telle que la cyclooxygénase, la lipoxygénase, la monoamine oxydase, la XO et l'oxyde nitrique synthase inductible (Le et al., 2007).



Partie expérimentale



MATERIELS
ET
METHODES

I-Matériel et méthodes

I-1- Préparation du matériel végétal :

Cette étude est porté sur une espèce de plante de la famille des Rosacées qui est *Eriobotrya japonica L.*

I-1-1- Récolte de la plante :

Les feuilles d'*Eriobotrya japonica L* (figure24) ont été récoltées au mois de septembre 2013 dans le village de Targa ouzemour, de la wilaya de Bejaia, loin de tout impact de pollution.

I-1-2- Séchage et broyage :

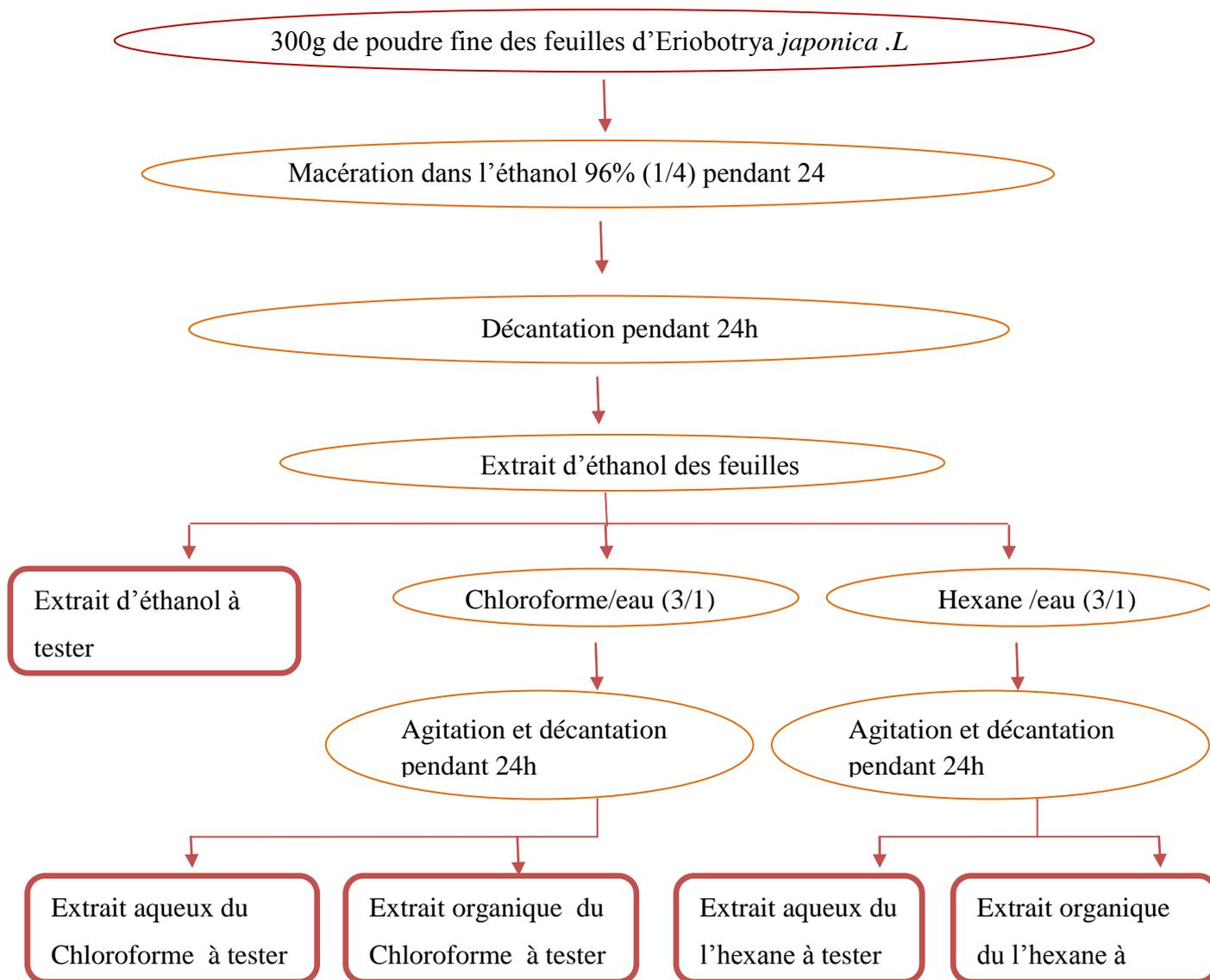
Après la récolte, les feuilles de la plante ont été lavées à l'eau courante afin de les débarrasser des poussières et autres particules et conservées à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Puis les feuilles de la plante ont été séchées a l'air libre pendant 1 mois, ensuite broyées à l'aide d'un broyeur électrique, en une poudre fine.



Figure(24) : Photographies des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.*

I-2-Extraction des composés phénoliques totaux :

Le procédé d'extraction des polyphénols utilisé est celui décrit par **Chiang et al., (1994)** (figure25). Le principe de cette méthode se base sur l'extraction sélective liquide-solide des composés phénoliques en utilisant quatre solvants de différentes polarités : l'éthanol, l'eau, le chloroforme et l'hexane. Toutes les étapes d'extraction qui suivront en été réalisées à température ambiantes.



Figure(25) : protocole d'extraction des composés phénoliques totaux (**Chiang et al., 1994**).

❖ Calcul du rendement :

Après l'extraction, cinq extraits ont été obtenus, le taux d'extraction de chaque extrait sec a été calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Taux d'extraction} = [(P - P_0) / \text{poids de la poudre}] * 100$$

Ou :

P₀ : poids vide du creuset.

P : poids après évaporation du solvant.

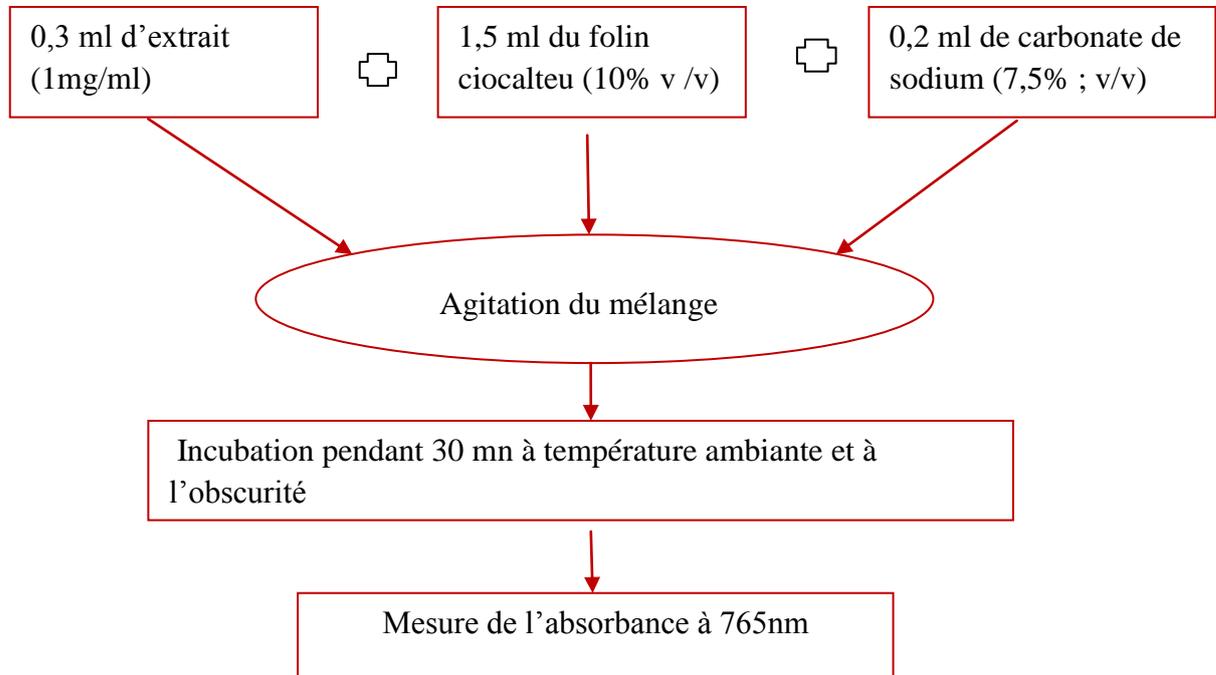
I-3-Dosage des différents groupes de composés phénoliques :

Dans le but d'évaluer qualitativement et quantitativement le contenu en composés phénoliques des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* Trois protocoles ont été suivis afin de doser les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

Il est à noter que pour tous les dosages, l'extrait sec a été reconstitué dans du méthanol, et des blancs ont été préparés. Le dosage des différents groupes de composés phénoliques a été réalisé sur les extraits éthanoliques, organiques et aqueux du chloroforme et organiques et aqueux d'hexane des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* dans les mêmes conditions.

I-3-1- Dosage des phénols totaux :**a) Principe :**

La quantification colorimétrique des composés phénoliques totaux a été déterminée selon la méthode décrite par **Yap et al., (2009)** (figure 26). Le principe est basé sur l'utilisation du réactif de Folin Ciocalteu, qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3W_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Ces derniers, lors de l'oxydation des phénols, sont réduits en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène, en présence d'une solution alcaline. La coloration produite, dont l'absorption maximale se situe à 765 nanomètres est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

b) Mode opératoire :

Figure(26) : protocole de dosage des composés phénoliques (Yap *et al.*, 2009).

N.B : un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol.

c) Expression des résultats :

Les concentrations en composés phénolique totaux des extraits sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue à différentes concentrations d'acide galliques dans le méthanol. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par g d'extrait (mg EAG /g d'extrait).

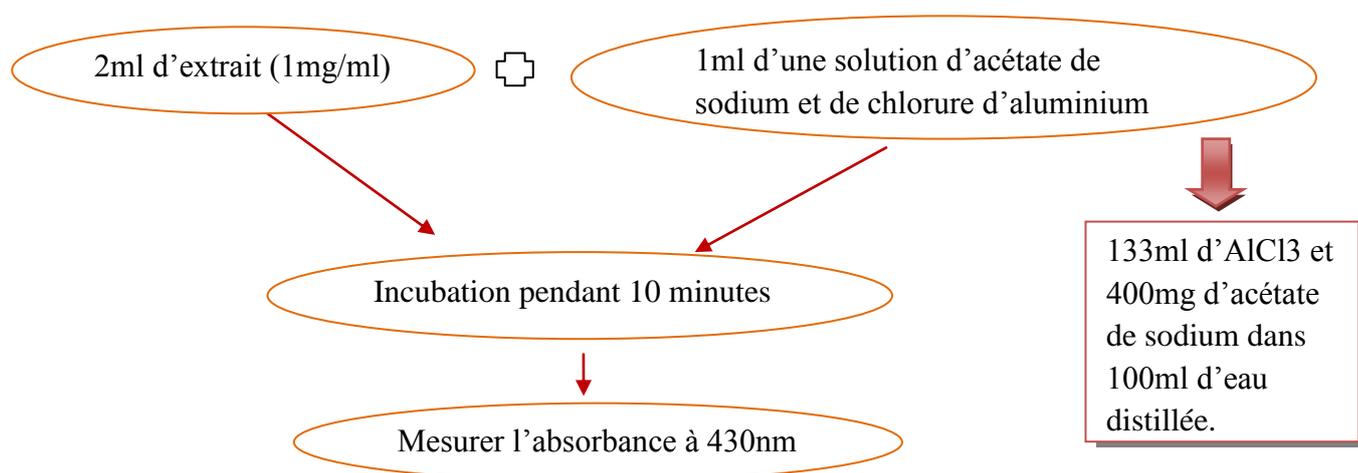
I-3-2-Dosage des flavonoïdes :

a) Principe :

Le dosage des flavonoïdes repose sur leur aptitude à chélater les métaux (fer et aluminium) par leur groupements hydroxyles, forment ainsi des complexes jaunâtres. (Ribéreau-gayon, 1968).

b) Mode opératoire :

La teneur en flavonoïdes a été déterminée selon la méthode de **Mimica-Daki, 1992 in (Abdou bouda et al., 2010)** (figure27).



Figure(27) : Protocole de dosage des flavonoïdes (Abdo Bouda et al., 2010).

N.B : Un blanc a été préparé pour chaque extrait en mélangeant 2ml de solution d'extrait avec 1ml d'eau distillée.

c) Expression des résultats :

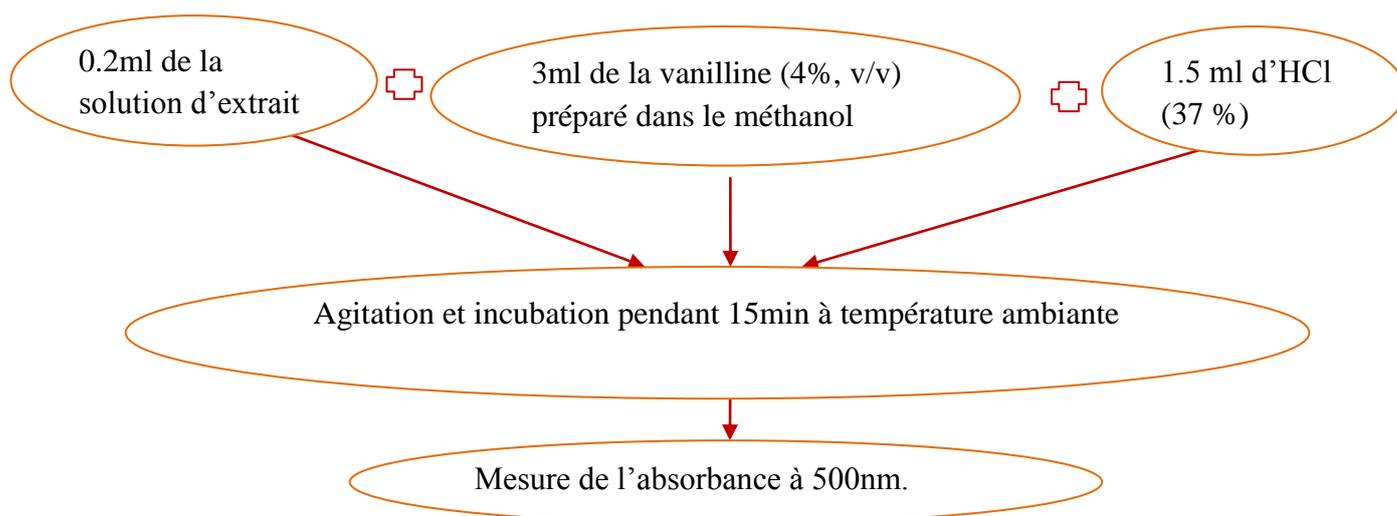
Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant la quercétine comme standard étalon, à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine par g de poids sec d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

I-3-3-Dosage des tanins (proanthocyanidines) :**a) Principe :**

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode de la vanilline acidifiée. Cette technique est basée sur la capacité de la vanille à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500nm. (Nakatsubo *et al.*, 2002).

b) Mode opératoire :

La teneur en tanins condensés (proanthocyanidines) est déterminée selon la méthode de Sun *et al.*, 1998 in (oyedemi et Afolayan, 2011) avec quelques modifications (figure28)



Figure(28) : Protocole de dosage des tanins (proanthocyanidines) (Oyedemi et Afolayan, 2011).

N.B : Un blanc d'extrait a été préparé pour chaque extrait, contenant 0.5ml de solution d'extrait, 3 ml du méthanol et 1.5ml d'HCl.

c) Expression des résultats :

Les concentrations sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée à différentes concentration dans les mêmes conditions, en utilisant la catéchine comme standard et les concentrations ont été exprimés en mg équivalent catéchine par g d'extrait (mg EC/g d'extrait).

I-4- Activité antioxydants des extraits :

Pour toutes les activités, l'extrait sec de composés phénoliques et l'huile essentielle sont reconstitués dans du méthanol et préparés à différentes concentrations.

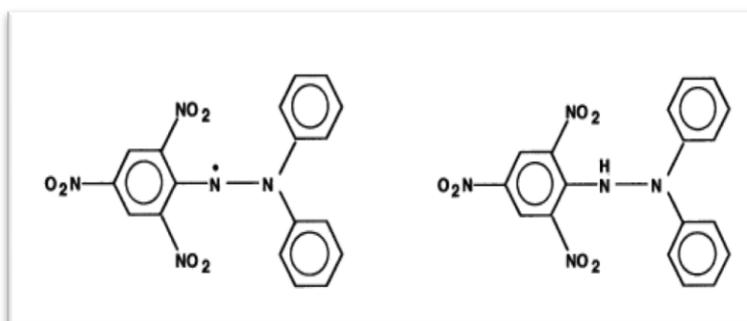
Le blanc est préparé selon le même protocole que l'extrait sauf que ce dernier est remplacé par du méthanol.

I-4-1- Activité « scavenging » du radical DPPH :

L'activité scavenging des radicaux libres des extraits a été mesurée en utilisant le radical libre stable DPPH[•] (C₁₈H₁₂N₅O₆).

a) Principe :

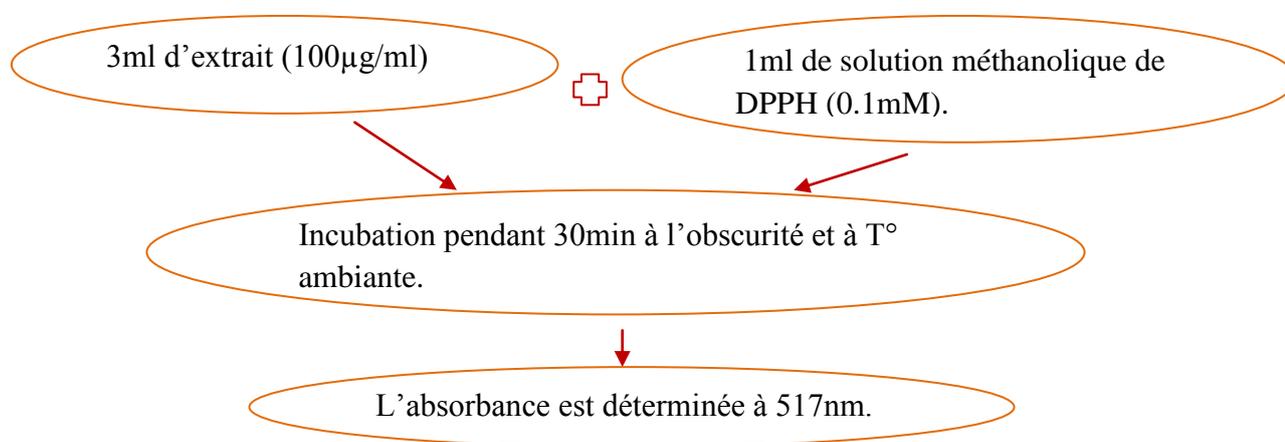
En présence des piègeurs de radicaux libres, le DPPH[•] (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) de couleur violette (forme oxydée) se réduit en 2,3 Diphenyl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (figure29).L'intensité de l'activité anti-radicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité (Molyneux, 2004).



Figure(29) : Forme oxydée et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

b) Mode opératoire :

L'effet « scavenger » des extraits d'*Eriobotrya japonica* L. vis-à-vis du radical DPPH• a été mesuré selon le protocole de **Hemalath et al., (2010)** représenté dans la (figure30).



Figure(30) : Protocole de l'activité scavenging du radical DPPH' (**Hemalatha et al., 2010**).

c) Expression des résultats :

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH• a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ scavenging du radical DPPH}\bullet = (A_C - A_E / A_C) * 100.$$

Où :

A_C : Absorbance du contrôle (DPPH +méthanol)

A_E : Absorbance de l'échantillon {Absorbance du teste (échantillon + DPPH) – Absorbance du blanc du teste (échantillon+méthanol)}.

I-4-2- Le pouvoir réducteur :**a) Principe :**

Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure en fer ferreux (Fe^{2+}). La forme réduite de ce

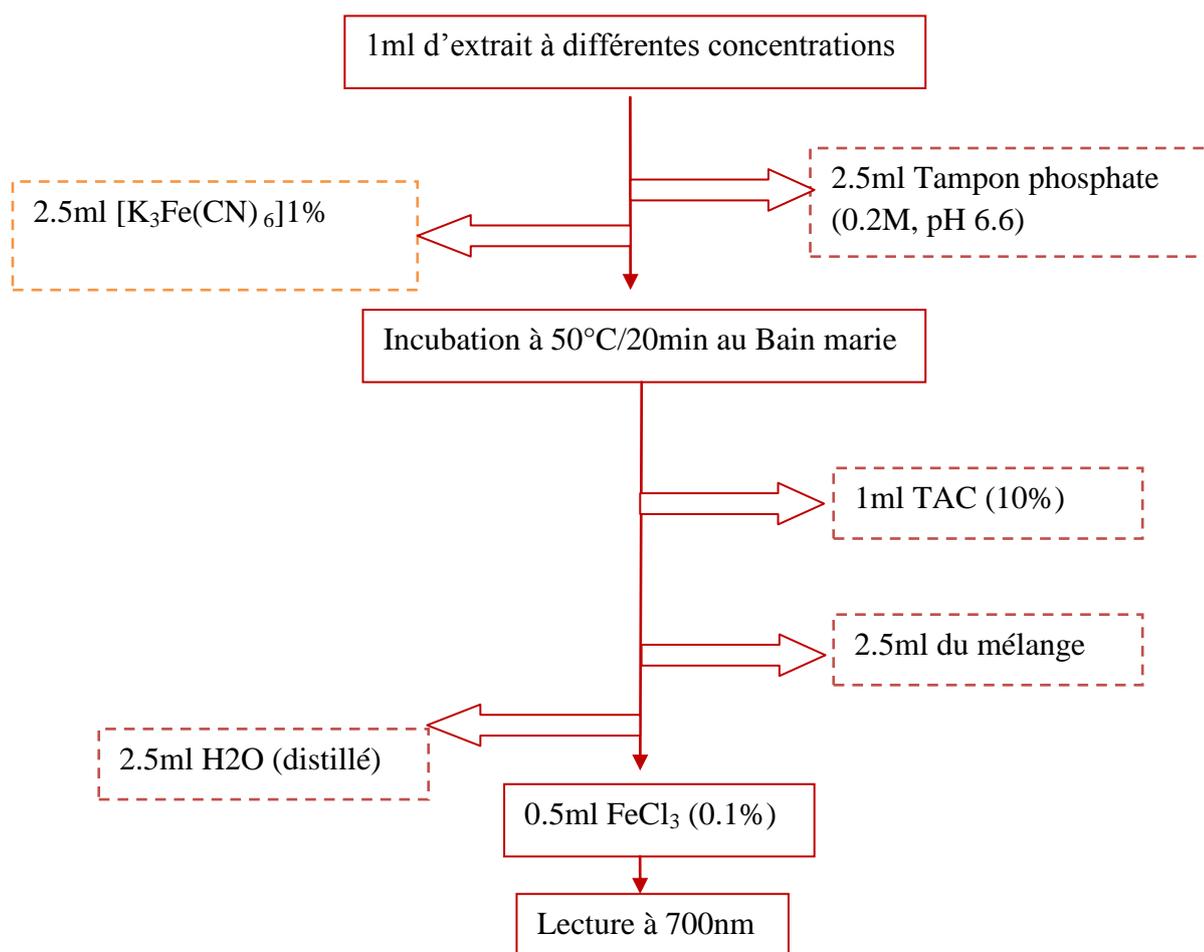
complexe donne une couleur « bleu prussien » dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Bijoy *et al.*, 2008).

b) Mode opératoire :

Le pouvoir réducteur des extraits d'*Eriobotrya japonica L.* a été déterminé selon le protocole d'Oyaizu, (1986) in Ogunlana et Ogunlana, (2008) avec quelques modifications (figure31).

c) Expression des résultats :

Pour chaque concentration, une absorbance est mesurée et les résultats sont représentés sous forme de graphique.



Figure(31) : Protocole de l'évaluation du pouvoir réducteur des extraits d'*Eriobotrya japonica L.* (Oyaizu, 1986).

Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol, et le BHA a été utilisée comme standard.

I-4-3- Evaluation de l'activité anti-radicalaire du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$:

a) Principe :

Cette méthode est basée sur la capacité des composéé phénolique à piéger le radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique).

Le radical $ABTS^{\bullet+}$ est formé par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS. En présence du Trolox (ou d'antioxydant donneur de H^{\bullet}), le radical d'azote concerné piège un H^{\bullet} , conduisant à l' $ABTSH^+$ (figure32), ce qui entraine la décoloration de la solution bleue (Djeridane et al., 2007).

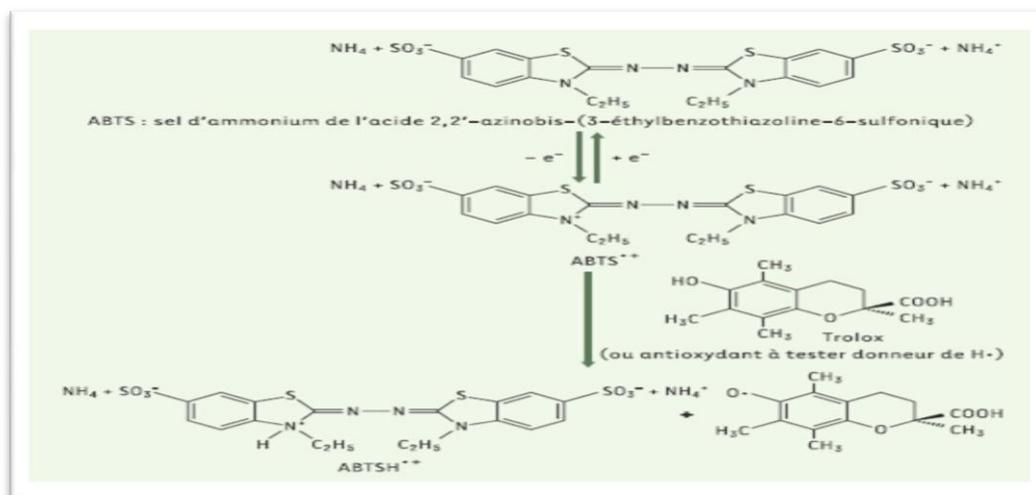
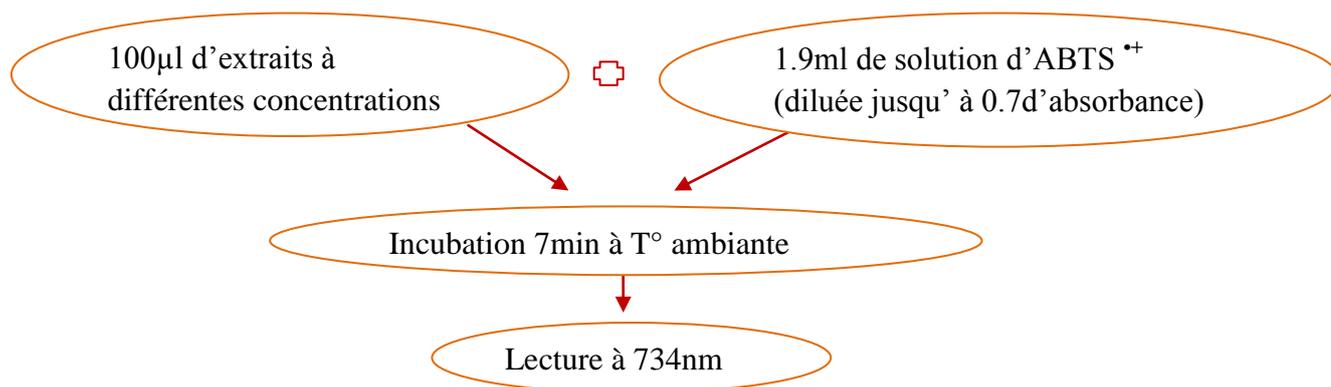


Figure (33) : Formation et piégeage de radical $ABTS^{\bullet+}$ Par un antioxydant donneur de H^{\bullet} (Marc et al., 2004).

b) Mode opératoire :

Le protocole suivi pour cette étude est celui décrit par Le et al., 2007 (figure33).



Figure(33) : Protocole de l'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits par l'ABTS^{•+} (Le et al., 2007).

c) Expression des résultats :

Le pourcentage d'activité scavenging du radical ABTS^{•+} a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire du radical-cation ABTS}^{\bullet+} = [(A_C - A_E / A_C) * 100$$

Où :

A_C : absorbance du contrôle.

A_E : absorbance du test.

I-5- Analyse statistique :

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne \pm écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel ANOVA/MANOVA. Les différences ont été considérées d'être significatives à $\alpha=0.05$. Les valeurs des IC50 ont été calculées en utilisant le logiciel origine 8.



RESULTATS
ET
DISCUSSION

II-Résultats et discussion :

II-1-Rendement de l'extraction :

Le taux d'extraction des composés phénoliques dépend de la méthode, la nature du solvant, la température et de la taille des particules constituant la poudre de la plante (Chavan et al., 2000; Goli et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2005).

Dans notre travail, afin d'obtenir des combinaisons phénoliques distinctes, une extraction liquide-solide sélective a été réalisée en utilisant quatre solvants de différentes polarités, à savoir, des solvants polaires: L'eau, l'éthanol, et des solvants apolaires tels que : L'hexane et le chloroforme. Commencer l'extraction par l'éthanol est intéressant car ce dernier représente un solvant permettant la dissolution de la majorité des composés phénoliques (Cowan, 1999).

Une fois l'extrait sec, le calcul du taux d'extraction pour chaque extrait a donné les résultats suivants (Tableau VI).

Tableau (VI) : Les pourcentages d'extraction pour chaque extrait d'*Eriobotrya japonica L.*

Extrait	Taux d'extraction(%)
Extrait éthanolique des feuilles	8.88%
Extrait organique du chloroforme des feuilles	15.33%
Extrait aqueux du chloroforme des feuilles	31.02%
Extrait organique d'hexane des feuilles	2.64%
Extrait aqueux d'hexane des feuilles	25.32%

A partir de ce tableau, nous remarquons que l'extrait éthanolique (brut) des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* a laissé apparaître un taux d'extraction appréciable comparé à d'autres plantes, ce qui nous permet de déduire la richesse de la plante en composés phytochimique.

Nous constatons également que ce sont les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane qui ont donné les taux d'extraction les plus élevés par rapport aux extraits organiques du chloroforme et d'hexane. Cette différence dans les taux d'extraction pourrait supposer la richesse des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* en composés phytochimique de polarité élevée, tel que les composés phénoliques étant donné leur richesse en groupements hydroxyles.

Une étude réalisée par **Jin et al., 2011** a montré que l'extraction éthanolique (50%), méthanolique (80%) et avec de l'eau des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L*, qui à été répétée trois fois, a laissé apparaître des taux d'extraction de 10.7 %, 8.2%et 23.7%, respectivement, qui sont proches de celui de notre extrait éthanolique.

Une autre étude effectuée par **Alshaker et al., 2011** a montré que l'extraction par l'eau bouillie de 50g de poudre des feuilles d' *Eriobotrya Japonica L* a donné une valeur de 08.93g de composés hydroxylés, ce qui confirme la richesse de la plante en composés polaires.

II-2-Dosage des composés phénoliques :

II-2-1-Dosage des phénols totaux :

Les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*, exprimées en mg équivalent acide gallique (AG)/g d'extrait, sont représentées dans la figure ci-dessous :

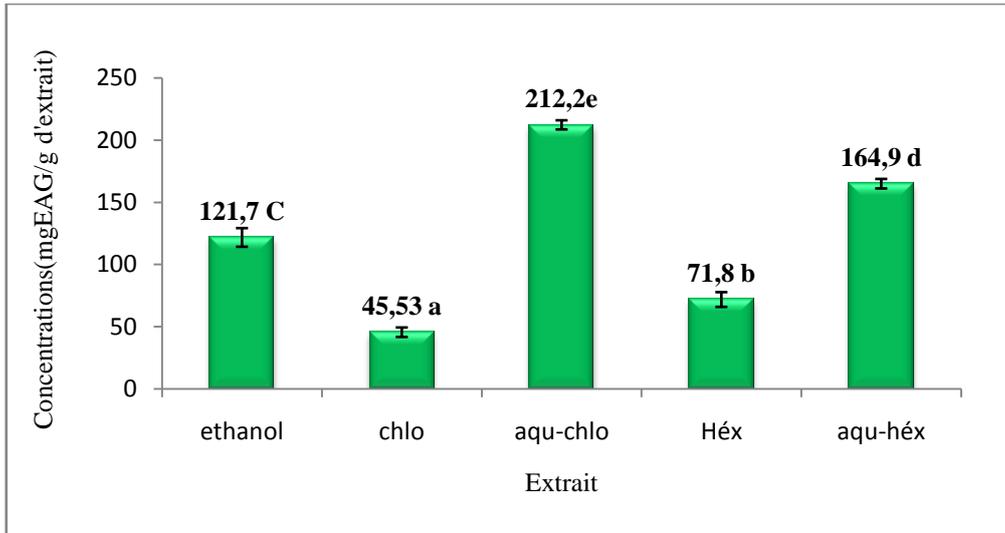


Figure (34) : Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

Si on calcule le taux en phénols totaux de l'extrait brut par rapport à un gramme de poudre, on obtient une concentration de 6.66 mg équivalent acide gallique (EAG)/ g de poudre d'*Eriobotrya Japonica L.* Ce taux nous permet de classer cette plante d'après une étude faite par **Kahkonen et al., (1999)**, qui ont montré que la quantité en phénols totaux variait beaucoup dans les plantes et qui sont classée de 0.2 à 155.3 mg EAG/g de poudre. De ce fait, *Eriobotrya Japonica L.* fait parti des plantes riches en polyphénols.

Il ne faut pas nier une constatation importante ; nous remarquons que le taux en phénols totaux dans l'extrait éthanolique (121.7mg EAG/g d'extrait \pm 7.49mg EAG/g d'extrait) est légèrement inférieur à celui des extraits aqueux du chloroforme (212.2 mg EAG/g d'extrait \pm 7.49 mg EAG/g d'extrait) et d'hexane(164,9mg EAG/g d'extrait \pm 3.82mg EAG/g d'extrait), cela pourrait être expliqué par le fait que les composés phénoliques n'ont pas été entièrement révélés par le réactif du folin-Ciocalteu dans l'extrait éthanolique car il y aurait un encombrement stérique résultant non seulement de la présence de composés phénoliques mais aussi d'autres composés appartenant à des classes de métabolites secondaires ou bien au fait qu'il se formerait des interactions moléculaire, provoquant ainsi la diminution de la quantité des

groupements réducteurs spécialement les groupements hydroxyles (Singelton et Rossi, 1965; Cicco et al., 2009).

On constate aussi que ce sont les extraits aqueux du chloroforme (212.2 EAG/g d'extrait) et aqueux d'hexane (164.9 EAG/g d'extrait) qui ont donné plus que les extraits organiques du chloroforme (45.53 EAG/g d'extrait) et organique d'hexane (71.9 EAG/g d'extrait); cela semble évident étant donné que les polyphénols constituent des composés polaires grâce à leur richesse en groupements hydroxyles, donc solubles dans les solvants polaires (Chen and Ho, 2007).

II-2-2- Dosage des flavonoïdes :

Le contenu en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.* exprimé en mg équivalent quercétine/g d'extrait, est illustré dans la (figure 35).

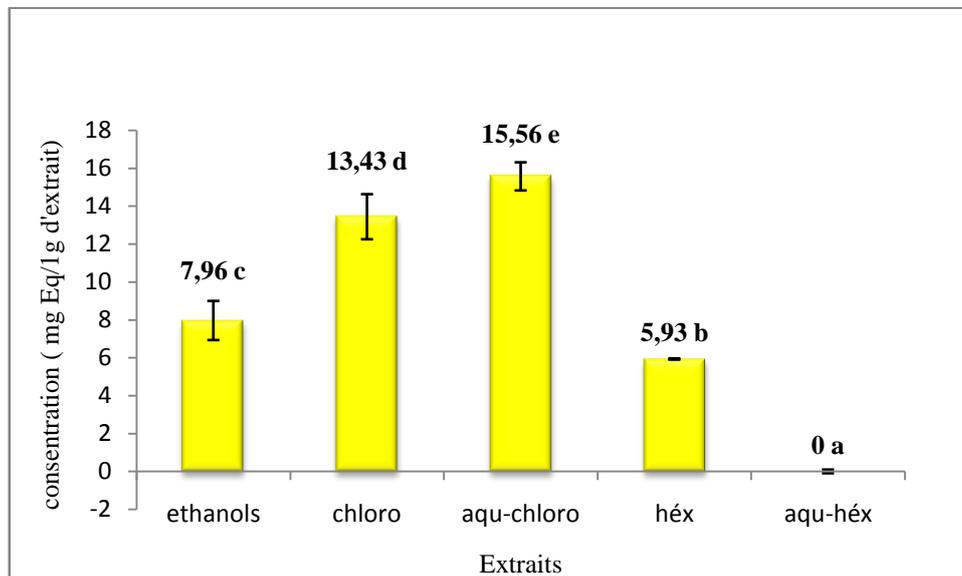


Figure (35) : Teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

La (figure35) montre qu'*Eriobotrya Japonica* possède des teneurs en flavonoïdes, appréciables de l'extrait éthanologique.

Par ailleurs, on constate, d'après les résultats obtenus, que le taux en flavonoïde est légèrement inférieur ($7.96 \pm 1.03 \text{ mg EQ/g}$) par rapport à d'autres extraits et cela dû à un encombrement stérique qui pourrait être engendré par la richesse de la plante en composés phytochimiques.

En outre, l'extrait aqueux du chloroforme a donné la concentration la plus élevée ($15.57 \text{ mg EQ/g d'extrait} \pm 0.7457 \text{ mg EQ/g d'extrait}$) par rapport à l'extrait organique du chloroforme, vu que les flavonoïdes sont de petites molécules très solubles dans les solvants polaires, grâce à leur teneur élevée en groupements hydroxyles (**Papagiannopoulos et Galensa, 2005**)

En revanche, nous remarquons que c'est l'extrait organique d'hexane qui a donné plus ($5.93 \text{ mg EQ/g d'extrait} \pm 0.03 \text{ mg EQ/g d'extrait}$) que l'extrait aqueux d'hexane ($0 \text{ mg EQ/g d'extrait} \pm 0.09 \text{ mg EQ/g d'extrait}$) ; cela serait dû au fait que les flavonoïdes se sont liés aux lipides formant ainsi des flavonoïdes apolaires se solubilisant dans l'hexane (**Machiex et al., 2005; Leray, 2010**).

II-2-3- Dosage des proanthocyanidines :

Le contenu en tanins condensés des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica* L., exprimé en mg équivalent catéchine/g d'extrait, est représenté dans l'histogramme ci-dessous :

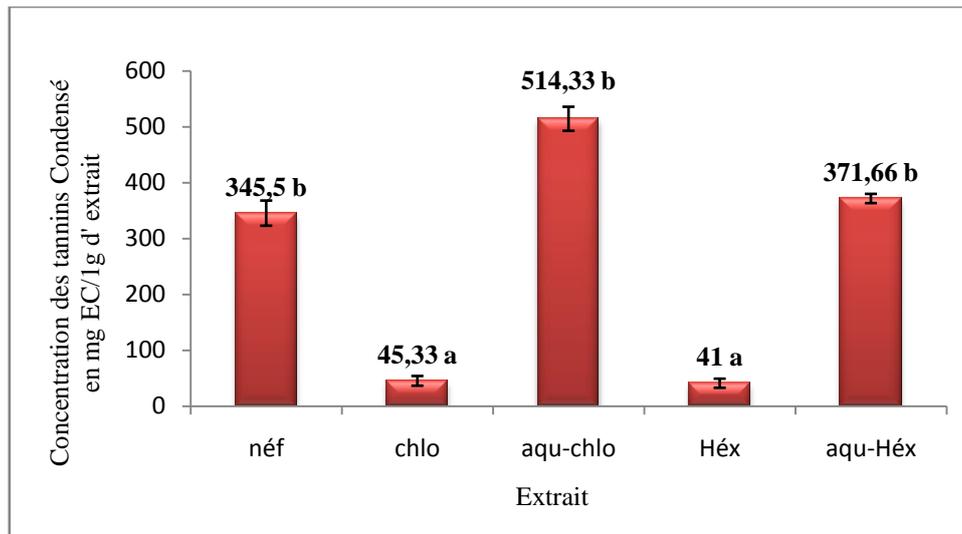


Figure (36) : Représentation graphique des quantités en proanthocyanidines dans les différents extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

Cette représentation graphique (figure 36) nous laisse déduire que notre plante reflète un taux très élevé en proanthocyanidines qui varie entre 41 ± 8.14 et 514.33 ± 21.55 mg EC/ g d' extrait.

Il est également à noter que la teneur en proanthocyanidines de l' extrait éthanolique (41 ± 8.14) est inférieure à ceux des extraits aqueux du chloroforme et d' hexane, ce la pourrait être dû à la capacité des proanthocyanidines à former des complexes avec les macromolécules, en particulier les protéines (**Gazengel-Amme et Orecchioni, 2013**).

Nous faisons remarquer également que se sont les extraits aqueux du chloroforme et d' hexane qui ont donné les teneurs plus élevées en proanthocyanidines (514.33 ± 21 mg EC/g d' extrait; 371.66 ± 8.25 mg EC/g d' extrait) par rapport aux extraits organique correspondants, cela serait dû au fait que les proanthocyanidines constituent des polymères riches en groupements hydroxyles (**Descheemaeker, 2004**).

II-3-Activité antioxydantes d'*Eriobotrya japonica* L.

II-3-1-Activité scavenging du radical DPPH[•] :

La figure 37 représente les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical DPPH[•], Des standards et des extraits exprimés en pourcentages

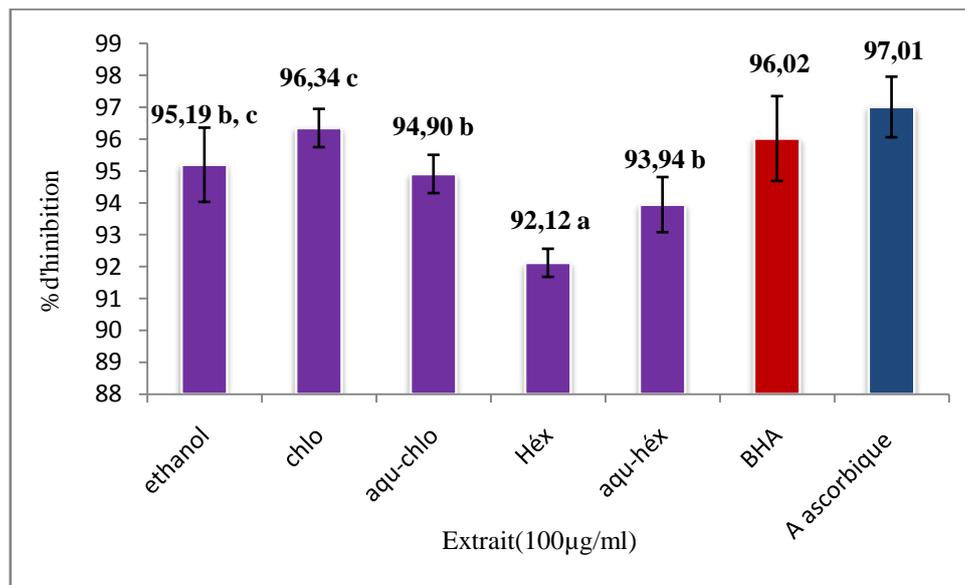


Figure (37) : Activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits d'*Eriobotrya Japonica* et des standards (BHA et l'acide ascorbique).

Une vue d'ensemble de la représentation graphique nous laisse déduire que tous les extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica* L. ont exhibé une très forte activité scavenging du radical DPPH[•] (92.12%±0.44% à 96.34%±0.59%) à 100µg/ml comparativement aux pourcentages d'inhibition montrés par les standards utilisés, à savoir, la BHA et l'acide ascorbique qui ont donné, respectivement, 96.02%±1.33% et 97.01%±0.95% ; cela serait dû à la richesse des feuilles de la plante en composés phénoliques pourvus en groupements hydroxyles donateurs d'hydrogènes et d'électrons (Ojeil et al., 2010; Jung et al., 1999).

Une étude a été effectuée par Kim et al., 2011, ces derniers ont trouvé que l'extrait éthanolique d'*Eriobotrya Japonica* L. a inhibé la formation du radical

DPPH• avec un pourcentage d'inhibition d'environ 40% à une concentration de 100µg/ml.

➤ **Détermination des IC₅₀ :**

Le paramètre IC₅₀ (Concentration inhibitrice à 50%) ou EC50 (Efficient concentration) est défini comme étant la concentration du substrat qui induit une perte de 50% de l'activité, les IC50 de l'activité du DPPH sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs les plus faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (**Molyneux, 2004**).

Une vue d'ensemble de la figure n°39 qui présente l'activité anti-radicalaire vis à vis du radical DPPH•, de l'extrait organique du chloroforme des feuilles de la plante, nous permet de constater que l'activité anti-radicalaire augmente en fonction de la concentration de l'extrait, plus la concentration est élevée plus le pourcentage d'inhibition augmente.

Notre échantillon a donné une valeur de l'IC₅₀=14.03ug/ml qui est légèrement supérieur a celles des standards utilisés : la BHA et l'acide ascorbique qui ont respectivement des IC₅₀ égales à 0.98µg/ml et IC50=1.61µg/ml (figures 38 et 39).

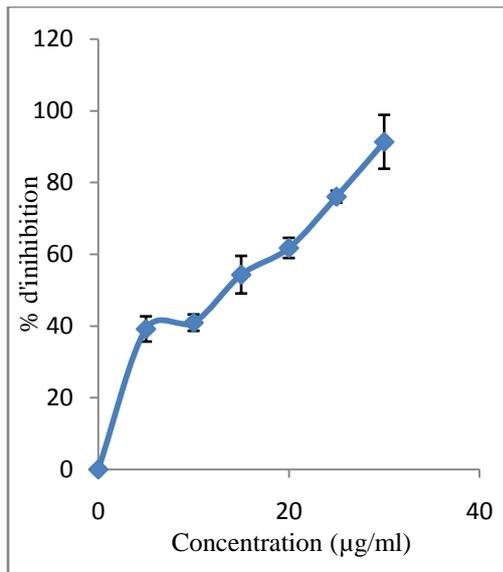


Figure (38) : Activité scavenging du radical DPPH• à différentes concentration de l'extrait aqueux du chloroforme d'*Eriobotrya Japonica L.*

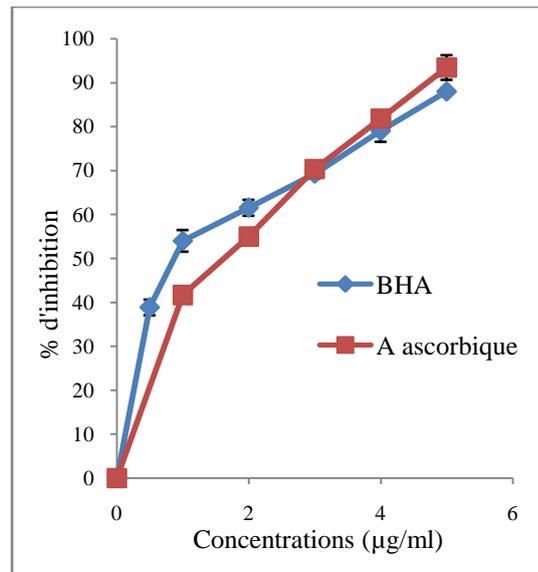


Figure (39) : Activité scavenging du radical DPPH• à différentes concentration de l'acide ascorbique et de la BHA.

II-3-2- Le pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur d'une substance peut être défini par sa capacité à transférer un électron ou de donner un atome d'hydrogène. Dans cet essai, le potentiel réducteur est mesuré par la transformation du ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) en forme ferreuse (Fe^{2+}) qui se traduit par une coloration vert-bleuâtre.

Les figures ci-dessous représentent le pouvoir réducteur des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.* et celui de l'antioxydant de synthèse (la BHA).

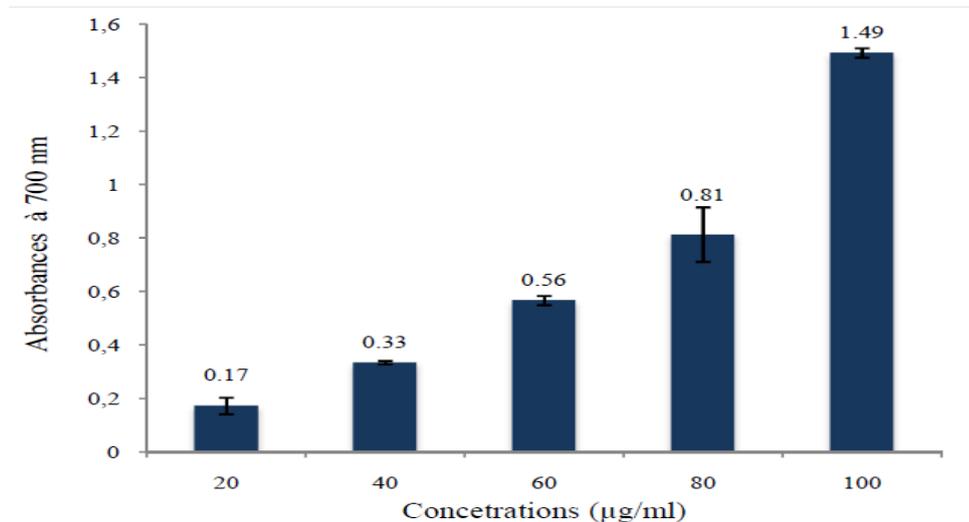


Figure (40) : Pouvoir réducteur de l'antioxydant de synthèse la BHA.

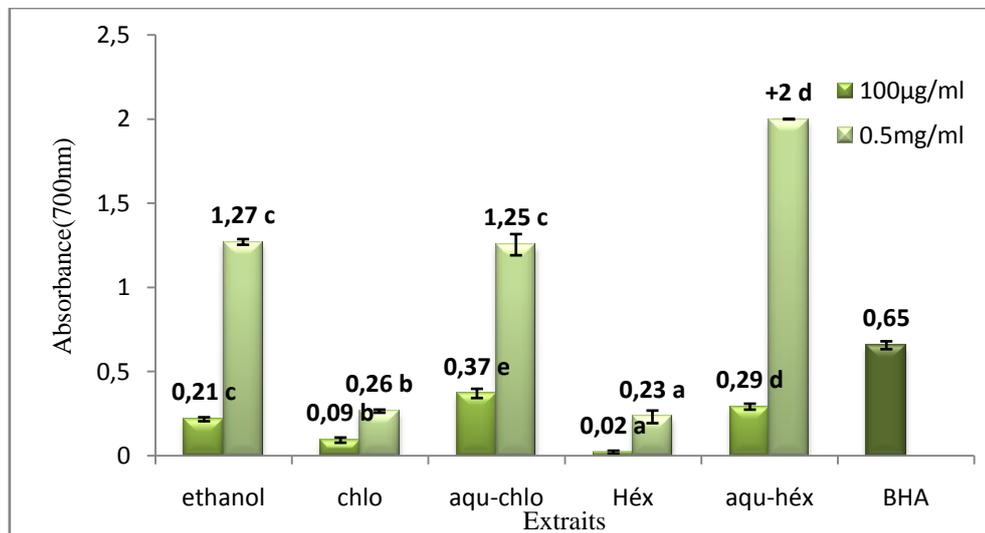


Figure (41) : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.* et de la BHA.

Une vue d'ensemble de ces résultats, nous permet de constater que tous les extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.* ont montré une activité réductrice appréciable, allant de $0.02\% \pm 0.01\%$ à $0.37\% \pm 0.01\%$ comparativement au standard utilisé (BHA) qui a donné un pourcentage d'inhibition de $0.65\% \pm 0.02\%$ à $100\mu\text{g/ml}$. Par contre, on constate une forte activité réductrice, allant de $0.23\% \pm 0.03\%$ à $+2\%$ à $500\mu\text{g/ml}$.

Aussi, nous faisons remarquer que c'est l'extrait aqueux d'hexane qui a donné le plus grand pourcentage d'inhibition par rapport à l'extrait éthanolique pour les deux concentrations ($100\mu\text{g/ml}$ et $500\mu\text{g/ml}$), cela pourrait être expliqué par la

richesse de la plante en composés phytochimiques qui engendrent un encombrement stérique (Yang *et al.*, 2013).

On constate également, que se sont les extraits aqueux d'hexane ($0.29\% \pm 0.02\%$; $+2\%$) et aqueux du chloroforme ($0.37\% \pm 0.02\%$; $1.25\% \pm 0.06\%$) pour les deux concentrations ($100\mu\text{g/ml}$ et $500\mu\text{g/ml}$) respectivement, qui ont donné des valeurs d'inhibition supérieures à celles des extraits organiques d'hexane ($0.02\% \pm 0.01\%$; $0.23\% \pm 0.03\%$) et du chloroforme ($0.09\% \pm 0.01\%$; $0.26\% \pm 0.01\%$) ; cela serait dû à la richesse des extraits aqueux en tannins condensés et en phénols totaux qui sont riches en Groupements hydroxyle donateurs d'hydrogènes et d'électrons.

En effet, il existe une forte corrélation positive entre le pouvoir réducteur et les teneurs en phénols totaux ($R=0.94$ à $100\mu\text{g/ml}$ et $R=0.79$ à $500\mu\text{g/ml}$), et les concentrations en tannins condensés ($R=0.97$ à $100\mu\text{g/ml}$ et $R=0.83$ à $50\mu\text{g/ml}$) des extraits.

II-3-3- Activité scavenging du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$:

Les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, du standard et des extraits sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés dans la figure 42.

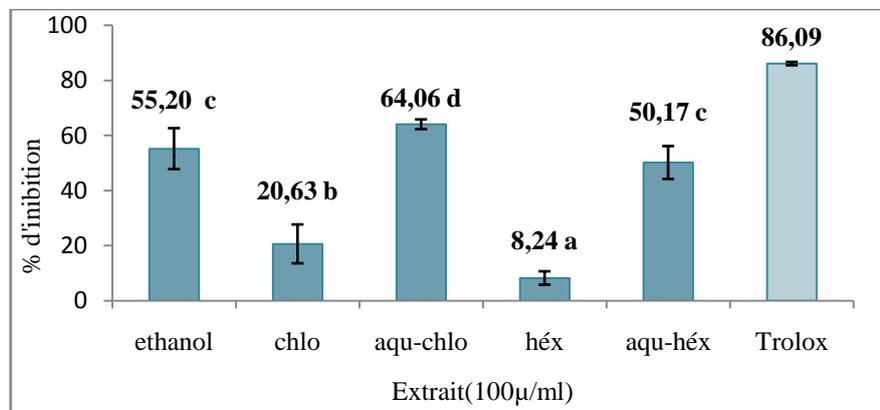


Figure (42) : Activité inhibitrice du radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ par les extraits d'*Eriobotrya Japonica L* et des standard.

D'après ces résultats, nous remarquons que tous les extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.* ont montré une forte activité scavenging du radical ABTS^{•+}, allant de 8.24%±2.34% à 64.06%±1.77% comparativement au standard utilisé (Trolox) qui a donné un pourcentage d'inhibition de 86.09%±0.06% à 100µg/ml.

Aussi, nous faisons remarquer que c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a donné le plus grand pourcentage d'inhibition par rapport à l'extrait éthanolique, cela pourrait être expliqué par la richesse de la plante en composés phytochimiques qui engendrent un encombrement stérique.

En outre, les extraits aqueux du chloroforme (64.06%± 1.77%) et aqueux d'hexane (50.17%±5.97%), ont exhibé des pourcentage d'inhibition supérieures à ceux des extraits organiques du chloroforme (20.63%±7.06%) et d'hexane (08.24%±2.34%) à 100µg/ml, et cela serait dû à la richesse des extraits aqueux en tannins condensés et en phénols totaux qui sont riche en Groupements hydroxyle donneurs d'hydrogènes et d'électrons. (Alshaker et al., 2011; Hideyuki et al., 2000).

En effet, il existe une bonne corrélation positive entre l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} et les phénols totaux (R=0.87), et les tannins condensés (R=0.97).

➤ **Détermination des IC₅₀ :**

Les figures représentées ci-dessous montrent l'évolution du pourcentage d'inhibition d'ABTS^{•+} en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.* et celles du standard (Trolox), respectivement.

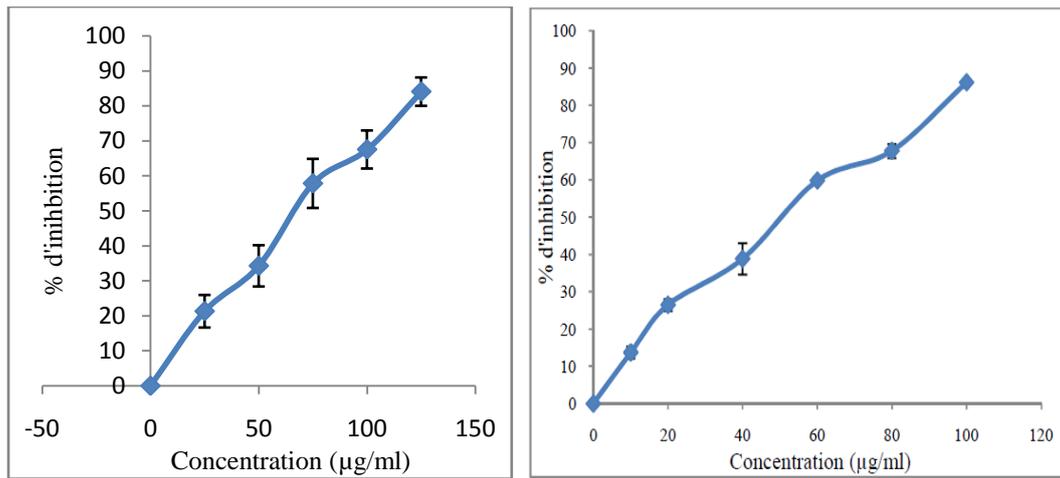


Figure (43) : Activité scavenging du radical $ABTS^{++}$ à différentes concentration des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* et celles du standard Trolox.

On note également que notre échantillon a donné une valeur de l' $IC_{50}=67.60\mu g/ml$ qui est voisine de celle du standard Trolox ($IC_{50}=50.18\mu g/ml$). Ceci confirme la forte activité scavenging du radical $ABTS^{++}$ d'*Eriobotrya Japonica L*.

Finalement, d'après les résultats obtenus concernant les trois testes antioxydants (pouvoir réducteur, DPPH, ABTS), nous concluons que les feuilles d'*Eriobotrya Japonica* sont douées d'une forte activité antioxydante.



CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Eriobotrya Japonica L est une plante très répandue dans la zone méditerranéenne et vu son utilisation locale comme plante médicinale, elle présente un grand intérêt pharmacologique. Notre étude réalisée sur les feuilles d'*Eriobotrya japonica L* nous a permis d'aboutir aux résultats suivants :

A partir des résultats d'extraction nous constatant que l'extrait éthanolique a donné un taux d'extraction appréciable, ce qui montre la richesse des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* en composés phytochimique. En outre se sont les extraits aqueux qui ont donné les pourcentages d'extraction les plus élevés par rapport aux extraits organiques ; cela pourrait supposer la richesse de la plante en composés phytochimiques de polarité élevée, dont les composés phénoliques étant donné leur richesse en groupement hydroxyle.

- Les résultats des dosages des composés phénoliques montrent que les phases aqueuses ont donné les teneurs les plus élevées en phénols totaux, proanthocyanidines et en flavonoïdes, étant donné que les composés phénoliques sont riches en groupements hydroxyles, ce qui leur confère un caractère hydrophile.
- En ce qui concerne les activités anti-radicalaires, tous les extraits des feuilles de la plante ont montré une forte activité scavenging du radical DPPH• (92.12%±0.44% à 96.34%±0.59%) à 100µg/ml.
- Par ailleurs, le pouvoir réducteur et l'activité scavenging du radical ABTS•+ des feuilles de la plante ont été forts comparativement aux standards utilisés.
- En fin, l'activité antioxydant peut être attribuée à la présence des polyphénols dans les extraits, les résultats indiquent une forte corrélation entre les activités antioxydantes testées et les composés phénoliques suggérant que les composés phénoliques sont probablement responsables de cette activité.

Ce travail nous a permis d'avoir un aperçu général sur les teneurs en composés phénoliques, la nature biochimique et l'activité antioxydante des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

Par ailleurs, il serait très intéressant d'aller plus loin en essayant de réaliser ces tests antioxydants *in vivo* afin d'étudier l'efficacité et la toxicité des extraits ou des constituants biochimiques isolés; aussi bien que de s'investir dans d'autres parties de la plante à savoir, les fleurs, les graines et l'écorce.



*Références
bibliographiques*

Reference bibliographique

- Abdou Bouda, A., Njintang, N.Y., Scher, J and Mbofung C.M.F. (2010).phenolic compounds and radical scavenging potential of wenty cameroonain spices. *Agriculture and biology journal of nothamerica*, **1**(3):213-224.
- Adjélé, W et Leyli, S. (2003).les radicaux libres : une question d'équilibre. *John Libbey Eurotext*, paris.
- Afonso, V., Champy, A., Mitrovic, D., Collin et Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales ; *Revue du.74* : 636–643.
- Alain, F. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*: 108-115.
- Alshaker, H., Qinna, N., Qadan, F., Bustami, M and Matalka1, K.-Z. (2011). Eriobotrya japonica hydrophilic extract modulates cytokines in normal tissues, in the tumor of Meth-A-fibrosarcoma bearing mice, and enhances their survival time. *BMC Complementary and Alternative Medicine*: 11:9.
- Amarenco, P., Cacoub, P., Drouet, L et Vahanian, A. (2001).Athérombose. *John Libbey Eurotext*, paris : 66-67.
- Amiard, J.-C. (2013).Le risque radioactif : Devenir des radionucléides dans l'environnement et impacts sur la santé. *Lavoisier*.
- Athamena, S., Chalghen, I., Kassah-Laroui, S et Khebri, S. (2010). Activité antioxydants et antimicrobienne d'extraits de *cunimum cyaminum L. Lebanese Science Journal*, **11**(1) : 69-79.

- **B**arouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Université René Descartes France et Service de biochimie (thèse)*, Paris, **22** : 266-72.
- Baudin, B. (2006). stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio*. Paris, **2**(1), 43-52.
- Beaudoux, J.-L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A et Peynet, J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, **21** : 44–150.
- Belyagoubi, N. (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. *Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen*.
- Besançon, P., Debosque, S., Delpeuch, F., Descomps, B., Jerber, M., Léger, C.-L., Padilla, M et Puygrenier, M. (2000). Alimentation méditerranéenne et santé. *Johm hibbey eurotext*, paris : 65.
- Bijio, M., Jayati, S et Parabir, K.S. (2008). Antioxidant activities of soybean as affected by bacillus-fermentation to kinema. *Food research international*, **41**:586-593.
- Bizot, N et Charpentier, J.P. (2006). méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forstier. *INRA-amélioration, génétique et physiologique forestières*, laboratoire d'analyse biochimiques.
- Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudoux, J.-L., Théron, P., Legrand, A et Delattre, J. (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16** : 260–267.
- Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudoux, J.-L., Théron, p., Legrand, A et Delattre, J. (2007). stress oxydant et vieillissement. *Spectra biologie*, Paris, 23-25.

- Bougandoura, N et Bendimerad, N. (2012).évaluation de l'activité antioxydante des extrait aqueux et méthanolique de *Saturja Calmintha SSP*. Napeta(L) Briq.Nture et Thecnologie, Algérie.
- Brozozowaska, J et Hanower, P. (1976).Sur les composes phénoliques des végétaux et leur rapport avec un defficit hydrique chez des cotonniers. Annales de l'université d'Abidjan, série C (sciences), XII.
- Bruneton, J. (2009).Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. *Lavoisier*, 367-420.
- **C**halaka, L., Abir, N., Youssef, H and Hamadehb, B. (2014). Diversity of loquats (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivated in Lebanon as assessed by morphological traits. Corresponding author at: Faculty of Agronomy, *Lebanese University, Dekwaneh, Beirut, Lebanon Scientia Horticulturae*, **167**: 135–144.
- Charles, M et Benbrook, P.-D. (2005).Accroitre la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Organic Center for éducation et promotion: 6.
- Chavan, U.-D., Shahidi, F and Naczk, M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Larthyrus maritumus L.*) as affected by different solvants . *Food Chemistry*, **75**: 509-512.
- Chen, J and Li, W.-L. (2008). Progress in studie on phytochemistry and biological activity. Global science books: 18-22.
- Chen,C.-W and Ho, C.-T.(2007). Antioxidant properties of polyphénols extracted frome green and black teas. *Journal of food lipids*, **2**(1): 35-46.
- Chiang, H.C., Lo, Y.J and Lu, F.J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of alsophilaspinulosa (Hook) tryon. *Enzyme inhibition*, **8**(1):61-71.

- Cillard, J et Cillard, P. (2006).Mécanisme de la peroxydation lipidique et des antioxydations.OCL, **13** :24-29
- Claude, D. (2010). L'année du néflier *Mespilus germanica* ; service public de walloraie direction générale agriculture. Ressources naturelles et environnement ; avenue prince de liège : 15-5100.
- Collin, S et Grouzet, J. (2011). Polyphénols et procédés. Lavoisier :1-333.
- Cowan, M.-M. (1999).Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* : 564-582.
- Cuevasa, J., Salvador-Solaa, F.-J., Gavila, N., Lorenteb, N., Huesob, J.-J and Gonza^lez-Padiernab, C.-M. (2003). Loquat fruit sink strength and growth pattern; *Scientia Horticulturae* **98**,131–137.
- Cuevas,J., Canete,M.-L., Pinillos,V.,Zapata,A.-J., Fernadez,M.-D.,Gonzalez,M and Hueso, J.-J.(2007).Optimal dates for regulated deficit irrigation in ‘Algerie’ loquat (*Eriobotrya japonica Lindl.*) cultivated in southeast Spain. *Agricultural Water Management*, **89**:131-136.
- Curtay, J.-P et Robin, J.-M. (2000).Intérêt des complexes antioxydants, Nutrithérapie Info :1-15.
- **D**efraigne, J.-O et Pincemail, J. (2007). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités ; *Rev Med Liege*, **4** (62) :1-8.
- De Reynal, B et Multon J.- L. (2009). Aditifs et auxiliaire de fabrication dans les industries agroalimentaires. *Lavoisier*: 190.
- Descheemmaeker, K. (2004).nutri-et phétothérapie.*Garant editeurs*: 43.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Leasgards, J.F and Stocker, P. (2007).Screenig of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European food research and technology*, **224**:801-809.

- **E**dward, F., Gilman, J.-W and Dennis, J.-W. (1993). *Eriobotrya japonica* Loquat. Fact Sheet ST-235: 1-3.
- Ercisli, S., Gozlekcib, S., Sengulc, S., Hegedusd, A and Tepee, S. (2012). Some physicochemical characteristics, bioactive content and antioxidant capacity of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) Fruits from Turkey. *Scientia Horticulturae*, **148**: 185–189.
- Er-Na, L., Guo-Dong, Z and Ling-Yi, k. (2009). Chemical constituents from the leaves of *Eriobotrya Japonica*. *Chin J Nat Med*, **7**(3):190-192.
- **F**rénót, M et Veiling, E. (2001). biochimie des aliments diététique du sujet bien portant. *Biosciences et techniques*, 4012
- Fuinel, G. (2002). *Plantes de vie*. Fernand Lanore.
- **G**ardés-Albert, M ; Bonnefont-Rousselot, D ; Abedinzadeh, Z et Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *Mécanismes biochimiques* : 91-95.
- Garrett, R.-H et Grisham, C.-M. (2000). *Biochimie. De boeck Université* : 599.
- Gazengel-Amme, J.-M et Orecchioni, M. (2013). *Le préparateur en pharmacie. Lavoisier*. Paris.
- Gharahari, A.S., Yavaril, A.R and Khanali, M. (2009). Masse and volume modeling of loquat (*Eriobotrya japonica* LINDL) fruit based on physical charistics. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*,. **17** (2):175-189.
- Gilman, E.- F and Watson, D.- G. (1993). *Eriobotrya japonica* Loquat; Fact Sheet **235**: 1-3

- Goli, A.-H., Barzegar, M and Sahari, M.-A. (2004) Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (pistachia vera) hull extracts. *Food Chemistry*, **92**:521-525.
- Goudable, J et Alin,F. (1997).Radicaux libres oxygénés et antioxydant. *Nutr Clin Métabol*, **11** :115-119.
- Goussard, J.-p. (1999).Les radicaux libres et antioxydants. *Denis riche in guide nutritionnel des sports d'endurance* : 2-10.
- Guichardin, M., Bacot, S., Molière, P et Lagarde, M. (2006).Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *Louis Pasteur*, **13**(1).
- Guillaume, J. (2010).Ils ont domestique plantes et animaux. *Quae*, 456: 369.
- **H**ambaba, L., Boudjellal, K., Abdeddaim, M., Aberkane, M.C et Boudiaf, K. (2012).Etude in vitro des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du fruit d'Elaeagnus angustifolia L. pharmacognosie, *Springer-Verlag*:1-4.
- Harrison, M. (2009). Flow ering shrubs and small trees for the south. *Copyright*: 150.
- Hemalatha, S., Lalitha, P and Arulpriya, P. (2010). Antioxidants activities of the extracts of the aerial roots of pothosaurea (linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, **2**(6):84-89.
- Heut, O et Duranteau, J. (2008).Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libre. *Réanimation*, **17** :387-392.
- Hideyuki, I., Eri, K., Yoshie, T., Shu-Hua, L., Tsutomu, H., Hiroshi, S., Kaoru, K., Kazue, S., Daigo, S ., Susumu, S., Yoshio, I and Takashi, Y. (2000). Polyphenols from Eriobotrya japonica and their cytotoxicity against Human Oral Tumor Cell Lines, *Chem.Pharm.Bull*, **48**(5):687-693

- Huang, Y., Jun, L., Qi, C., Shi-Chun, Y., Xiong-Wen, L., Yong, J., Lei, Z., Yu-Hong, Z and Jin-Fang, G. (2006). Anti-oxidative effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) *Life Sciences*, **78**, 2749 – 2757.
- Hubochinsky, B. (2000). *Biochimie Garrett*. Grisham; Boeck université S.a. All rights reserved, [http:// WWW.deboeck.be](http://WWW.deboeck.be) .
- Hui-ya, H., Kuang-yao, L., Wen-chuan, L., Susumu, K and Jin-bin, W. (2010). Regulation and improvement of triterpene formation in plant cultured cells of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **110**(5), 588–592.
- **J**arrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M H et jourmet, M. (1995). nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion. INRA, paris : PAGE.
- Jin, O., Min, O.-J., Hyeon, A. - K., Kim, J.-K, Hum, Y.-B, Dong, Y.-R. (2011). Effect of *Eriobotrya japonica* on Adipogenesis and Body Weight. Corresponding author; *J. Korean Soc. Appl. Biol, Chem*, **54** (3): 382-387.
- Jung, H.-A., Park, J.-C, Chung, H.-Y, Kim, J and choi, J.-S.(1999). Antioxidant Flavonoides and chlorogenic acid from the leaves of *Eriobotrya Japonica* L., *Arch Pharm Res*, **22** (2): 213-218.
- Junko, Y. (2007).Gastroprotective activity of *Eriobotrya japonica* seed extrait on experimentally induced gastric lesions in rats, the japanese society of pharmacognosy and springer.
- **K**ahkonen, M.-P., Hopta, A.-I., Vuorela, H.-J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujaia, T.-S and Heinonen, M. (1999). Antioxidant acivity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**47**(10): 3954-3962.

- Kazunori K., Matsuoka A., Kyoich O., Yung-Sheng H. (2007). Effect of loquat (*Eriobotrya japonica*) extracts on LDL oxidation. *Food Chemistry*, **104**:308–316.
- Kim, M.-J ., Lee, J ., Song, A.-R ., Lee, A.-R., Kim, Y.-J., Baek, H.-Y., Jun, W.-J et Yoon, H.-G.(2011).Neuroprotective effects of *Eriobotrya Japonica* againts β -amyloide-induced oxydative stress and memory impairment. *Food and chemical Toxicology*, **49**:780-784.
- Kirkham, P et Rahman, I. (2006).Oxydative stress in asthma and COPD: Antioxidants as therapeutic strategy.pharmacology et therapeutics, **111**:476-494.
- Kirkmane, H.-N and Gaetani, G.-F. (1984). Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH.*Proc.Natl.Acad.Sce*, **81**:4343-4347.
- Koechlin-Ramanatxo, C. (2006).oxygène, stress oxydant et supplémentsations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20** :165-177.
- **L**acolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Chaleh, B., Loirand, G., Pinet, F et Samuel, J.-L.(2007).Biologie et Pathologie du Cœur et des Vaisseaux. *John Libbey Eurotext*, 666 :468.
- Laguerre, M; Lecomte, J et Villeneuve, P. (2007).Evaluation of the ability of antioxydants to counteract lipid oxidation: *Progress in lipid research*, **46**:244-282.
- Laguerre, M., Lopez-Giraldo, L.-J., Lecomte., Pina, M et Villeneuve, P. (2007).Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *CIRAD*, Laboratoire de lipotechnie,**14** (5).
- Laville, E. (1994). La protection des fruits tropicaux après récolte. *Cirad*: 169.
- Leray, C. (2010). Les lipides dans le monde vivants, *Lavoisier* : 308.
- Leverve, X. (1999).stress oxydant et antioxydants ?. *Institut national de la recherche agronomique* : 1-6.

- Lim, T.-K. (2012). Eriobotrya japonica. *Edible Medicinal Plants*, **14**:381.

- Macheix, J.-J., Fleuriet, A et Jay-Allemand, C. (2005). Ammie fleuriet christian jay-Allemand, les composés métaboliques des végétaux ; un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romande*

- Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M et Fritsch, P.(2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medicine/ science*, **20**(4) : 458-463.

- Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de desides. *Thèse de docteur, université de limoges*.

- Margaille, I., Plotkine, M et Lerouet, D. (2005). Antioxidant strategies in the treatment of stroke, *Université René Descartes*, **39**: 429 – 443.

- Martin, S et Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie ; Pharmacologie et physico-chimie des interactions cellulaires et moléculaires*, **51** : 304–315.

- Massion, P., Preiser, J.-M et Balligand, J.-L.(2002). Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères ? *Nutrition chimique et métabolisme*, **16** :248-252.

- Mendozalopez, M.-R., Agular A.L et Guzman A.L. (2004). El cultivo del nispero Eriobotrya japonica. Une alternative de production fruticola. *Institution national d'investigations forestales*.

- Mette, M.- B. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. Mise au point. *Nutrition clinique et métabolisme*, Suisse, **20** : 48–53.

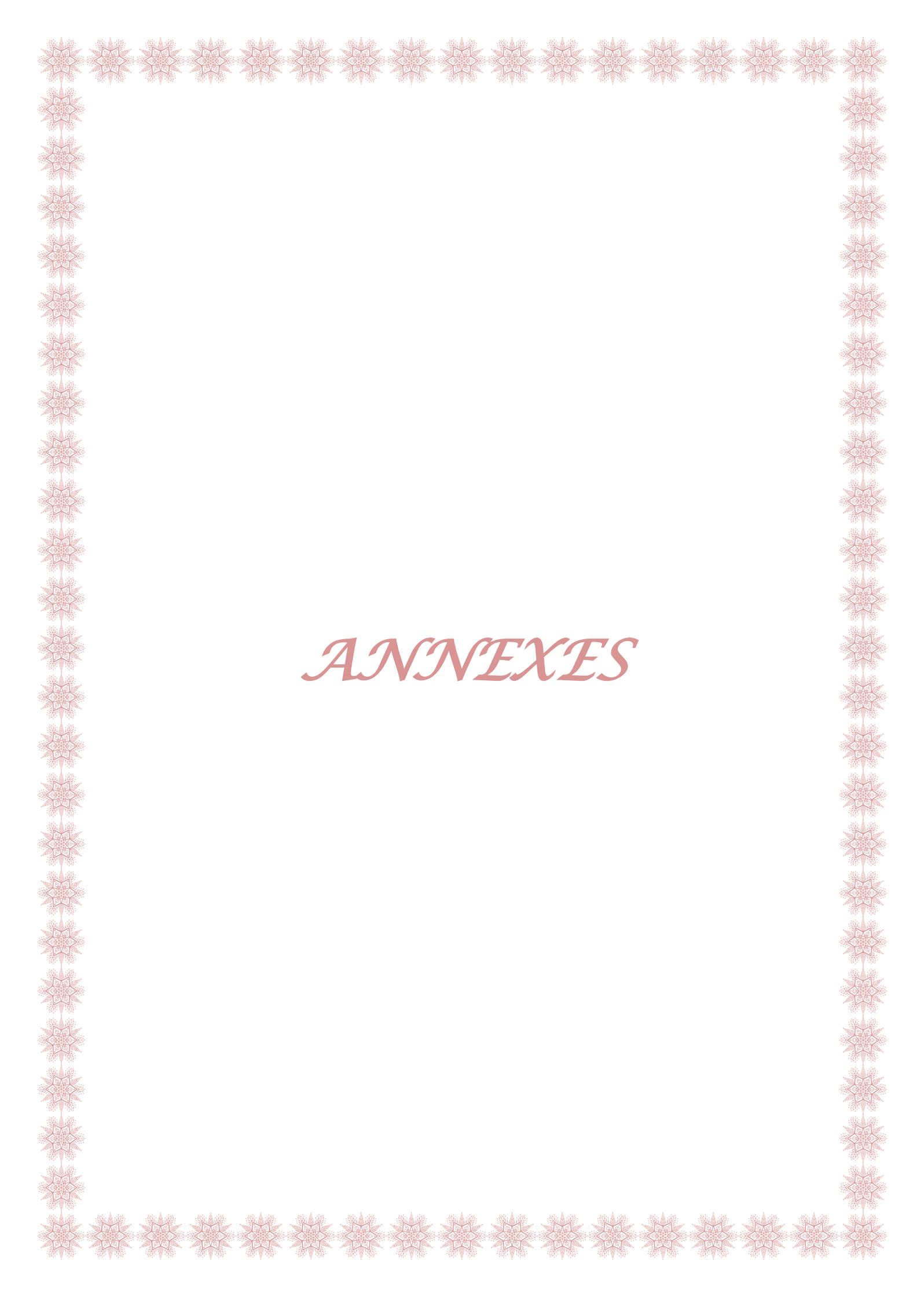
- Michel, F., Bionnefont-Rousselot, D., Mas, E., Drai, J et thérond, P. (2008).Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : *aspects analytiques. Ann biol clin*, **66** (6) :605-619.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidants activity. *Songklanakarin J.sci. Technol*, **26** (2):211-219.
- Motamed, B et Texier, H.(1999).sources et caractéristiques des composés phénoliques dans l'estuaire de la seine.*Oceanologica Acta* ;**23** : 167-174.
- Mukhopadhyay, S., Luthria, D.-L and Robbins, R.(2005). Optimisation of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86** (1): 156-162.
- **N**abih Rashed K and Butnariu M. (2014). Isolation and Antimicrobial and Antioxidant Evaluation of Bio-Active Compounds from *Eriobotrya Japonica* Stems. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **4** (1): 75-81.
- Nakatsubo, F., Enokita, K., Yonemori, K., Sungiura, A., Utsunomiya, N and Subhadrabandhu, S. (2002).Chemical structures of the condensed tannins in the fruits of diospyrosspecies. *J. Wood Sci*, **48**: 414-418.
- Niska, R., Goldway, M and Schneider,D.(2010). S6-RNase Is a Marker for Self-Compatibility in Loquat (*Eriobotrya japonica Lindl*). *HortScience*, **45**(8):1146-1149.
- **O**dile, J et Pastre, C. (2005).intérêt de la suppléments en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat université de Paul-Sabatier de Toulouse : 1-120.
- Ogunlana, O.-E and Ogunlana, O.-O. (2008).In vitro assessment of antioxidants activity of newbouldialaevis. *Journal of medicinal plants research*, **2** (8):176-179.

- Ojeil, A ., El Darra, N ., El Hajj, Y ., Bou Mouncef, B ., Jrizk, T et Gmaroun, R. (2010).Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin château ksara. *Lebanese Science Journal*, **11**(2):117-131.
- Olivier, S. (2004).Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? .C. R. Biologies; Clinique de dermatologie, **327**: 649–662.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R et Simons, A. (2009).Eriobotrya japonica; *Agroforestry Database*,**4** : 1-5.
- Oyedemi, S.O and Afolayan, A.j. (2011).In vitro and in vivo antioxydants activity of aqueous leaves extract of leonotis (L) R.B.*International journal of pharmacology*, **7**(2):248-256.
- **P**apagiannopoulos, M and Galensa, R. (2005). Increased retention of polar flavonoids in RP-HPLC on a polaris amide C18 column. *Application Food*: 12-13.
- Paris, R et Dillemann, G. (1960). Les plantes médicinales des régions arides. Unesco, paris-7:80.
- Pelli, K et Lyly, M. (2003).Les antioxydants dans l'alimentation .Institut National de la recherche agronomique : 1-27.
- Pesson, P et Touveaux, J. (1984). Pollinisation et production végétales : 667.
- Pichard, G et Ronlland, B. (2009). Guide des plantes indicatrices des milieux forestiers bretons. *CRPF Bretagne* : 22-40.
- Pincemail, J ., Meurisse, M ., Limet, R et Defraigne, J.-O. (1998).Mesure et utilisation des antioxydants en médecine. *humaine.Medi Sphere*.
- Pincemail, J ., Meurisse, M ., Limet, R et Defraigne, J.- O. (1999).L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin.*Vaisseau, Cœur, Poumons*, **4**.

- Pincemail, J., Limet, R et Defraigne, J O. (2001).Stress oxydant et transmission cellulaire : implication dans le développement du cancer. *Medi Sphere*.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K et Defraigne, J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16** : 233–239.
- **Q**a'dan, F., Versopohl, E.-J., Nahrsted, A., Petereit et Matalka, Kh.-Z. (2009).Cinchonain Ib isolated from Eriobotrya Japonica induces insulin secretion in vitro and in vivo. *Journal of ethnopharmacology*, **124**:224-227.
- **R**adicella, J.-P., Douki, T., Ravanat, J.-L. (2009).Toxicologie nucléaire environnementale et humaine. *Lavoisier* : 626-179.
- Ré, D.-B., Nafia, I., Nieoullon, A., Kerkerian Le Goff, L et Had-Aissouni, L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *chemin Joseph-Aiguier* : 502-509.
- Ribéreau-Gayon, P. (1998). Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod*, Paris.
- Rohhand, Y. (2004).Antioxydants naturels végétaux.OCL,**1**(6): 419-424.
- Roussel, A-M et Ferry, M. (2002).Stress oxydant et vieillissement. *Nutrition chimique et métabolisme* ; **16**: 285-291.
- Rui, H. - L. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of cereal science*, 46:207.

- **S**hahi-Gharahlar, A., Reza Yavari, A and Khanali, M. (2009). Mass and volume modeling of loquat (*Eriobotrya japonica* LINDL.) fruit based on physical characteristics. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*,**17** (2):175-189
- Strube, M and Over, D. (1999). Naturally occurring gens. *Tema Nord Food*: 14-16.
- **T**akuhiro, U., Ayana, S., Nguyen, H.-T., Tsukasa, F., Kenji, K., Shijern, O., Hiroko, K., Osamu, M and Yukihiro, S. (2013). *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 4106-4120.
- Tamiguchi, S., Imayoshi, Y., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., Ito, H., Hatamo, T., Sakagami, H., Tokub, H., Nishino, H., Sugita, D., Shimura, S and Yoshida, T. (2002). Production of bioactive triterpenses by *Eriobotrya japonica* calli. *Phytochemistry*, **59**:315-323.
- Tessier, F., Marconnet, P. (1995). Radicaux libres système antioxydants et exercice. *Elsevier*,**10** :1-13.
- Tonelli, N et Gallouin, F. (2013). Des fruits et des graines comestibles du monde entier. *Lavoisier SAS* : 728.
- **V**ansant, D.-G. (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base. *Institut Danone*, 1-2.
- **W**oodward, A et Reed, G.-D. (1989). Récapitulatif de la recherché sur les ligneux au CIPEA. Addis-Abeba, Ethiopie, **31**: 3-4.
- **X**icorui, Z. (1998). Réglementation des médicaments à base de plantes la situation dans le monde. *Organisation mondiale de la santé*, Genève

- **Y**ang,D.-M., Wang, J.-G., Ren, G.-P., Zhang, Q and Wang, H.-L.(2013). Homogenate extraction of polysaccharides from loquat leaves by response surface methodology. *Journal of Scientific et Industrial Researcg*, **72**: 236-241.
- Yanping, H., Yanchun, Q., Shunquan, L., Yueming, J., Feng, C. (2008). Characterization of antioxidant compounds in Eriobotrya fragrans Champ leaf. *Scientia Horticulturae*, **118**: 288–292.
- Yap, C.F., Ho, C.W., Wan Aida, W.M., Chan, S.W., Lee, C.Y and Leong, Y.S. (2009). Optimization of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (Averrhoacarambola L.)Residues. *Sains malaysiana*, **38** (4):511-520.
- **Z**azzo, J.-F. (2002). Stress oxydant au cours des états inflammatoires aigus et des états d'agression : implications pour la pratique clinique. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16** :268-274.



ANNEXES

Annexes

Annexe N° 01 : courbes d'étalonnages utilisés pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins.

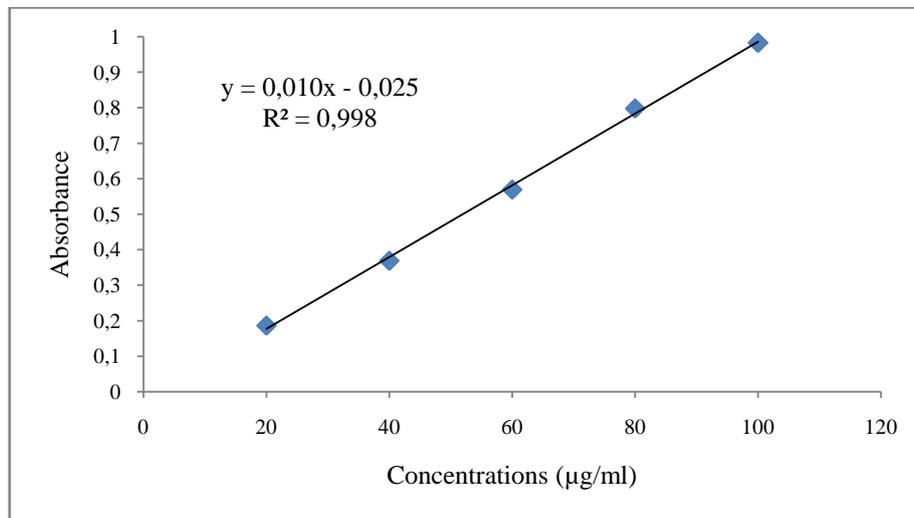


Figure 01 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ($\lambda=765\text{nm}$).

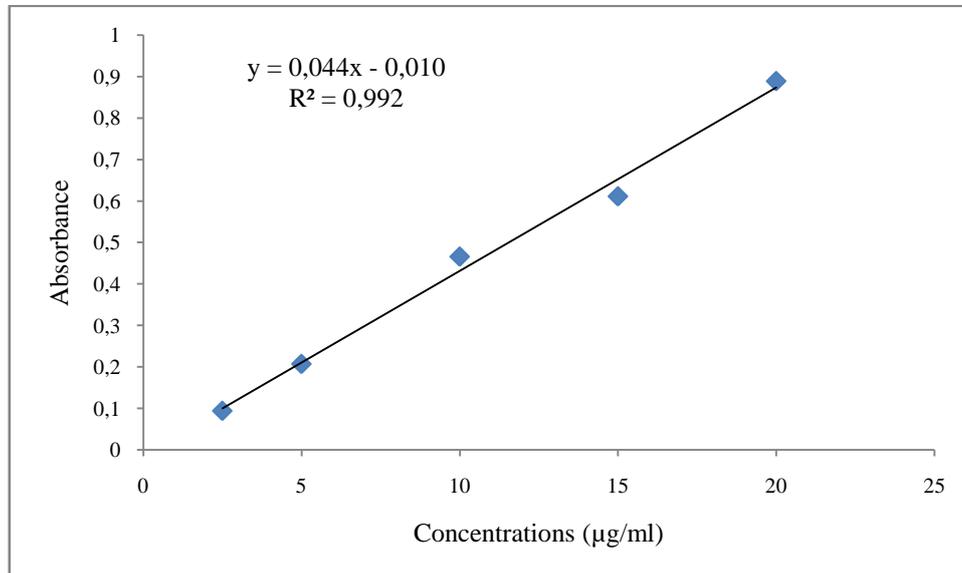


Figure 02 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes ($\lambda=430\text{nm}$).

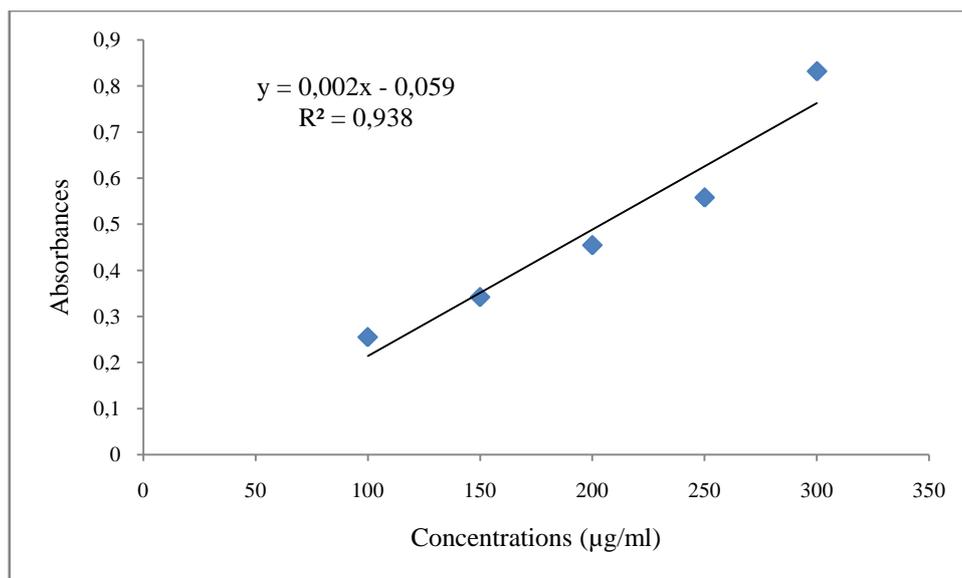


Figure03 : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des tannins ($\lambda=500\text{nm}$).

Annexe N°2 : Courbe obtenues par l'origine 8 utilisées pour le calcul des IC₅₀

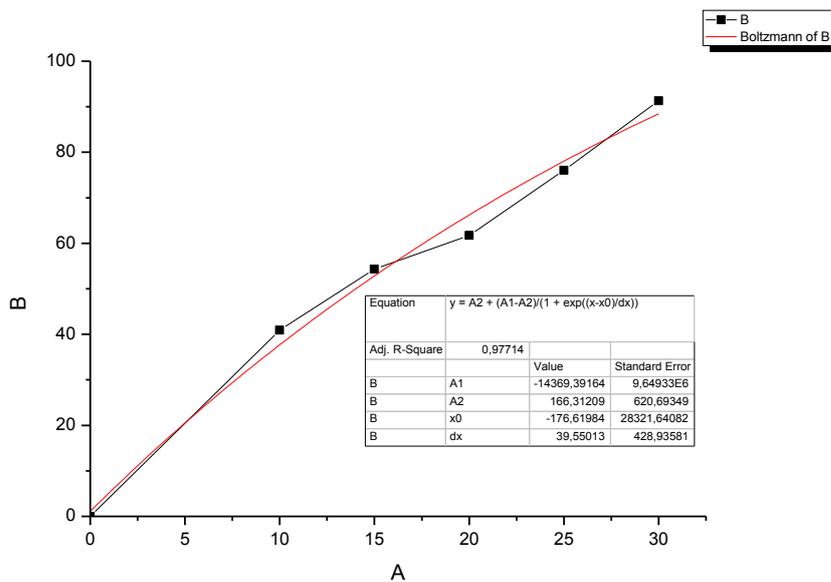


Figure 04 : Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait chloroforme organe des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* dans l'activité scavenging du DPPH•.

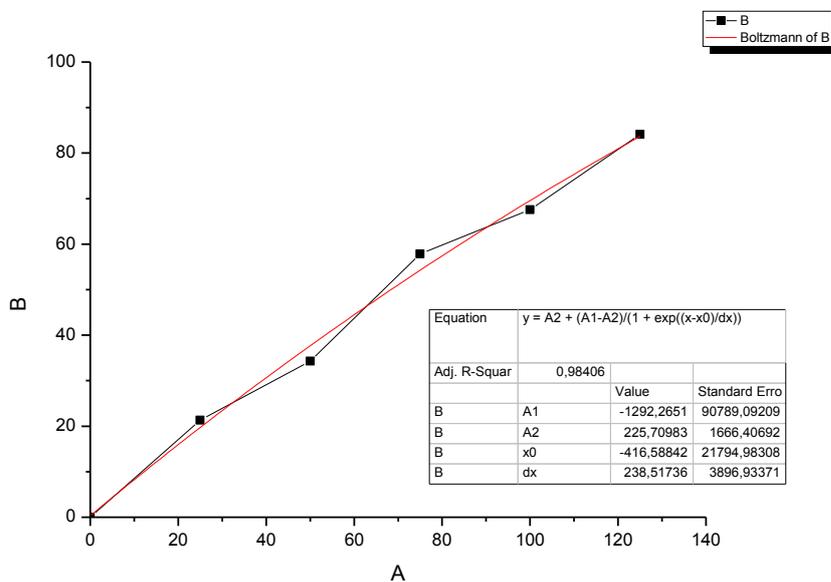


Figure 05 : courbe pour le calcul de IC₅₀ de l'extrait chloroforme aqueuse des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* dans l'activité scavenging d'ABTS•+.

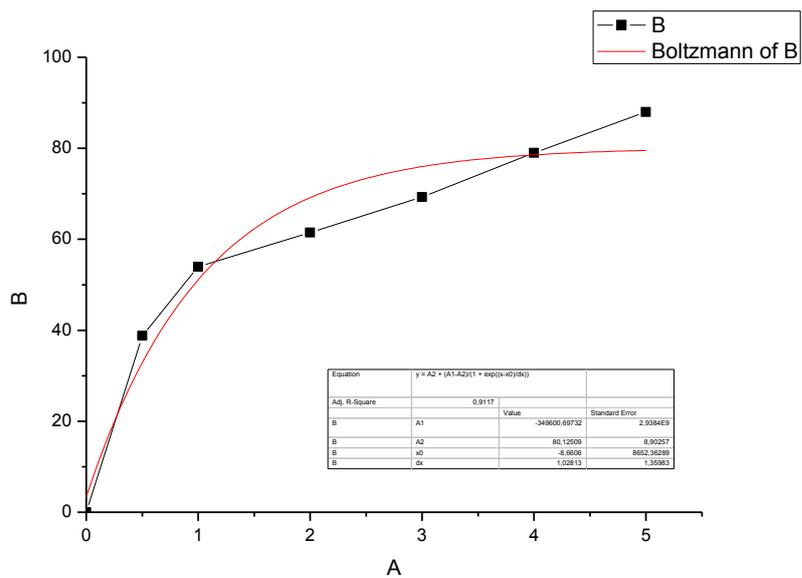


Figure 06 : Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de la BHA dans l'activité scavenging du DPPH.

Annexe N°3 : Courbe de corrélation des différentes activités avec les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et en tannins.

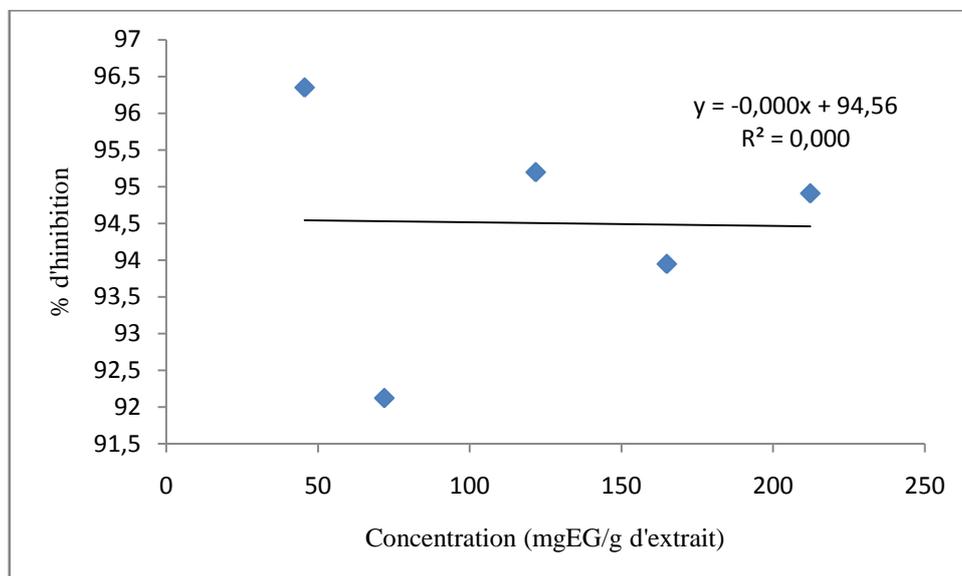


Figure 07 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH• et les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

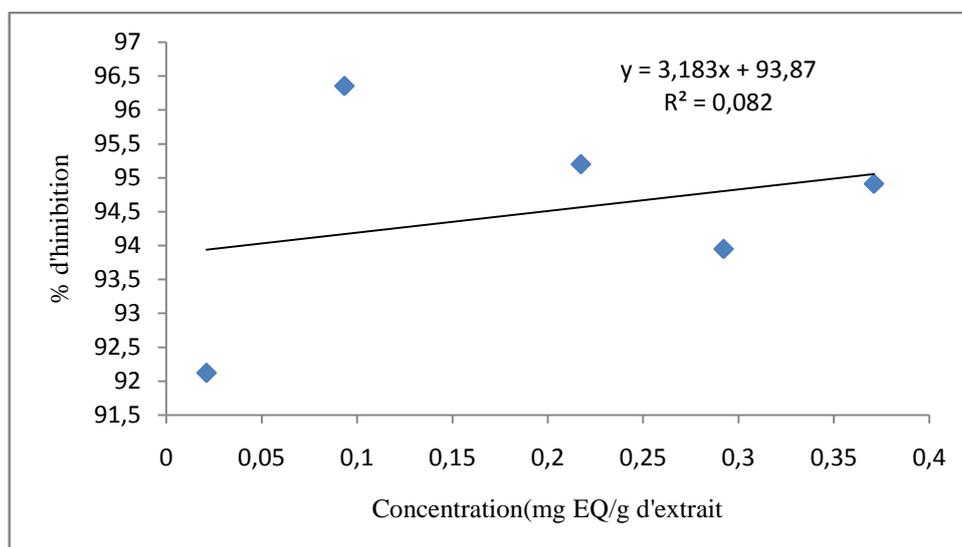


Figure08 : courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH• et les teneurs flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

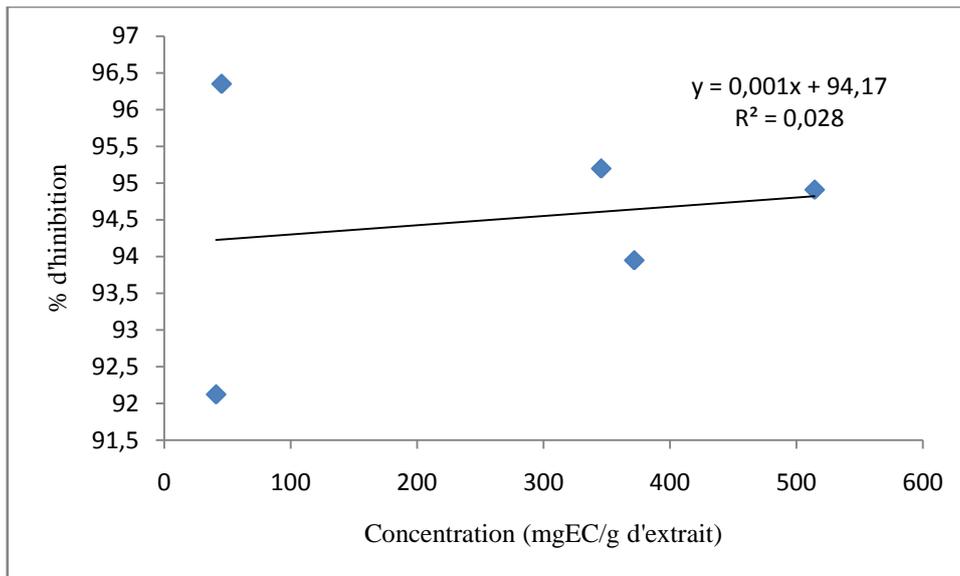


Figure 09: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH• et la teneur en proanthocyanidines des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

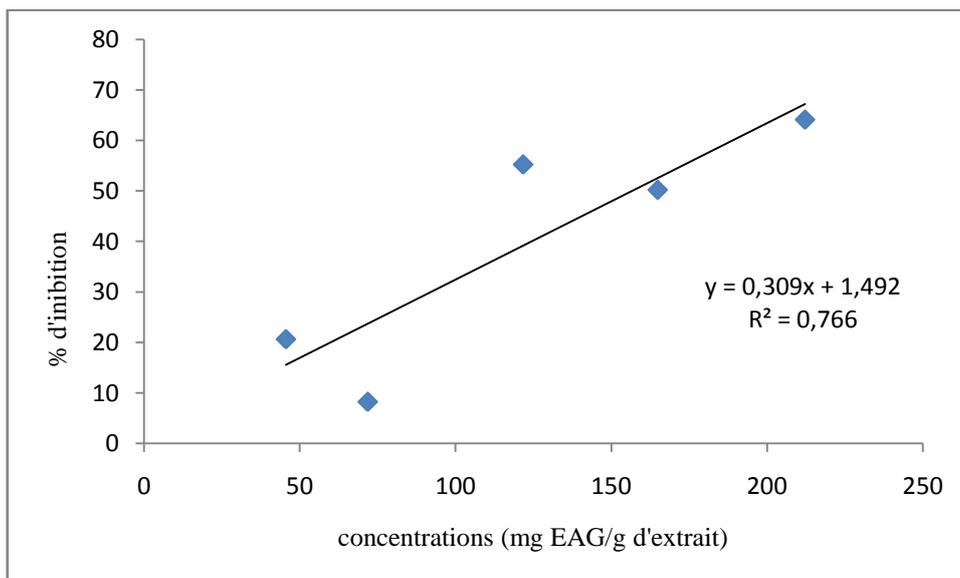


Figure10 : Courbe de corrélation entre l'activité du radical scavenging du radical ABTS•+ et la teneur en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

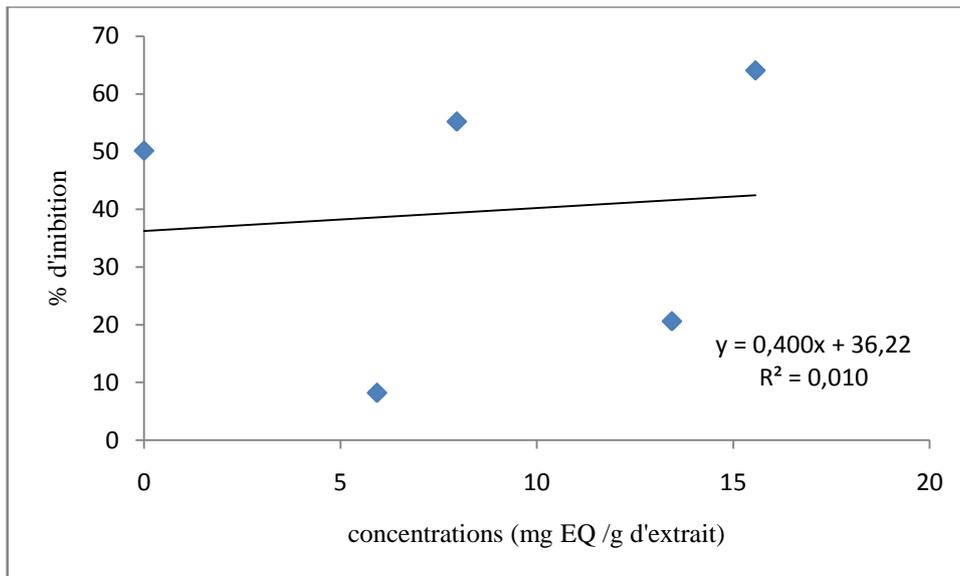


Figure11 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS•+ et la teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

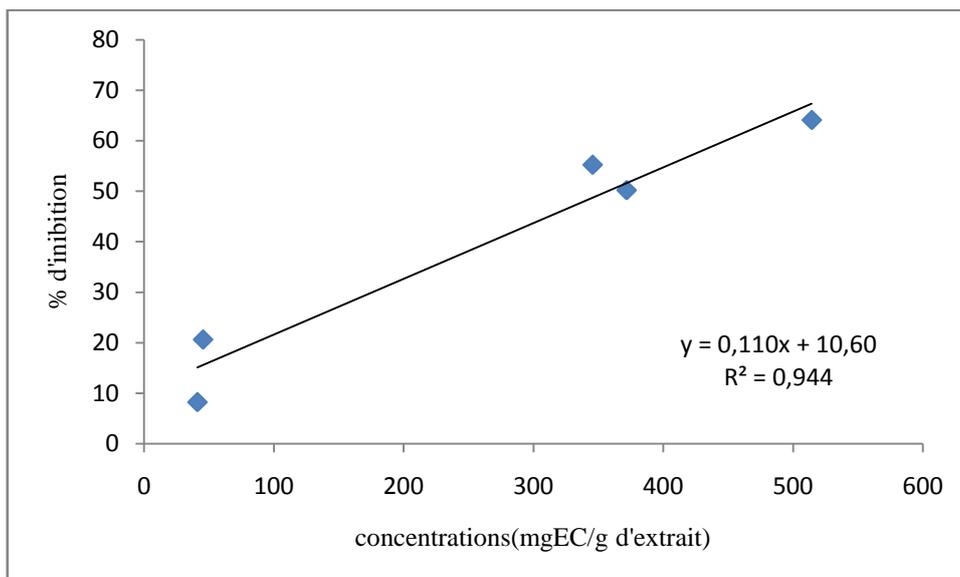


Figure12 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS•+ et la teneur en proanthocyanidines des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

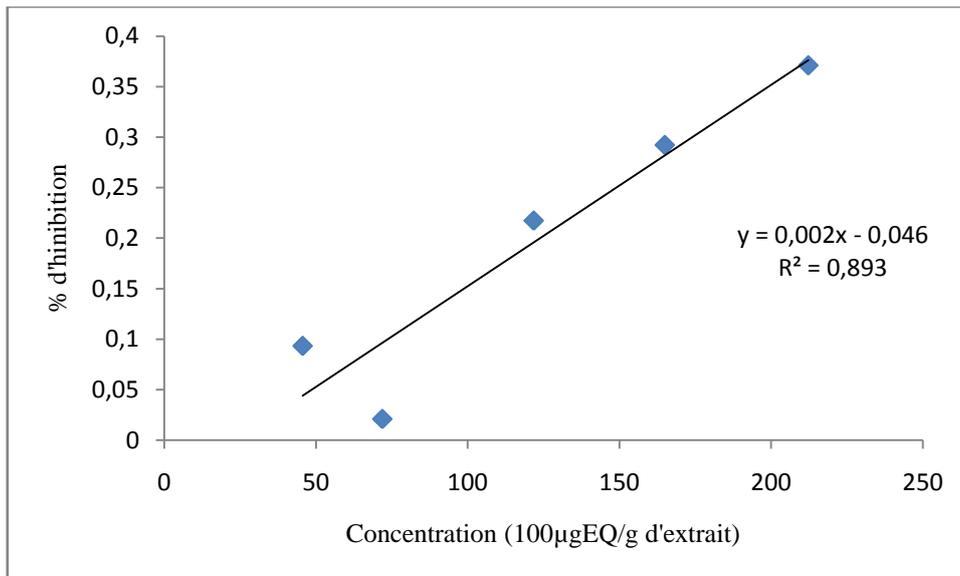


Figure13 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

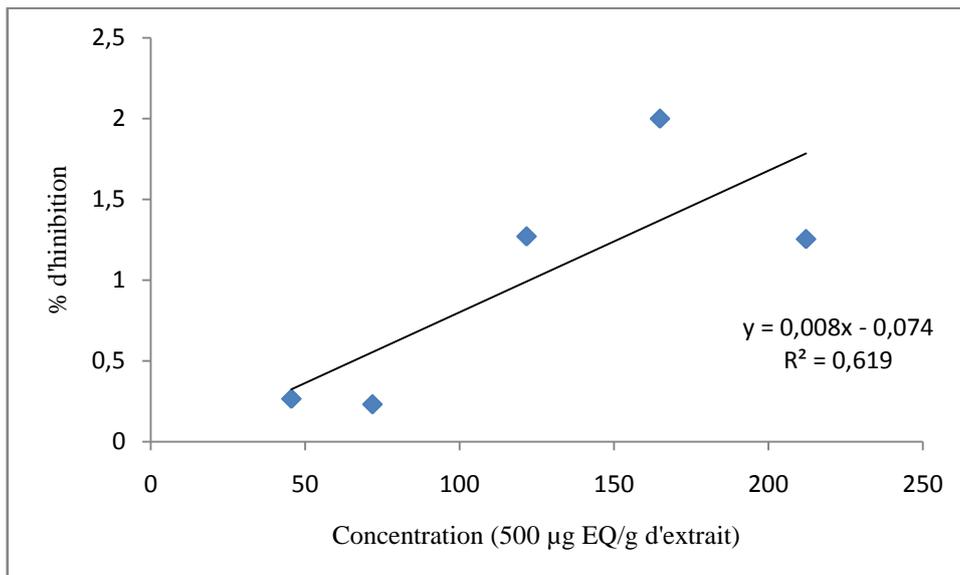


Figure14 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

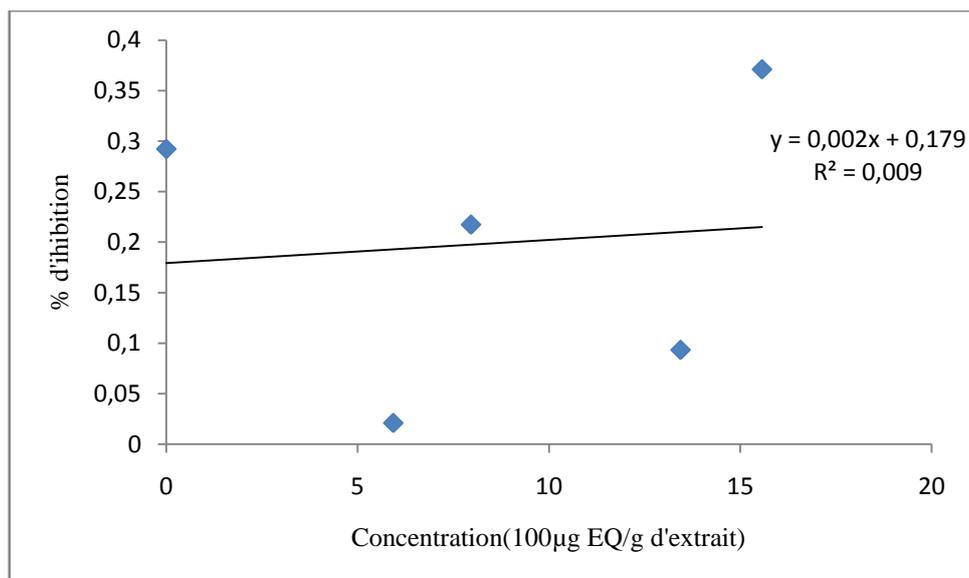


Figure15 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

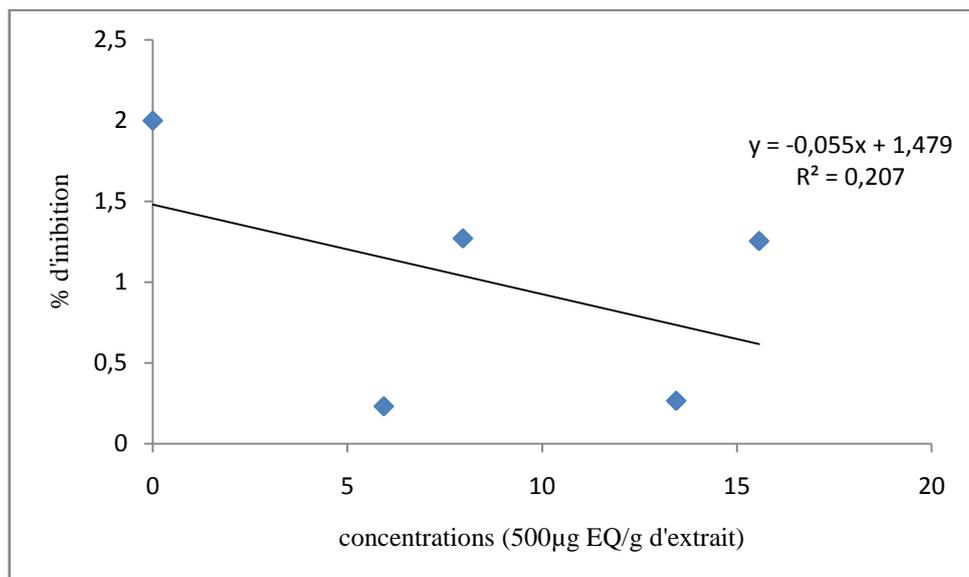


Figure16 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

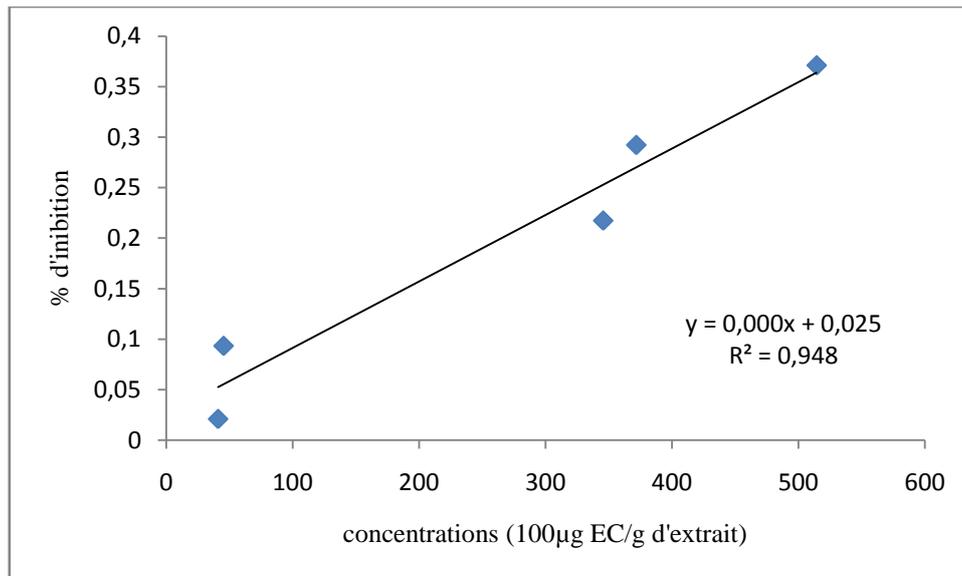


Figure17 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

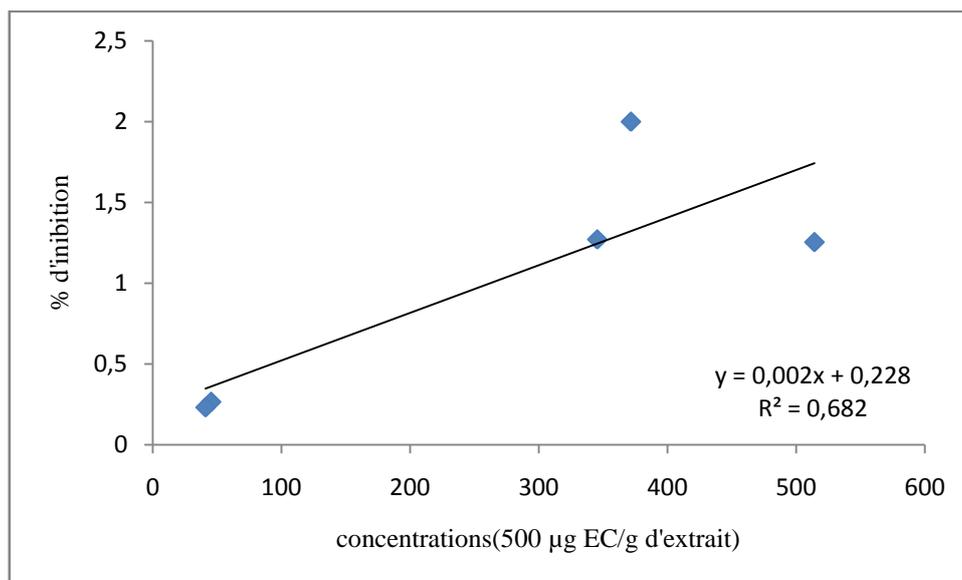


Figure18 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

Résumé

Les antioxydants jouent un rôle fondamental dans l'élimination de l'excès toxique en espèces réactives de l'oxygène à l'origine de diverses maladies dégénératives. Ainsi, l'exploitation des molécules végétales naturelles serait très bénéfique pour la santé humaine. Par conséquent, cette étude a pour objectif l'évaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques extraits à partir d'une plante médicinale locale, *Eriobotrya japonica L*, après avoir obtenu les différents extraits des feuilles de notre plante, le dosage des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés) est réalisé pour pouvoir faire une appréciation qualitative et quantitative ; puis, la mesure de l'activité anti-oxydante des extraits en réalisant trois tests: l'activité scavenging des deux radicaux DPPH[•], ABTS^{•+} et le pouvoir réducteur. Les résultats expérimentaux ont révélé que les extraits d'*Eriobotrya japonica L* ont été riches en polyphénols totaux (45.53 ± 3.8 à 212.2 ± 3.82 mg EAG/g d'extrait) et en tanins condensés (41 ± 8.14 à 514.33 ± 21.55 mg EC/g d'extrait) et aussi ils ont exhibé des teneurs appréciables en flavonoides. Quant aux activités antioxydantes de la plante, les extraits sont de très bons scavengers du radical DPPH (l'IC50 de l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles est de $14.03 \mu\text{g/ml}$). L'activité scavenging d'ABTS^{•+} et le pouvoir réducteur sont forte ($8.24\% \pm 2.34\%$ à $64.06\% \pm 1.77\%$ et $0.02\% \pm 0.01$ à $0.37\% \pm 0.01\%$) respectivement. Ces constatations nous laissent imaginer des études plus poussées sur des extraits d'une panoplie de plantes médicinales afin d'en bénéficier d'avantage.

Mots clé : *Eriobotrya Japonica L*, Radicaux libre, Activité Antioxydants, Composés phénolique.

Abstract

The antioxidants play a basic role in the elimination of the toxic reactive oxygen species excess. Thus, the exploitation of natural plant molecules will be very beneficial for the human health. Therefore, the aim of this study is the evaluation of the anti-oxidant activity of the phenolic compounds extracted from our local medicinal plant, *Eriobotrya japonica L*, and that by doing two types of manipulations, of course, after getting the different plant leaves extracts. First, we quantified the phenolic compounds amounts (total phenolics, flavonoids, and condensed tannins), in order to make a qualitative and a quantitative assessment. Then, we realized the anti-oxidant activity assays such as: the DPPH[•] and ABTS^{•+} radical scavenging activity and the reducing power. The experimental results revealed that *Eriobotrya japonica L* extracts were rich in total phenolics (45.53 ± 3.8 à 212.2 ± 3.82 mg EAG/g for extract) , showed high levels of condensed tannins (41 ± 8.14 à 514.33 ± 21.55 mg EC/g for extract) and they exhibited significant levels of flavonoids. As for the antioxidant activities of the plant, the extracts were very good scavengers of radicals DPPH (the IC50 of the leaves aqueous extract from chloroforme (was $14.03 \mu\text{g/ml}$). whereas, the ABTS^{•+} activity and the reducing power were low ($8.24\% \pm 2.34\%$ à $64.06\% \pm 1.77\%$ et $0.02\% \pm 0.01$ à $0.37\% \pm 0.01\%$). These observations lead us toward more studies in this field, so that we get more benefits from our local medicinal plants.

Keywords: *Eriobotrya japonica L*, free radicals, anti-oxidants activity, phenolic compounds.