

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 présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie

Option : **Biochimie Appliquée aux Substances Végétales Bioactives**

Thème

Activités anti-radicalaires des extraits de
***Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae):**
Caractérisation des fractions actives

Présenté par Melle : **SEBAIHI SALIMA**

Le jury :

Présidente : **Mme BENABDESSELAM F.** (Maître de conférences A, Université de Bejaia)

Promoteur : **Mr ATMANI D.** (professeur, Université de Bejaia)

Examineurs : **Mme BEDJOU. F.** (Maître de conférences A, Université de Bejaia)

Mme ZEBBOUDJ. A. (Maître de conférences A, Université de Bejaia)

Année 2009-2010

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Appliquée, sous la direction du Pr. Atmani D. Je le remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir accepté de m'encadrer, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour ses conseils, son aide qui m'ont permis de préparer ce mémoire de magister dans les meilleures conditions.

J'exprime mes sincères remerciements à M^{me} Benabdesselam F. de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire et de juger ce travail.

J'adresse également mes remerciements à M^{me} Bedjou F. et M^{me} Zebboudj A., qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail ; qu'elles me soient permises de leurs exprimer toute ma gratitude.

Je tiens à remercier vivement tous les membres de l'équipe de laboratoire de Biochimie Appliquée, tout particulièrement, Mme Atmani, M^{me} Debbache, M^{me} Ouahmed, M^{lle} Ayouni, M^{lle} Berboucha, M^{lle} Chaher et M^{lle} Loumis pour leur aides, leurs conseils ainsi que leurs disponibilités. Je note également l'aide apportée par le personnel de laboratoire de Biophysique particulièrement M Hamoum et M Deriche.

Je suis heureuse de remercier tous mes camarades du laboratoire, pour leur efficace collaboration, je les remercie de leur amitié ainsi que tous mes collègues de la post-graduation en Biochimie Appliquée.

Mes remerciements ne seront pas complets sans citer mes parents de m'avoir toujours soutenu et de me permettre d'obtenir ce titre dans les meilleures conditions possibles.

Finalement, je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A ma mère :

Sans son amour je ne serai pas arrivée à ce niveau.

A mon père :

Zui, j'espère, serait fier de moi.

A mes sœurs et mes frères :

Zui je sais, seront toujours là pour moi.

A mes chères nièces :

Sonia, Dalia et Melina.

A mes adorables neveux :

Aniss, Lyes, Wassim et Zinedine.

A toute ma famille et a tous mes collègues et amis.

Salima

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Radicaux libres (RL)	02
I.1.1. Définition des radicaux libres	02
I.1.2. Nature des radicaux libres	02
I.1.3. Stress oxydant	05
I.1.3.1 Sources de stress oxydant.....	06
I.1.3.2. Lésions cellulaires associées au stress oxydant.....	08
I.1.3.3. Rôles des radicaux libres.....	11
I.2. Anti-oxydants	12
I.2.1. Définition d'un anti-oxydant.....	12
I.2.2. Systèmes de défenses	13
I.2.2.1. Système de défense endogène	13
I.2.2.2. Système de défense exogène	15
I.3. Généralités sur les plantes médicinales	17
I.3.1. Généralités et origines des composés phénoliques	18
I.3.1.1. Structure et classification des composés phénoliques.....	18
I.3.2. Activités biologiques des composés phénoliques	22
I.3.2.1. Action préventive des maladies cardiovasculaires.....	22
I.3.2.2. Activité anti-inflammatoire	22
I.3.2.3. Activité anti-microbienne.....	23
I.3.2.4. Activité anticancéreuse	23
I.3.2.5. Activité antioxydante	24
I.3.2.5.1. Mode d'action des composés phénoliques	24
I.3.2.5.1.1. Piégeage des espèces réactives de l'oxygène.....	25
I.3.2.5.1.2. Chélation des ions métalliques.....	27
I.3.2.5.1.3. Inhibition enzymatique.....	28

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal	30
II.1.1. Classification	30

II.1.2. Données générales sur l'espèce <i>Pistacia lentiscus</i>	30
II.1.3. Composition chimique et activités thérapeutiques	31
II.1.4. Récolte de la plante	31
II.1.4.1. Broyage et tamisage	31
II.1.4.2. Extraction des composés phénoliques	31
II.2. Dosage des composés phénoliques des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	33
II.2.1. Dosage des phénols totaux	33
II.2.2. Dosage des flavonoïdes	34
II.2.3. Dosage des tannins	34
II.3. Mesure du pouvoir réducteur	35
II.4. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	35
II.4.1. Activité scavenging du radical DPPH [•] par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	35
II.4.2. Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	36
II.4.3. Activité scavenging du radical hydroxyle par les extraits de <i>Pistacia Lentiscus</i>	37
II.5. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	38
II.5.1. Fractionnement des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	38
II.5.1.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne	38
II.5.1.2. Caractérisation des fractions actives de <i>Pistacia lentiscus</i> par chromatographie sur CCM	39
II.5.2. Caractérisation de l'activité anti-DPPH [•] des fractions actives de <i>Pistacia lentiscus</i> sur <i>lentiscus</i> sur CCM	39
II.6. Etude statistique	40

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussion	41
III.I. Taux d'extraction	41
III.2. Dosage des composés phénoliques des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	42
III.2.1. Dosage des phénols totaux	42
III.2.2. Dosage des flavonoïdes	43
III.2.3. Dosage des tannins	45
III.3. Mesure du pouvoir réducteur des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	46
III.4. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	47
III.4.1. Activité scavenging du radical DPPH [•] par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	47
III.4.1.1. Activité scavenging du radical DPPH [•] des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	47

III.4.1.2. Détermination des IC ₅₀ des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> et quelques standards	49
III.4.2. Activité scavenging du (H ₂ O ₂) par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	51
III.4.2.1. Activité scavenging du (H ₂ O ₂) par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	51
III.4.2.2. Détermination des IC ₅₀ des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> et quelques standards	52
III.4.3. Activité scavenging du radical (OH·) par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	54
III.4.3.1. Activité scavenging du radical (OH·) par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml.....	54
III.4.3.2. Détermination des IC ₅₀ des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> et quelques standards	56
III.5. Corrélation entre les teneurs en polyphénols et les activités antiradicalaires testées	58
III.5.1. Corrélation entre la teneur en polyphénols et le pouvoir réducteur	58
III.5.2. Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-DPPH·	59
III.5.3. Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti- H ₂ O ₂	60
III.5.4. Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-OH·	61
III.6. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	62
III.6.1. Activité scavenging du radical DPPH· par les fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	62
III.6.2. Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par les fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	63
III.6.3. Activité scavenging du radical OH· par les fractions chromatographiques des extraits actifs de <i>Pistacia lentiscus</i>	65
III.7. Caractérisation des fractions actives des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	67
III.7.1. Activité anti-DPPH· des fractions actives des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> sur CCM ...	67
III.7.2. Caractérisation des fractions actives des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> par la vanilline sulfurique	70
Conclusion et perspectives	75
Références bibliographiques	77
Annexes	

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Formation des différentes espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	05
02	Mécanisme de la production des ERO durant l'ischémie-reperfusion	08
03	Principales modifications biochimiques et métaboliques cellulaires, conséquence d'un stress oxydant	09
04	Mécanisme en chaîne de la peroxydation lipidique	10
05	Systèmes de défense antioxydant	13
06	Système de régénération du GSH	15
07	Structure chimique de la famille des tocophérols	16
08	Structure chimique de la vitamine C	16
09	Structure chimique de la β carotène	17
10	Structures chimiques des acides phénoliques	19
11	Structure chimique de base des flavonoides	20
12	Structure chimique de base de différentes flavonoides	20
13	Structure chimique des tannins hydrolysables	21
14	Structure chimique des tannins condensés	22
15	Sites proposés pour la chélation des ions métalliques par les flavonoides	27
16	Complexe curcumin-Fe ²⁺	28
17	Photographies des feuilles (A) et des graines (B) de <i>Pistacia lentiscus</i>	30
18	Protocole de l'extraction des composés phénoliques	33
19	Taux de phénols totaux dans les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	42
20	Taux de flavonoïdes dans les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	44
21	Taux de tannins dans les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	45
22	Représentation graphique du pouvoir réducteur des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 μ g/ml	46
23	Activité scavenging du radical DPPH \cdot par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 μ g/ml	47
24	Activité scavenging du radical DPPH \cdot par les extraits de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> à 10 μ g/ml	48
25	Activité scavenging du radical DPPH \cdot par les extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'hexane, aqueux du chloroforme de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et de la catéchine à différentes concentrations	49

26	Activité scavenging du radical DPPH [•] par les extraits organique et aqueux d'acétate d'éthyle de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations	50
27	Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	51
28	Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par les extraits, aqueux d'hexane, aqueux du chloroforme de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations	53
29	Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par l'extrait d'acétate d'éthyle de graines <i>Pistacia lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations	54
30	Activité scavenging du radical OH [•] par les extraits de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	55
31	Activité scavenging du radical OH [•] par les extraits, éthanolique, aqueux d'acétate d'éthyle, aqueux d'hexane, aqueux du chloroforme des feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations	56
32	Activité scavenging du radical OH [•] par l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de <i>Pistacia lentiscus</i> et certains standards à différentes concentrations	57
33	Activité scavenging du radical DPPH [•] par les fractions chromatographiques des extraits actifs de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	62
34	Activité scavenging du radical DPPH [•] par les fractions chromatographiques des extraits actifs de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	62
35	Activité scavenging du H ₂ O ₂ par les fractions chromatographiques des extraits actifs de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	64
36	Activité scavenging du H ₂ O ₂ par les fractions chromatographiques des extraits actifs de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	64
37	Activité scavenging du radical OH [•] par les fractions chromatographiques des extraits actifs de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	65
38	Activité scavenging du radical OH [•] par les fractions chromatographiques des extraits actifs de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> à 100 µg/ml	66
39	Chromatogramme des fractions actives des extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i>	67
40	Chromatogramme des fractions actives des extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle de graines de <i>Pistacia lentiscus</i>	69
41	Chromatogramme des fractions actives des extraits aqueux de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i>	71
42	Chromatogramme des fractions actives des extraits organiques de feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i>	72
43	Chromatogramme des fractions actives des extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle de graines de <i>Pistacia lentiscus</i>	74

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Identité moléculaire, demi-vie et origine des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des espèces réactives de l'azote (ERN)	03
II	Taux d'extraction des composés phénoliques des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	41
III	Corrélation entre l'effet anti-radicalaire et les teneurs en polyphénols des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	58
IV	Caractéristiques des chromatogrammes des fractions actives des extraits de feuilles et de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> , pulvérisée par la solution de DPPH.	68
V	Caractéristiques des chromatogrammes des fractions actives des extraits de feuilles et de graines de <i>Pistacia lentiscus</i> , révélées par la vanilline sulfurique.	70

Introduction

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du «stress oxydant», une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (Favier, 2003).

Chez l'Homme, de nombreuses situations physiopathologiques (athérosclérose, maladies rhumatismales, vieillissement, cancer) sont associées à une production accrue de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afonso et *al.*, 2007).

Des molécules dites antioxydantes interviennent, selon différents modes d'action, afin de limiter la production des radicaux libres et constituent donc un mécanisme de défense pour l'organisme. Certains antioxydants existent de façon endogène dans l'organisme et d'autres sont assimilables par voie exogène, qu'ils soient naturels ou de synthèse.

L'utilisation thérapeutique des plantes est partie intégrante des traditions de toutes les cultures. De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies.

L'objectif de ce travail consiste en l'étude des activités anti-radicalaires des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus*, une plante locale, utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs pathologies, y compris les maladies inflammatoires, à savoir l'activité anti-DPPH[•], anti-OH[•] et anti-H₂O₂ suivi du fractionnement des extraits ayant montré une activité élevée vis-à-vis de ces radicaux par chromatographie sur colonne de gel de silice et la caractérisation des fractions actives par chromatographie sur couche mince, afin de mettre en évidence les composés responsables de cet effet.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

L'oxygène est indispensable à la plupart des espèces vivantes. Cependant, en raison de sa conformation chimique, la molécule d'oxygène peut, dans certaines circonstances, s'avérer toxique. Cette toxicité est induite par des éléments réactifs, instables et pro-oxydants appelés radicaux libres (Demofarts et *al.*, 2005).

I.1. Radicaux libres (RL)

I.1.1. Définition des radicaux libres

Les RL sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (Demofarts et *al.*, 2005). Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente, ou au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électron à partir d'un composé non radicalaire (Koechlins-Ramonatxo, 2006).

I.1.2. Nature des radicaux libres

I.1.2.1. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

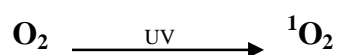
De part sa configuration électronique, l'oxygène est avide d'électrons. Dans le processus de la respiration, le dioxygène est réduit de façon progressive en eau par l'apport de quatre électrons (Vamecq et *al.*, 2004), sa réduction incomplète conduit à des espèces qui ont un caractère oxydant et sont très réactives. L'appellation espèces réactives de l'oxygène inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit tels que le radical hydroxyl (OH^\bullet), le radical anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le radical peroxy (ROO^\bullet), mais aussi certaines espèces réactives non radicalaires, dont la toxicité est élevée, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les hydroperoxydes (ROOH) (Fontaine et *al.*, 2002 ; Koechlin Ramonatxo, 2006). Les ERO sont produits d'une façon permanente et physiologique par l'organisme humain, ce sont donc une conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire. Le tableau I représente les principaux dérivés réactifs de l'oxygène et de l'azote, ainsi que leur demi-vie.

Tableau I : Identité moléculaire, demi-vie et origine des espèces réactives de l'oxygène et des espèces réactives de l'azote (Bossé et al., 2003).

ERO et ERN	Origine	Demi-vie (seconde)
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	Chaîne respiratoire, Xanthine oxydase NAD(P) H oxydase	1
Monoxyde d'azote (NO)	Monoxyde d'azote synthase	3-7
Peroxynitrite (ONOO \cdot)	$O_2^{\cdot-} + NO\cdot$	1-2
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	Chaîne respiratoire, Xanthine oxydase, Superoxyde dismutase	2
Acide hypochloreux (HOCl)	Myéloperoxydase	3
Radical hydroxyl (OH \cdot)	(Réaction de Fenton, réaction d'Haber-Weiss)	10-9
Radicaux lipidiques : (Alkoxyde : RO \cdot), (Peroxyde : ROO \cdot)	Peroxydation des lipides, catalysée par le OH \cdot	RO \cdot : 10-6 ROO \cdot : 7
Oxygène singulet (1O_2)	Photolyse	~10-6

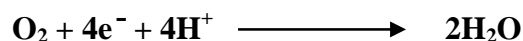
- **Oxygène singulet (1O_2)**

Lorsque la molécule d'oxygène est exposée à des rayonnement ultraviolets (UV), l'apport d'énergie provoque une inversion de spin conduisant à une espèce activée de l'oxygène, appelée oxygène singulet (Berké et al., 2003 ; Berger, 2006). C'est une forme très réactive qui peut oxyder de nombreuses molécules organiques (Morel et Barouki, 1998) ; elle est formée selon la réaction suivante :

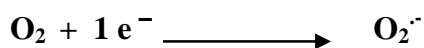


- **Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)**

Au sein de la chaîne respiratoire se produit la réduction complète de l'oxygène, par le transfert de quatre protons et de quatre électrons, conduisant ainsi à la formation de molécules d'eau :



Cependant, au niveau des complexes NADH déhydrogénase (I), et ubisemiquinone (III), il y a une fuite d'électrons célibataires menant à la réduction partielle de l'oxygène qui se transforme en anion superoxyde (Heller et al., 1998 ; Çanakçı et al., 2005).



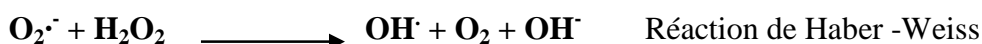
- **Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)**

C'est un produit non radicalaire mais toxique ; il est capable de diffuser rapidement à travers les membranes cellulaires et susceptible de produire des radicaux hydroxylés en présence de fer ferreux (réaction de Fenton). Il est produit sous l'action de la superoxyde dismutase (SOD), qui le transforme en H₂O₂ selon la réaction suivante (Capel *et al.*, 2006) :



- **Radical hydroxyle (OH[·])**

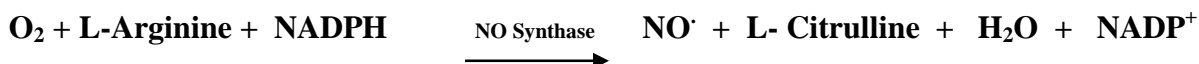
Le radical OH[·] est considéré comme le plus toxique des espèces réactives de l'oxygène (Vergely et Rochette, 2002). Sa demi-vie est de l'ordre de la nanoseconde, il est le plus instable et le plus réactif (Salvayre et Salvayre, 2005). La voie classiquement évoquée de la production du radical hydroxyle est la réaction de Fenton à partir de peroxyde d'hydrogène et du fer réduit (Vergely et Rochette, 2002 ; Sorg, 2004). Ainsi, la présence simultanée de H₂O₂, de O₂^{·-} et de fer permet la production du radical OH[·], selon la réaction d'Haber Weiss.



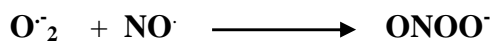
La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires avoisinantes (protéines, lipides, ADN...), provoquant ainsi de multiples dommages cellulaires (Pincemail *et al.*, 1999 ; Favier, 2003 ; Gülçin, 2009).

I.1.2.2. Espèces réactives de l'azote (ERN)

Les ERN sont une sous famille de molécules réactives (Bossé *et al.*, 2003). Le monoxyde d'azote (NO[·]) est un radical dérivé de l'azote, ayant une demi-vie de quelques secondes (Vergely et Rochette, 2002). Il est synthétisé à partir de la L-arginine et de l'oxygène par la NO-synthase (Sorg, 2004), selon la réaction suivante :



Il a été démontré que la production concomitante de grandes quantités de O₂^{·-} et de NO[·] peut induire la formation de peroxynitrite (ONOO⁻), qui peut lui-même générer le radical OH[·] indépendamment de la mise en jeu des réactions faisant intervenir le fer (Vergely et Rochette, 2002 ; Delemasure *et al.*, 2006).



Il a été postulé que le peroxynitrite peut être plus toxique que le radical hydroxyle (Vergely et Rochette, 2002). En effet, les principales cibles mitochondriales du peroxynitrite sont les chaînes de transport des électrons, les complexes I, II, IV, et V, les membranes, l'ADN et quelques enzymes comme la créatine kinase et la superoxyde dismutase (Çanakçi et *al.*, 2005).

Les RL sont produits de façon permanente dans l'organisme humain par divers mécanismes, comme illustré dans la Figure 01 (Favier, 2003).

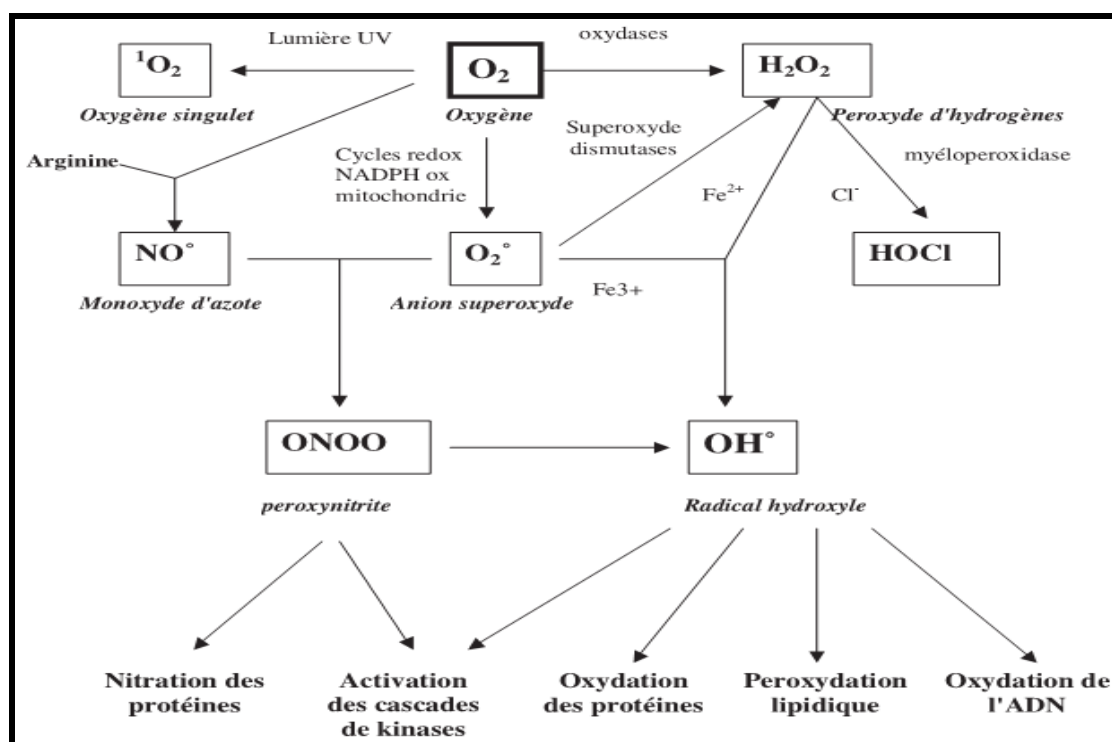


Figure 01 : Formation des différentes espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Favier, 2003).

Cependant, la production des RL peut être amplifiée de façon excessive par différents mécanismes physiopathologiques ou facteurs environnementaux, créant un stress oxydant.

I.1.3. Stress oxydant

En situation physiologique, il existe un équilibre entre la production des ERO et les systèmes de défenses antioxydants. Un stress oxydant surviendra en cas d'un déséquilibre dans la balance pro-oxydants/antioxydants (Pincemail et *al.*, 2002 ; Berger 2006), c'est à dire lorsque l'homéostasie redox est perturbée, soit par une surproduction des ERO, soit par une défaillance du système antioxydant (Morel et Barouki, 1998).

I.1.3.1 Sources de stress oxydant

Le stress oxydant est favorisé par divers agents aussi bien endogènes (métabolisme, inflammation) qu'exogènes, comme les radiations UV et ionisantes, le tabac et diverses molécules apportées par l'alimentation (métaux toxiques, alcool...etc) (Gardès-Albert et *al.*, 2003 ; Çanakçı et *al.*, 2005).

I.1.3.1.1. Sources endogènes

Trois voies de génération endogène des ERO sont généralement décrites, à savoir la chaîne de transfert des électrons située au niveau des mitochondries (Morel et Barouki, 1998), la flambée respiratoire des cellules phagocytaires indispensables à la défense immunitaire (Favier, 2003), ainsi que l'activité des enzymes de type oxydase (Demoffarts et *al.*, 2005).

- **Mitochondries**

Dans les Conditions physiologiques normales, 1 à 2 % de l'oxygène réduit dans la mitochondrie est converti en $O_2^{\cdot-}$ (Bonfont-Rousselot, 2007) par la NADH déshydrogénase et l'ubisemiquinone de la chaîne respiratoire (Fontaine et *al.*, 2002). Cette quantité peut être amplifiée, une fois que la respiration devient plus intense (effort physique), lorsque la fraction d'oxygène inspiré augmente (au cours de certaines modalités de ventilation artificielle) ou lors des désordres mitochondriaux génétiques ou nutritionnels (carence en ubiquinone) (Nouette-Gaulain et *al.*, 2007). Malgré l'efficacité de la chaîne respiratoire à transférer les électrons, l'environnement intramitochondrial hautement réducteur et la nature des réactions redox catalysées font que divers composants contenant des flavoprotéines, des centres fer-soufre et l'ubisemiquinone sont thermodynamiquement capables de transférer un seul électron à une molécule d'oxygène et ainsi être des sites de production des ERO (Nouette-Gaulain et *al.*, 2007).

- **Cellules phagocytaires**

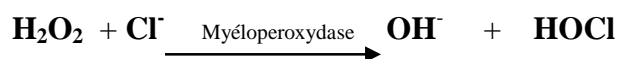
Les cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la formation du $O_2^{\cdot-}$. Cette enzyme, normalement inactive, devient active lorsque la cellule phagocytaire est stimulée. La forte consommation d'oxygène qui en résulte est appelée « *respiratory burst* » (Fontaine et *al.*, 2002 ; Huet et Duranteau, 2008). La réponse inflammatoire va conduire à une augmentation de la production et la libération des ERO. En effet, une faible concentration des ERO est suffisante pour induire la production de l'interleukine-8 à activité chimiotactique élevée vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles (Depent, 2002 ; Demoffarts et *al.*, 2005).

- **Enzymes de type oxydases**

Les cellules des mammifères constituent une source appréciable en enzymes génératrices des ERO, tels que les systèmes de transport des électrons mitochondriaux, le cytochrome p450, la xanthine oxydase, la NADP-H oxydase et la NO-synthase (Ushio-Fukai et Alexander, 2004).

- **Myéloperoxydase**

La myéloperoxydase des cellules phagocytaires est une protéine à hème qui peut générer l'acide hypochloreux (HOCl) en présence de Cl⁻ (Salvayre et Salvayre, 2005) ; celui-ci est 100 à 1000 fois plus toxique que le O₂⁻ et le H₂O₂ (Çanakçi et *al.*, 2005).



- **Lipoxygénases**

Les lipoxygénases oxydent directement les acides gras polyinsaturés (AGPI). En effet la 5-lipoxygénase oxyde l'acide arachidonique libre en hydroperoxyde (5-HPETE), précurseur des leucotriènes qui sont de puissants médiateurs de l'inflammation (Salvayre et Salvayre, 2005).

- **Xanthine oxydase (XO)**

La xanthine déshydrogénase (XDH) est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme des purines, au cours du phénomène d'ischémie-reperfusion. Elle est convertie en xanthine oxydase (XO) qui génère du superoxyde en présence d'oxygène et de xanthine ou d'hypoxanthine (McKelvey et *al.*, 1988 ; Fontaine et *al.*, 2002). L'activation de la XO est le facteur principal responsable d'une surproduction des ERO (Groussard, 2006). La transformation de la forme (XDH) en (XO) est rendue possible par l'augmentation du flux de calcium résultant du phénomène d'ischémie-reperfusion (Figure 02) (Groussard, 2006).

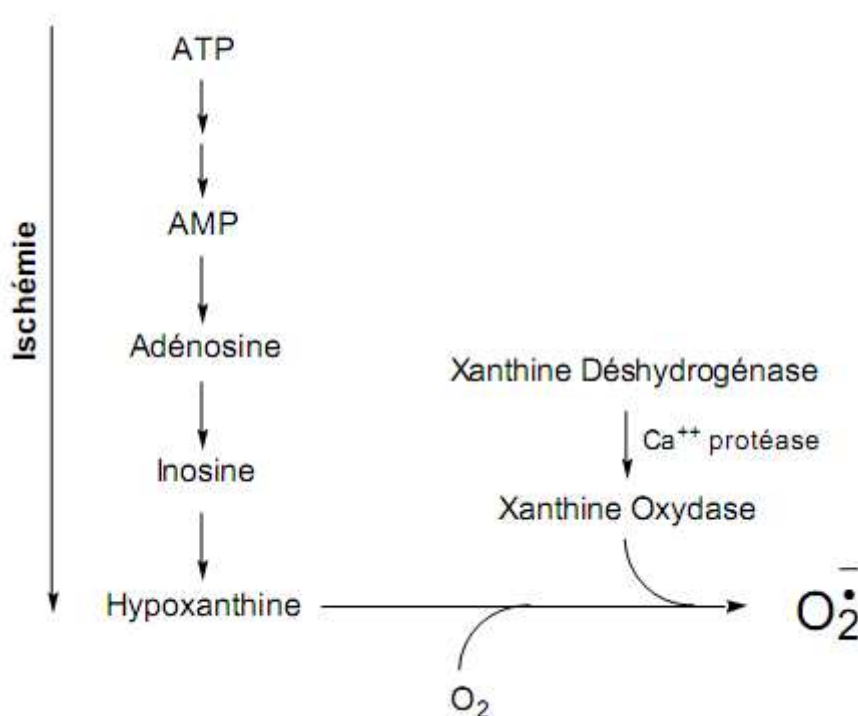


Figure 02 : Mécanisme de la production des ERO durant l'ischémie-reperfusion (Sorg, 2004).

De plus, l'induction d'enzyme de cytochrome P450 (mono-oxygénases localisées dans le réticulum endoplasmique), en particulier par des xénobiotiques, active le métabolisme oxydant dans la cellule, aggravant ainsi le risque de fuites électroniques et de surproduction des ERO (Favier, 2003).

I.1.3.1.2. Sources exogènes

Plusieurs facteurs exogènes peuvent provoquer dans l'organisme humain des réactions chimiques de type radicalaire, tels que l'exposition prolongée au soleil, les radiations, le tabac...etc. Cette surproduction des ERO pourrait expliquer les lésions tissulaires observées dans plusieurs pathologies (Pincemail et *al.*, 1998).

I.1.3.2. Lésions cellulaires associées au stress oxydant

Les RL sont des substances produites par le métabolisme cellulaire, peuvent être toxiques pour les tissus biologiques et sont une source de lésions des lipides, des protéines et de l'ADN. Ces lésions sont à l'origine de la dysfonction membranaire et de la désintégration cellulaire (Dessport et Couratier, 2002).

La figure 03 illustre les principales modifications biochimiques et métaboliques cellulaires provoquées par le stress oxydant.

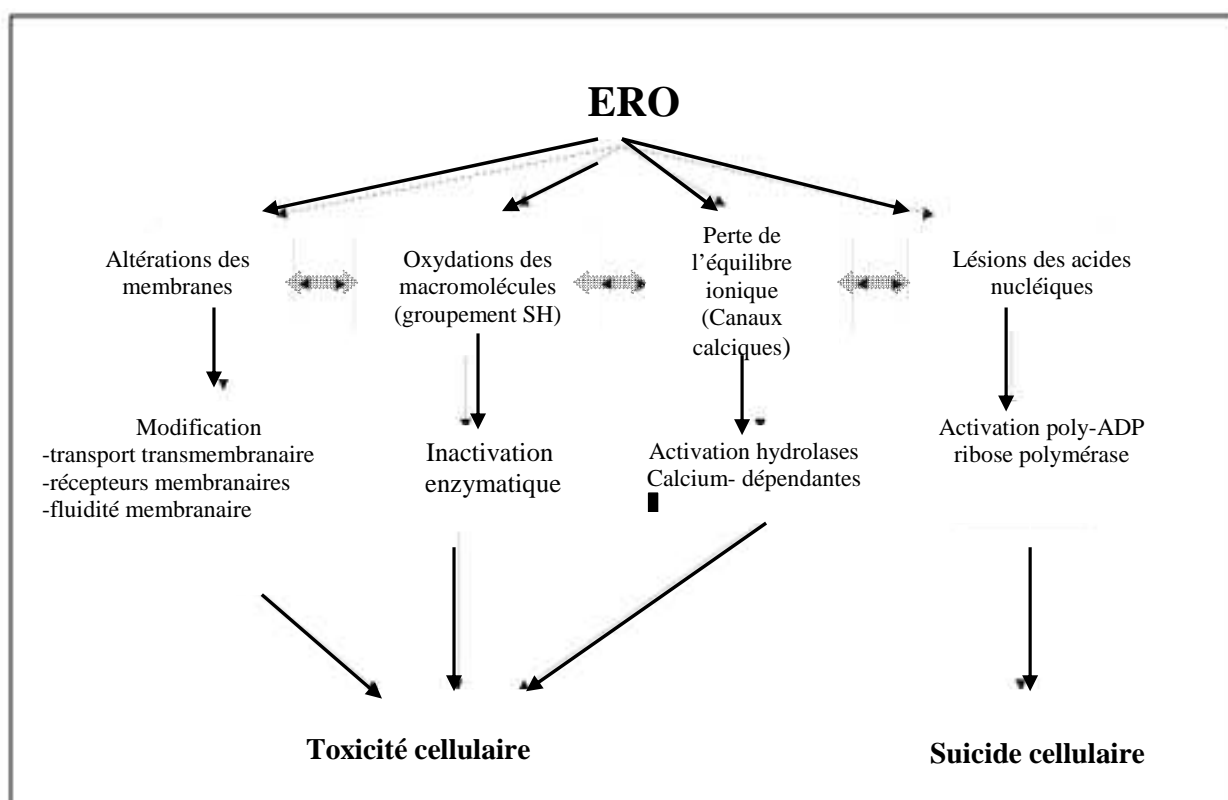


Figure 03 : Principales modifications biochimiques et métaboliques cellulaires consécutives, d'un stress oxydant (Demoffarts et *al.*, 2005).

I.1.3.2.1. Peroxydation lipidique

Les lipides, notamment les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires, sont la cible privilégiée de l'attaque par les RL, surtout par le radical $\text{OH}\cdot$ (Flourie et *al.*, 2006 ; Radyukina, 2008). La peroxydation lipidique est définie comme étant la détérioration oxydative des (AGPI), tels que les acides linoléique et arachidonique. Elle se déroule en trois étapes : initiation, propagation et terminaison (Figure 04) (Hennebelle et *al.*, 2004).

La peroxydation des lipides fournit ainsi une grande variété de produits, qui sont eux-mêmes très réactifs, tels que l'isoprostane et le malonaldéhyde (MDA). Par conséquent, la peroxydation des lipides induit une modification de la fluidité et de la perméabilité des membranes (Çanakçi et *al.*, 2005).

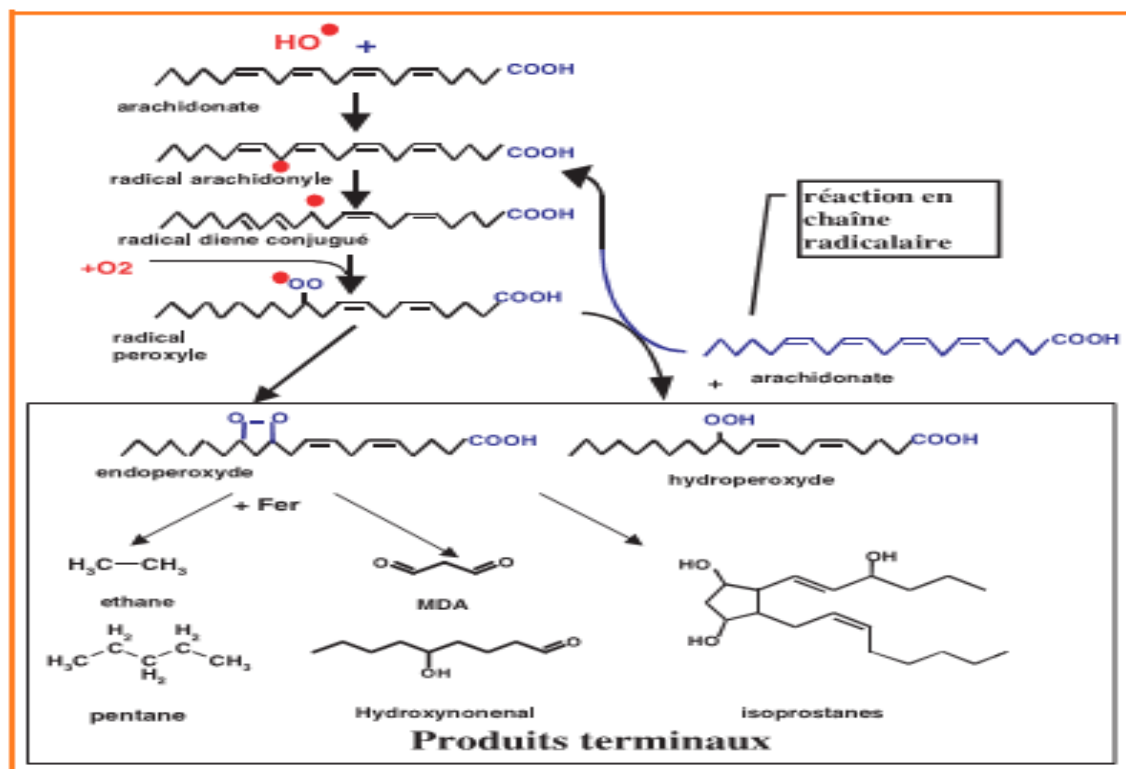


Figure 04 : Mécanisme en chaîne de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

I.1.3.2.2. Dénaturation des protéines

La toxicité des RL s'exerce également sur les protéines (Barouki, 2006). Le radical OH^\bullet semble être le plus efficace dans l'induction des dommages oxydatifs des protéines (Çanakçi et *al.*, 2005). Les acides aminés les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane et la tyrosine, sur lesquels le radical OH^\bullet s'additionne, modifiant ainsi la conformation de la protéine. Le radical OH^\bullet agit également sur les acides aminés basiques (histidine, lysine, arginine) et les acides aminés soufrés tels que la cystéine et la méthionine, conduisant à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines (Morel et Barouki, 1998 ; Tratner, 2003).

L'oxydation de ces acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique. Ainsi, ces acides aminés modifiés perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant la signalisation cellulaire (Çanakçi et *al.*, 2005 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006). Par conséquent, les protéines oxydées deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Favier, 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I.1.3.2.3. Altération de l'ADN

L'ADN est également une cible majeure des RL. Ceux-ci peuvent interagir avec le désoxyribose de l'ADN mais aussi avec ses bases (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Ces altérations structurales, lorsqu'elles ne sont pas réparées, entraînent à long terme des mutations pouvant conduire à un cancer (Pincemail et *al.*, 1999).

I.1.3.3. Rôles des radicaux libres

I.1.3.3.1. Rôles physiologiques

À concentrations non cytotoxiques, les RL peuvent intervenir dans le contrôle d'un certain nombre de fonctions cellulaires (Vamecq et *al.*, 2004). Ils sont alors indispensables à l'organisme en participant à divers processus vitaux, tels que la transduction des signaux cellulaires (Huet et Duranteau, 2008). En effet, les RL interviennent comme des médiateurs intra ou extracellulaires, en induisant la réponse cellulaire à de nombreux stimuli physiques (rayons ultraviolets) et chimiques (xénobiotiques) (Berger, 2006). Les RL interviennent également dans la régulation des gènes et le fonctionnement de certaines enzymes (Vamecq et *al.*, 2004 ; Huet et Duranteau, 2008).

Lors des agressions cellulaires majeures, les RL jouent un rôle important dans l'inactivation et la destruction des micro-organismes pathogènes par la peroxydation et la déstabilisation des membranes lipidiques, par oxydation et inactivation de leurs protéines de structure et par oxydation de leur matériel génétique (Demoffarts et *al.*, 2005).

I.1.3.3.2. Rôles pathologiques

Les modifications génomiques, métaboliques et fonctionnelles induites par les RL ont été impliquées dans le développement de différentes pathologies (Berger, 2006). De nombreux travaux indiquent que les RL sont impliqués dans le développement de plusieurs pathologies, à savoir les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, les cancers...etc (Pincemail et *al.*, 2002 ; Berger, 2006 ; Huet et Duranteau, 2008).

I.1.3.3.2.1. Maladies neurodégénératives

Le rôle étiologique du stress oxydant dans les mécanismes de la mort cellulaire au cours des maladies neurodégénératives est évoqué depuis plusieurs années (Desport et Couratier, 2002 ; Huet et Duranteau, 2008), parmi ces affections, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la maladie de Parkinson sont les plus fréquentes (Desport et Couratier, 2002).

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les RL. En outre, le stress oxydant qui caractérise la maladie de Parkinson peut être le résultat d'un dysfonctionnement mitochondrial (Gardès-Albert, 2006).

I.1.3.3.2.2. Athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique (Broisat et *al.*, 2005). L'implication du stress oxydant dans cette pathologie a été initialement révélée par l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL), dont la modification biochimique qui en résulte leur confère un pouvoir athérogène (Beaudeau et *al.*, 2006). La peroxydation induite dans les LDL par les ERO provoque la formation d'aldéhyde (MDA et HNE), qui peuvent à leur tour oxyder ces LDL (Laporte, 2000). Ces dernières sont reconnues par les macrophages au sein desquels elles s'accumulent et forment des cellules spumeuses dont l'accumulation dans l'espace interstitiel contribue au développement de l'athérosclérose (Pincemail et *al.*, 1999 ; Baudin, 2006).

I.1.3.3.2.3. Cancer

La cancérogenèse est un processus complexe multi séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce du cancer. De nombreuses études épidémiologiques renforcent, de plus en plus, l'hypothèse selon laquelle le stress oxydant est directement impliqué dans l'apparition du cancer (Pincemail et *al.*, 1999).

Les cellules possèdent des mécanismes de défense endogènes enzymatiques et non-enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant, que l'on appelle antioxydants, ces derniers ont comme principal rôle de neutraliser et de dégrader les RL toxiques pour les tissus (Debandt, 2002).

I.2. Anti-oxydants

I.2.1. Définition d'un anti-oxydant

Une définition large du terme antioxydant est : « Toute substance qui, présente à faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (Cillard et Cillard, 2006). Les anti-oxydants sont interdépendants en donnant un électron, ils deviennent eux-mêmes des RL qui doivent se rééquilibrer, autrement dit doivent être réduits (Berger, 2006).

I.2.2. Systèmes de défenses

Il existe deux sources de défenses anti-oxydants, l'une endogène est constituée d'enzymes ou d'agents réducteurs (Figure 05), dont l'action est de neutraliser les ERO par leur transformation en molécules stables et non réactives (Koechlin-Ramonatxo, 2006), tandis que l'autre exogène, apportée par l'alimentation (Pincemail et *al.*, 2007).

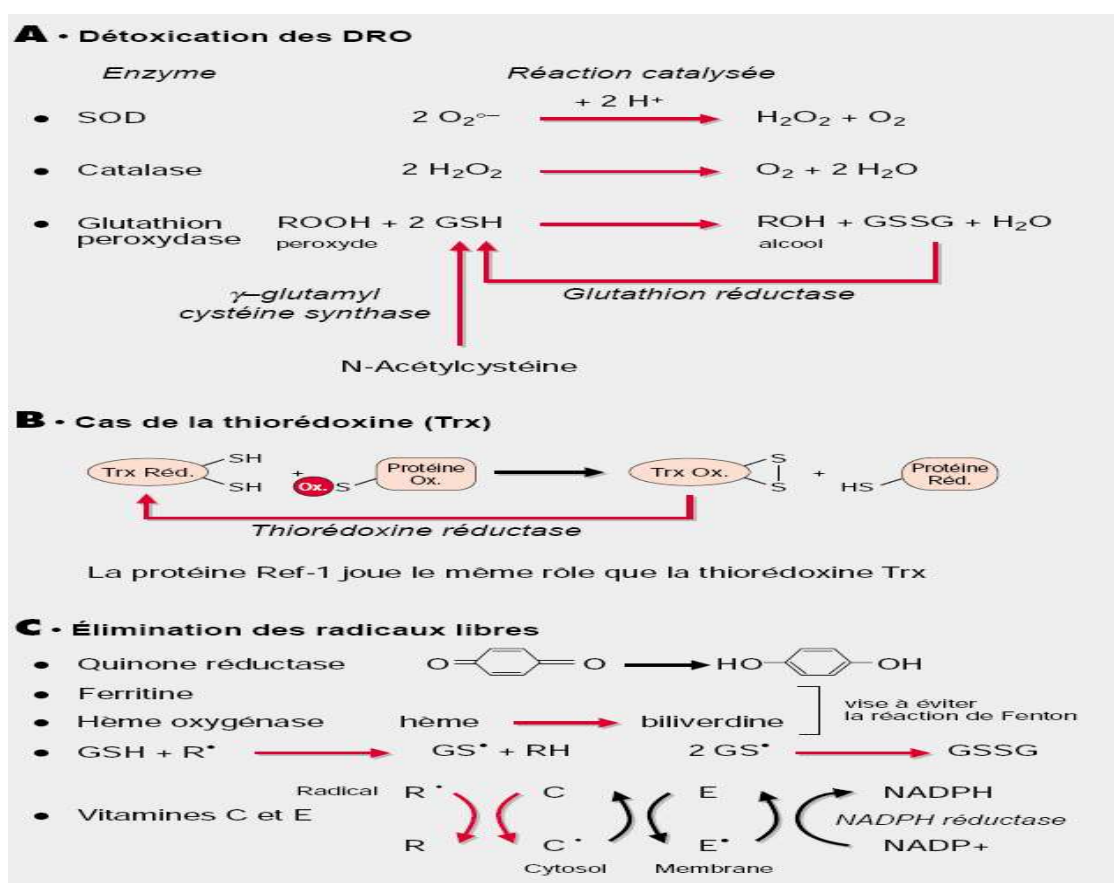


Figure 05 : Systèmes de défense antioxydant (Morel et Barouki, 1998).

I.2.2.1. Système de défense endogène

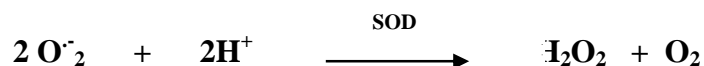
Les antioxydants peuvent être de source endogène, c'est-à-dire synthétisés dans les tissus sous forme d'enzymes antioxydantes et sont considérés comme la première ligne de défense de l'organisme contre les ERO (Bossé et *al.*, 2003).

I.2.2.1.1. Principaux systèmes enzymatiques antioxydants

Il existe de nombreux systèmes enzymatiques antioxydants ; la superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), la catalase (CAT, EC 1.11.1.6) et la glutathion peroxydase (GPX, EC 1.11.1.9), impliqués dans le contrôle physiologique des ERO (Bossé et *al.*, 2003). Aussi bien l'activité que l'expression des gènes codants ces enzymes peuvent être augmentée lors d'un stress oxydant (Demoffarts et *al.*, 2005).

- **Superoxyde dismutase (SOD)**

Elle assure la première ligne de défense contre le stress oxydant (Maneesh et Jayalekshmi, 2006), en catalysant la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ de la manière suivante :



Cette enzyme existe en trois types: une SOD contenant du cuivre et du zinc (Cu/Zn-SOD) ou (SOD1) localisée dans le cytosol des cellules eucaryotes et dans les globules rouges; une SOD contenant du manganèse (Mn) ou (SOD2), située dans les mitochondries, et la SOD3 extracellulaire (EC-SOD) utilise le cuivre et le zinc comme cofacteurs (Pincemail et *al.*, 1998 ; Afonso et *al.*, 2007).

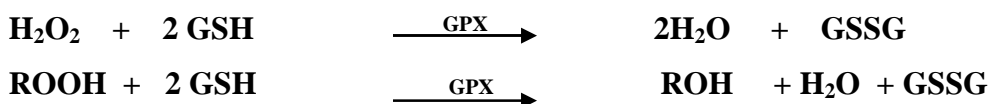
- **Catalase (CAT)**

La CAT est une enzyme tétramérique et héminique à cofacteur fer, localisée dans les peroxysomes de diverses cellules en particulier les hépatocytes et les érythrocytes (Sors, 2004 ; Baudin, 2006). La catalase transforme le peroxyde d'hydrogène en simples molécules d'eau, selon la réaction suivante :



- **Glutathion peroxydase (GPX)**

La GPx détruit le H_2O_2 et tous les peroxydes lipidiques ROOH (où R représente un acide gras polyinsaturé). Il s'agit d'une sélénoenzyme (Se-GPx), cette enzyme située dans le cytosol et les mitochondries des cellules (Salvayre et Salvayre, 2005 ; Baudin, 2006).



La GPX est couplée au système de régénération du GSH (forme réduite active) (Martinez-Cayuela, 1995 ; Baudin, 2006) comme suit :



Cette réaction est catalysée par la glutathion réductase NADPH₂-dépendante ; le cofacteur réduit provient des deux premières réactions de la voie glycolytique des pentoses-phosphates (Martinez-Cayuela, 1995).

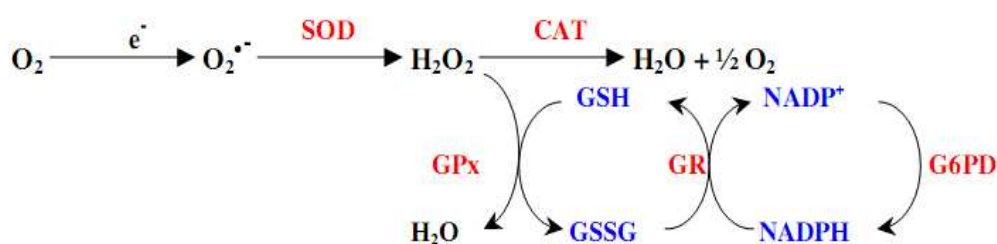


Figure 06: Système de régénération du GSH.

- **Thiorédoxines (TRx) et la Thiorédoxine réductase (TRxR)**

Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH). Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR), qui est une enzyme possédant un groupement sélénocystéine dans son site actif. La TRxR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques, du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Demoffarts et *al.*, 2005).

Plusieurs molécules comme la ferritine, la transferrine et la céruloplasmine permettent de chélater les métaux de transition impliqués dans la formation des radicaux hydroxyles lors des réactions concomitantes de Haber-Weiss et Fenton. Elles sont réparties dans l'organisme et permettent de diminuer la production des ERO (Demoffarts et *al.*, 2005).

I.2.2.2. Système de défense exogène

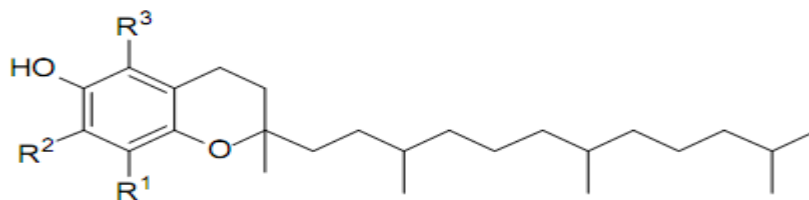
La présence de produits oxydés peut indiquer une insuffisance de systèmes de protection. Pour éviter cette insuffisance, il serait utile d'augmenter le pouvoir antioxydant de l'organisme avec les antioxydants exogènes (Roch, 2003). L'action protectrice des aliments d'origine végétale est donc attribuée à la présence des nutriments antioxydants, spécialement les vitamines antioxydantes telles que les vitamines C et E.

Toutefois, l'activité antioxydante est aussi liée à la présence des composés phénoliques comme les flavonoïdes, qui renforcent l'efficacité du système antioxydant (Rangkadilok et *al.*, 2006 ; Pincemail et *al.*, 2007 ; Fokou et *al.*, 2008).

- **La vitamine E**

Les produits d'origine végétale constituent la source majeure de vitamine E ; les éléments les plus riches étant les céréales et les huiles. La vitamine E fait partie de la famille des tocophérols, qui comprend quatre substances :

L' α -tocophérol, qui est la vitamine E proprement dite, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol (Ricciarelli et *al.*, 2001). Biologiquement, l' α tocophérol est la forme la plus active et la plus efficace (Ricciarelli et *al.*, 2001 ; Zigoneau et *al.*, 2007).



α tocophérol: R1 = R2 = R3 = CH₃

β -tocophérol: R1 = R3 = CH₃ ; R2 = H

γ -tocophérol: R1 = R2 = CH₃; R3 = H

δ -tocophérol: R1 = CH₃ ; R2 = R3 = H

Figure 07: Structure chimique de la famille des tocophérols.

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des membranes biologiques riches en AGPI où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation des lipides (Vamecq et *al.*, 2004). Elle intervient dans la protection des membranes vacuolaires et des lipoprotéines plasmatiques contre les ERO (Pincemail et *al.*, 1998 ; Sebei et *al.*, 2007).

▪ La vitamine C

A l'état naturel, la vitamine C (ou acide ascorbique) est essentiellement trouvée dans les agrumes et les légumes ; elle peut être considérée comme un dérivé cyclique des hexoses. C'est un composé à six carbones, structuralement relié au glucose (Desmettre et Lecerf, 2005 ; Léger, 2006). La vitamine C est une espèce chimique hydrosoluble. Il s'agit d'un antioxydant particulièrement efficace contre les dommages créés dans l'organisme par les RL. Elle empêche l'oxydation des LDL produit par divers systèmes générateurs des ERO et réduit la vitamine E oxydée et la régénère sous sa forme antioxydant active (Sorg, 2004). La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases (Favier, 2003).

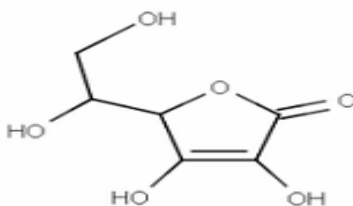


Figure 08: Structure chimique de la vitamine C.

▪ Les caroténoïdes

Les caroténoïdes appartiennent à la famille des tétraterpènes (C40), formé de huit unités isoprènes et sont divisés en deux groupes : les carotènes et les xanthophylles (Guignard, 1979).

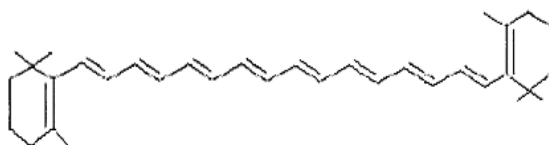


Figure 0 9 : Structure chimique de la β carotène.

Les caroténoïdes sont des pigments largement distribués dans la nature. Près de 800 caroténoïdes ont été identifiés, une quarantaine seulement sont couramment consommés. Certains de ces caroténoïdes sont précurseurs de la vitamine A comme le β - carotène (présent dans les carottes, les pêches, les abricots...), possédant des propriétés antioxydantes importantes (Desmettre et Lecerf, 2007). Elles sont efficaces contre les dommages oxydatifs et ont la capacité de piéger l'oxygène singulet (Dutta, et *al.*, 2005 ; Hu et *al.*, 2008).

Les dérivés végétaux sont extrêmement nombreux à être utilisés principalement dans le domaine des suppléments, qu'il s'agisse des principes extraits de légumes, d'épices, de fruits ou de plantes médicinales. Ils appartiennent à de nombreuses familles chimiques, alcaloïdes, glucosides, dérivés indoliques, mais celle des polyphénols ont donné le plus de molécules (Favier, 2003).

I.3. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes sont l'objet des agressions diverses comme l'invasion par des agents pathogènes, la prédation par des herbivores, ou de stress par des facteurs abiotiques comme les rayons UV. Pour se défendre, elles produisent des molécules appelées « métabolites secondaires » (Bruneton, 1999).

Ces composés naturels sont biologiquement actifs (Ozcelik et *al.*, 2005 ; Abdelwahed et *al.*, 2007), diffèrent largement en terme de structure et de propriétés biologiques et peuvent être classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes (Bruneton, 1999). Ils sont doués de plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques, expliquant ainsi leurs bienfaits sur la santé de l'Homme (Derbel et Ghedira, 2005).

Les plantes ont été largement utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies (Ozcelik et *al.*, 2005 ; Kour et *al.*, 2008 ; Razali et *al.*, 2008). L'explication de l'efficacité supposée de nombreuses plantes médicinales repose sur leur contenu en composés phénoliques (Hannebelle et *al.*, 2004 ; Kour et *al.*, 2008).

I.3.1. Généralités et origines des composés phénoliques

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux (Guignard, 1979 ; Nazck et Shahidi, 2006 ; Loo et *al.*, 2008), ils participent à leur défense contre les agressions environnementales (phytoalexines) (Edeas, 2007). Les polyphénols sont des molécules bioactives (Ghedira, 2005), sujets d'intérêt scientifique grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Falleh et *al.*; 2008). En effet, ces molécules pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antiulcéreuse et même anti-tumorales significatives (Ghedira, 2005 ; Gardeli et *al.*, 2008).

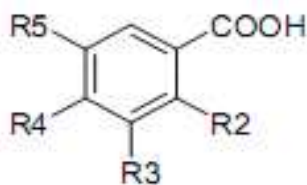
I.3.1.1. Structure et classification des composés phénoliques

Chimiquement, les composés phénoliques peuvent être définis comme des substances possédant un ou plusieurs noyaux aromatiques substitués par un ou plusieurs groupements hydroxyle et/ou méthoxyle (Falleh et *al.*, 2008). Ils sont principalement synthétisés à partir des glucides, via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate. La voie de l'acide shikimique conduisant après transamination et désamination aux acides cinnamiques et à leurs dérivés, tels que les acides benzoïques ou les phénols simples ; celle de l'acétate conduisant aux polyacétates « malonates » (Croteau, et *al.*, 2000 ; Chira et *al.*, 2008), menant par cyclisation à des composés polycycliques, tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones (Martin et Andrina, 2002). Les composés phénoliques sont divisés en trois classes, selon leur structure chimique de base, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins (Vermerris et Nicholson, 2006).

I.3.1.1.1. Acides phénoliques

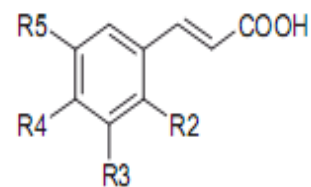
Le terme acide phénolique s'applique à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Bruneton, 1999). Ces acides abondants dans les aliments, peuvent représenter un tiers des composés phénoliques du régime alimentaire. Ils se présentent sous forme d'esters, soit solubles s'accumulant dans les vacuoles, ou bien insolubles comme constituants de la paroi cellulaire (Hannebelle et *al.*, 2004 ; Chira et *al.*, 2008). Les acides phénoliques sont divisés en deux groupes; les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Figure 10).

Ce sont des dérivés en C6 du noyau benzénique, issue de la décarboxylation de l'acide shikimique (Chira *et al.*, 2008).



R2= H ;R3=R4=R5=OH: Acide gallique
 R2= H ;R3=OCH3;R4=OH;R5=H: Acide vanillique
 R2= H ;R3=OCH3;R4=OH;R5= OCH3:Acide syringique

Acides hydroxybenzoïques



R2= H ;R3=H;R4=OH;R5=H: Acide P-coumarique
 R2= H ;R3=OH;R4=OH;R5=H: Acide caféique

Acides hydroxycinnamiques

Figure 10: Structures chimiques des acides phénoliques (Chira *et al.*, 2008).

▪ Acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques présentent une structure en C6-C1, ils sont composés d'un noyau benzénique sur lequel vient s'attacher une chaîne aliphatique à un carbone, tel que l'acide vanillique, l'acide syringique et l'acide gallique (Chira *et al.*, 2008).

▪ Acides hydroxycinnamiques

L'acide cinnamique est un composé C6-C3 produit par une désamination de la phénylalanine, catalysée par la phénylalanine amonialyase, alors que l'acide *p*-coumarique est produit par l'hydroxylation de l'acide cinnamique (Chira *et al.*, 2008). Leur squelette de base est un noyau benzénique avec une chaîne aliphatique à 3 carbones avec un ou plusieurs groupements hydroxyle souvent estérifiés, en ester d'alcool aliphatique. Les acides hydroxycinnamiques communs sont les acides caféique, férulique et sinapique (Chira *et al.*, 2008).

I.3.1.1.2. Flavonoïdes

Le terme «flavonoïde» désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Heim *et al.*, 2002 ; Abubaker *et al.*, 2008 ; Chira *et al.*, 2008). Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux, qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Plus de 4000 variétés de flavonoïdes ont été identifiées chez les plantes (Middleton *et al.*, 2000 ; Verhoeyen *et al.*, 2002). Ils existent d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires où ils peuvent être localisés dans divers organes ; racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (Hodek *et al.*, 2002 ; Chira *et al.*, 2008).

A l'état naturel, ils se trouvent très souvent sous forme de glycosides conjugués avec les oses tels que le glucose, le rhamnose et l'arabinose (Rice -Evans *et al.*, 2001 ; Heim *et al.*, 2002 ; Peluso, 2006) . Les flavonoïdes sont un groupe hétérogène de composés phénoliques ayant une origine biosynthétique commune et par conséquent possèdent tous un même squelette de base (Florian *et al.*, 2006), qui est un noyau flavane, constitué de quinze atomes de carbone, formant une structure en C₆-C₃-C₆, soit de deux noyaux aromatiques reliés par un pont de trois carbones (figure 11) (Pietta, 2000 ; Nay *et al.*, 2002 ; Brusselemens *et al.*, 2005). Cette structure de base peut subir de nombreuses substitutions, modifiant la solubilité des flavonoïdes. Les hydroxylations et les glycosylations rendent les composés généralement plus hydrophiles, alors que la méthylation les rend plus lipophiles (Chira *et al.*, 2008).

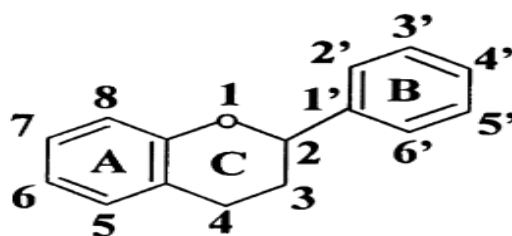


Figure 11 : Structure chimique de base des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002)

La substitution et l'état d'oxydation de l'hétérocycle, la présence ou l'absence d'une double liaison C₂-C₃ et la position du noyau B constituent le principe de base de la classification des flavonoïdes (Scalbert et Williamson, 2000 ; Peluso, 2006).

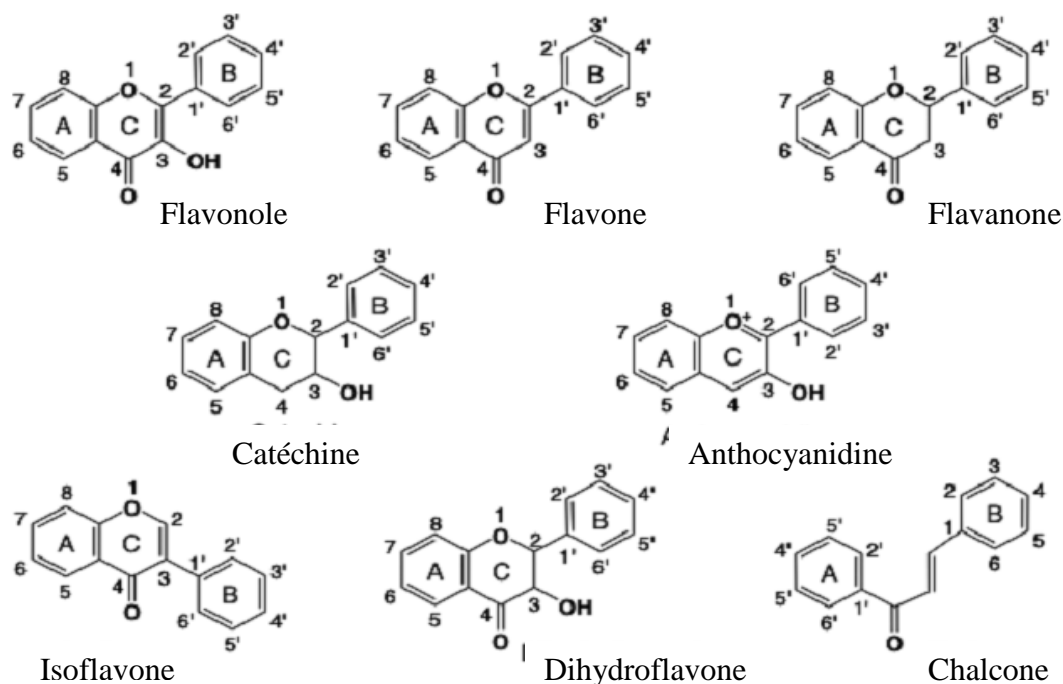


Figure12: Structure chimique de base de différents flavonoïdes (Peluso ,2006).

I.3.1.1.3. Tannins

Ce sont des substances de structure polyphénolique, solubles dans l'eau et dans les solvants organiques, avec un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (Berthod *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 2007). Il est bien établi que les tannins forment des complexes avec les protéines et par conséquent empêchent leur utilisation par les microorganismes et l'animal hôte (Lassouad *et al.*, 2004). Sur le plan structural, les tannins sont divisés en deux groupes ; les tannins condensés (tannins catéchiques) et les tannins hydrolysables (Ghedira, 2005 ; Gardeli *et al.*, 2008). Les tannins sont doués d'un pouvoir antioxydant : c'est ainsi que les tannins hydrolysables inhibent la peroxydation des lipides et que les tannins condensés inhibent la formation des superoxydes (Ghedira, 2005 ; Gardeli *et al.*, 2008).

▪ Tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont largement répandus chez les végétaux (Ghedira, 2005 ; Gardeli *et al.*, 2008). Ce sont des esters de glucides et d'acides phénoliques contenant plusieurs cycles aromatiques (polyphénols polyhydroxy), comme les gallotannins et les ellagitannins, qui ont la capacité de former avec les protéines des complexes indigestes et de chélater les métaux lourds comme le Pb^{2+} (Liang *et al.*, 2008).

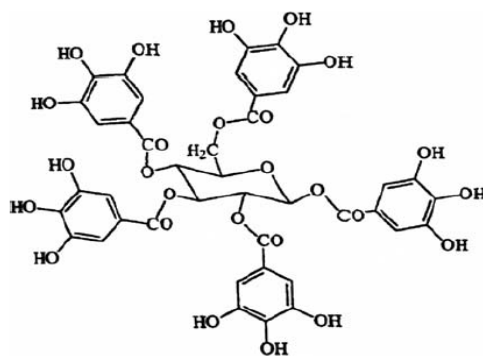


Figure 13: Structure chimique des tannins hydrolysables (Liang *et al.*, 2008).

▪ Tannins condensés non hydrolysables ou tannins catéchiques

Les tannins condensés proviendraient de la condensation des molécules de flavan-3-ols (Boughdad *et al.*, 1986 ; Oszmianski *et al.*, 2007) et sont liés entre eux par des liaisons carbone-carbone le plus souvent 4-8 ou 4-6 (Bruneton, 1999 ; Manach *et al.*, 2004 ; Haslam, 2007)

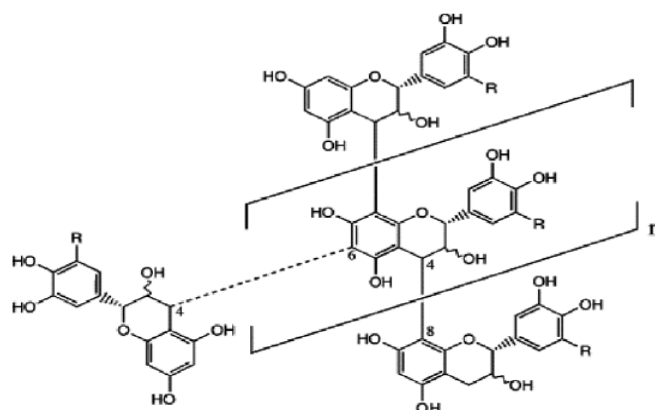


Figure14 : Structure chimique des tannins condensés (Liang et *al.*, 2008).

I.3.2. Activités biologiques des composés phénoliques

Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, s'avèrent être des molécules possédant des actions biologiques très diversifiées (Edeas, 2007).

I.3.2.1. Action préventive des maladies cardiovasculaires

Il a été suggéré que la modification oxydative des LDL est la cause principale de l'athérosclérose (Rice-Evans, 2001; Loo et Cheung, 2005). De nombreuses études épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre le risque cardiovasculaire et la consommation des composés phénoliques d'origine naturelle (Anila 2002 ; Tourniere, 2008). Certains flavonoïdes comme la catéchine, l'épicatéchine et la quercétine sont considérés comme des agents cardio-protecteurs, en protégeant les LDL humains contre l'oxydation (Verhoeven et *al.*, 2002 ; Lacopini et *al.*, 2008).

Il est connu que les polyphénols peuvent moduler les teneurs en NO[•], en agissant sur les phosphodiésterases (PDE) présents dans les cellules endothéliales ; l'inhibition des PDE par les polyphénols augmente le niveau de NO[•] dans les cellules endothéliales (Martin et Andriantristohaina, 2002).

I.3.2.2. Activité anti-inflammatoire

Les deux enzymes cyclooxygénases (Cox1 et Cox2) interviennent dans les deux premières étapes du métabolisme de l'acide arachidonique, pour aboutir à la formation des prostaglandines, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoire (Wakabayashi et Yasui, 2000 ; Knodler et *al.*, 2008). L'acide arachidonique peut être également métabolisé par la voie de la lipo-oxygénase aboutissant à la formation de leucotriènes (Knodler et *al.*, 2008).

Les polyphénols les plus doués de cette activité semblent être les flavonoïdes ; en effet, l'épicatchine et les procyanidines inhibent l'activité de la 5-lipo-oxygenase qui, induit la formation de leucotriènes (Knodler et *al.*, 2008).

Le résvératrol est capable d'affecter le processus inflammatoire principalement par l'inhibition de l'expression des gènes codant pour COX1 et COX2 (Lacopini et *al.*, 2008). Les extraits de l'écorce de *Mangifera indica* (Anacardiaceae), contenant une variété d'acides phénoliques, de phénols et de flavanols ont exhibé une activité anti-inflammatoire, en inhibant l'induction de prostaglandineE (PGE) et leucotriène B4 (LTB4) libérés par les macrophages de souris (Ling et *al.*, 2009).

I.3.2.3. Activité anti-microbienne

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques, dont plus de 6000 sont d'origine végétale (Keita et *al.*, 2004). Plusieurs études ont été menées sur l'inhibition de la croissance des microorganismes par des composés phénoliques (Cowan, 1994 ; Karou et *al.*, 2005 ; Amarowicz et *al.*, 2008). Une étude menée par Cowan (1994) a montré que plusieurs classes de composés phénoliques comme les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins interviennent dans le mécanisme de défense de la plante contre les microorganismes pathogènes.

Selon des études antérieures, les extraits aqueux de *Tamarindus indica*, à la dose de 300µg/ par disque ont montré des propriétés antibactériennes sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa* ; ces propriétés antibactériennes pourraient être attribuées à la présence de nombreux composés polyphénoliques et des anthocyanidines (Rokia et *al.*, 2006).

I.3.2.4. Activité anticancéreuse

Dans le domaine des anticancéreux, nombreuses sont les molécules cytotoxiques qui sont d'origine végétale et qui sont largement utilisées en chimiothérapie, citons par exemple la colchicine, la podophyllotoxine et le taxol (Abdeldjebbar et *al.*, 2006).

Des études effectuées sur des modèles animaux suggérant que les polyphénols peuvent inhiber le développement du cancer, l'extrait dichlorométhane de feuilles de *Withanica adpressa*, plante endémique saharienne de la famille des Solanacées présente un effet cytotoxique très élevé (IC₅₀ = 0,2-5 µg /ml) pour les lignées cellulaires humaines, comparable à celui obtenu avec le nocodazol, substance utilisée comme agent antimitotique de contrôle (Abdeldjebbar et *al.*, 2006).

Des études ont mis en évidence l'action du résvératrol à différents stades de la carcinogenèse. Ce stilbéne inhibe la formation des RL dans les cellules tumorales humaines (phase d'initiation) et inhibe également la cyclooxygénase *in vitro*, une enzyme intervenant dans la phase de promotion. En plus, ce composé peut induire la synthèse de la quinone réductase dans les cellules hépatiques de souris, permettant ainsi une détoxification des carcinogènes (Krisa *et al.*, 1997). Par ailleurs, il a été montré que les flavonoïdes peuvent contribuer à la prévention du cancer par divers mécanismes : par piégeage des RL, détoxification de xenobiotiques mutagéniques et inhibition des topoisomérases (Brusselemens *et al.*, 2005).

I.3.2.5. Activité anti-oxydante

L'intérêt porté aux antioxydants naturels ne cesse de croître ces dernières années ; Ceux-ci représentent une alternative à l'utilisation d'antioxydants synthétiques tel que le butylhydroxytoluène (BHT) ou le butylhydroxyanisole (BHA) (Benhamou *et al.*, 2008). Ils sont étudiés dans le but de trouver de nouvelles structures modèles pour le développement des médicaments thérapeutiques ou protecteurs (Ghedira, 2005 ; Gardeli *et al.*, 2008).

Les polyphénols sont des antioxydants efficaces, capables de piéger les RL générés en permanence par l'organisme (Bossé *et al.*, 2003 ; Lahouel *et al.*, 2004). Meterc et ses collaborateurs (2008) ont montré que les polyphénols sont des antioxydants plus puissants que les vitamines antioxydantes (vitamines C et E). A titre d'exemple, l'épicatéchinegallate extrait du thé vert est un puissant antioxydant ; il est au moins 25 à 100 fois plus efficace que la vitamine E et C, respectivement (Pietta, 2000 ; Meterc *et al.*, 2008).

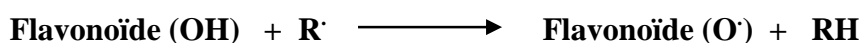
I.3.2.5.1. Mode d'action des composés phénoliques

La structure des polyphénols est l'élément clé de leur activité antioxydante. Il existe une forte corrélation entre l'arrangement spatial des substituants et l'activité antioxydante. En effet, la configuration ainsi que le nombre total des groupements hydroxyles influencent fortement les mécanismes de l'activité antioxydante (Heim *et al.*, 2002).

L'effet protecteur des antioxydants naturels sur la santé est dû à leur capacité d'inhiber les RL par donation de l'hydrogène à l'espèce radicalaire, par chélation des ions métalliques de transition (inhibition de la réaction de Fenton), par l'inhibition des enzymes productrices des RL comme les lipo-oxygénases et les cyclo-oxygénases ou par l'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes comme la SOD, la CAT et la GPX (Halliwell, 2008 ; Razali *et al.*, 2008).

I.3.2.5.1.1. Piégeage des espèces réactives de l'oxygène

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante (Nijvedt et *al.*, 2001 ; Havsteen, 2002 ; Ghedira, 2005), parce qu'ils sont susceptibles de réagir avec la plupart des ERO (Rice-Evans, 2001 ; Heim et *al.*, 2002). A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les RL oxydants (Rice-Evan, 2001), cela est probablement lié aux groupements phénoliques hydroxyles attachés aux structures cycliques. Ils inactivent les RL selon la réaction suivante :



La présence des groupements catéchols dans le cycle B (dihydroxylé) confère aux flavonoïdes la capacité de donner un atome d'hydrogène ou un électron, afin de stabiliser le radical. En effet, il a été démontré que les groupements hydroxyles du cycle B étaient responsables du potentiel antioxydant de la molécule de quercétine (Nijvedt et *al.*, 2001 ; Heim et *al.*, 2002).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des antioxydants, notamment les flavonoïdes et leur capacité à piéger les RL (Pietta, 2000 ; Heim et *al.*, 2001). Il a été établi que l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes nécessite :

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

Ces caractéristiques structurelles contribuent à augmenter la stabilité du radical flavonoxyl (Pietta, 2000 ; Middleton et *al.*, 2000).

➤ Importance de la structure *ortho*-diphénolique du cycle B

L'oxydation des flavonoïdes se produit dans le cycle B lorsque le groupement catéchol est présent, conduisant à un radical *ortho* semiquinone assez stable (Heim et *al.*, 2001).

Une comparaison de quelques exemples de flavonoïdes (la morine avec deux groupements hydroxyles en *méta* et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle) sont moins actifs que la quercétine qui possède deux groupements hydroxyles en *ortho* (annexe1).

La présence d'un troisième groupe OH sur le cycle B diminue légèrement l'activité antioxydante (Rice-Evan, 2001).

➤ **Rôle de la double liaison entre C₂-C₃ et le groupement 4-oxo**

L'une des différences structurales distinctes dans la classification des flavonoïdes est la présence ou l'absence d'insaturation entre C₂ et C₃, en plus de la présence ou l'absence de la fonction 4-oxo (Pietta, 2000). La majorité des recherches indiquent que les flavonoïdes dépourvus, de l'une ou deux de ces caractéristiques structurales, sont des antioxydants plus faibles comparés à ceux présentant les deux caractéristiques (Heim et *al.*, 2001).

En outre, les flavonoïdes présentant une double liaison C₂ et C₃ conjuguée avec le groupement 4-oxo montrent des valeurs de IC₅₀ inférieures à celles obtenues par les hétérocycles saturés (Heim et *al.*, 2001).

➤ **Rôle du groupement 3-OH sur le cycle C**

Les flavonols et les flavones contenant le groupement catéchol sur le cycle B sont très réactifs ; cependant, l'absence du groupement 3-OH chez les flavones expliquerait leur faible activité antioxydante par rapport aux flavonols (Pietta, 2000 ; Rice-Evan, 2001). En effet, la grande capacité de la quercétine à inhiber les dommages oxydatifs induit par les ERO est due à son substituant 3-OH, qui augmente la stabilité des radicaux flavonoïdes. Aussi, ce groupement agit en influençant la planarité de la molécule, et donc la conjugaison, la délocalisation des électrons et une augmentation de la stabilité des radicaux flavonoïdes (Heim et *al.*, 2001). La quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Rice-Evan, 2001). La substitution de groupements hydroxyles par un groupement méthyl ou glycosyl réduit l'activité de la quercétine et du kaempferol (Heim et *al.*, 2001).

La différence dans l'activité antioxydante de flavonoïdes poly-hydroxylés et poly-méthoxylés est probablement due à la différence dans l'hydrophobicité et la planarité moléculaire, la quercétine est un puissant scavenger du radical peroxy, suivit par les dérivés O-méthoxylé et O-glycosylé (Heim et *al.*, 2002). Le remplacement du groupement hydroxyle à la position 3-OH de la quercétine par un disaccharide rutinosé diminue légèrement leur activité (Rice-Evan, 2001; Heim et *al.*, 2002).

I.3.2.5.1.2. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, en intervenant dans la constitution des hémoprotéines et dans certaines enzymes antioxydantes comme la catalase et la superoxyde dismutase (Cotelle, 2001). Le fer est connu comme le prooxydant le plus important dans la peroxydation lipidique à cause de sa grande réactivité et peut participer dans la génération du radical hydroxyle, selon la réaction de Fenton (Cotelle, 2001 ; Ghedira, 2005 ; Gardeli *et al.*, 2008).

Heim et ses collaborateurs (2001) ont démontré que les flavonoïdes comme le kaempferol chélatent les ions métalliques grâce à leurs groupements carbonyles. Selon Rice-Evan (2001), les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont :

- le noyau catéchol sur le cycle B
- les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C
- les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C

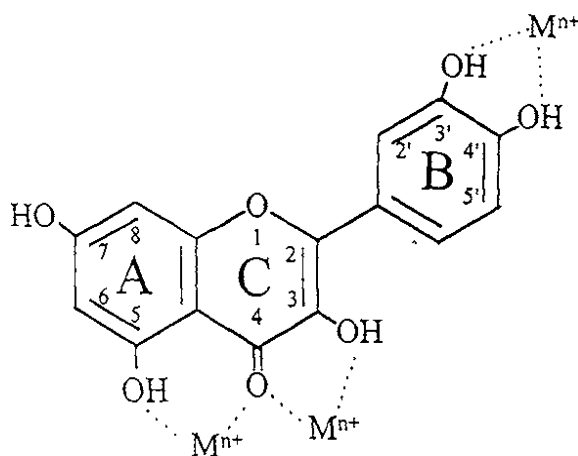


Figure 15 : Sites proposés pour la chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Rice-Evan , 2001)

Les composés ayant une structure qui contient deux ou plusieurs groupements fonctionnels suivant : $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $\text{C}=\text{O}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NR}_2$, $-\text{S}-$ et $-\text{O}-$ peuvent montrer une activité chélatrice du métal. En effet, le curcumin (diferuoyl methane), un composé phénolique majeur isolé à partir de la plante *Curcuma longade*, montre une capacité de chélater le fer ferreux de 56.7 % à $15\mu\text{g/ml}$ (Ak et Gulcin, 2008). Cette activité chélatrice de curcumin est due à la présence de groupements hydroxyl et méthoxyl (Figure16).

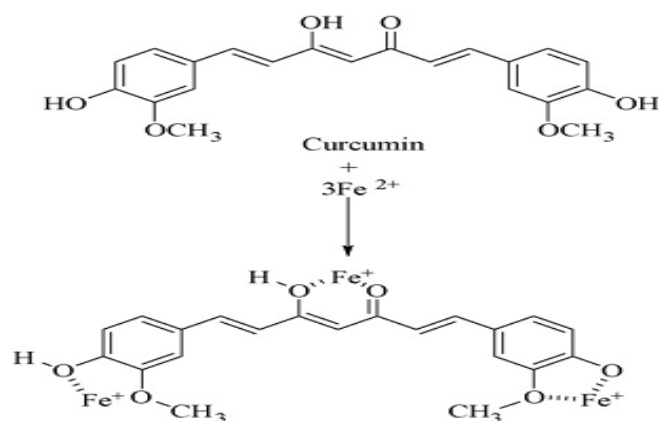


Figure 16 : Complexe curcumin- Fe²⁺ (Ak et Gulcin, 2008)

En évaluant l'activité antioxydante des extraits de différentes plantes, appartenant à différentes familles (utilisées largement dans la médecine traditionnelle arabe), sur les homogénats hépatiques ayant subi une peroxydation lipidique induite par le Fe²⁺, Ljubuncic et ses collaborateurs (2005) ont démontré que les extraits de *Teucrium polium* (Rhamnaceae) et de *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) ont exhibé des valeurs d'inhibition de 74.5 % et 74.1 %, respectivement.

I.3.2.5.1.3. Inhibition enzymatique

La xanthine oxydase est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde. Les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et peuvent faire régresser la maladie de la goutte, en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (Nijveldt et *al.*, 2001).

Des études ont montré la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité inhibitrice de la xanthine oxydase, plusieurs facteurs impliqués dans la liaison des flavonoïdes avec le site actif de la xanthine oxydase (Cos et *al.*, 1998 ; Nijveldt et *al.*, 2001).

La double liaison entre les groupement C₂ et C₃, responsable de la structure planaire des flavonoïdes, est essentiels pour l'inhibition de la xanthine oxydase. La modélisation moléculaire montre que les groupements hydroxyle en C₅ et C₇ et le groupement carbonyle en C₄ contribuent favorablement aux liaisons hydrogènes et aux interactions électrostatiques entre les flavonoïdes et le site actif de la xanthine oxydase (Cos et *al.*, 1998 ; Nijveldt et *al.*, 2001).

Les flavonoïdes sont aussi de bons inhibiteurs des enzymes responsables de la production des RL comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Nijveldt et *al.*, 2001).

Notre travail porte sur l'étude de l'activité anti-radicalaire des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* à savoir : l'évaluation des activités anti-DPPH, anti-H₂O₂ et anti-OH, le fractionnement des extraits ayant montré une activité anti-radicalaire élevée vis-à-vis de ces radicaux, ainsi que la caractérisation des fractions actives par chromatographie sur couche mince, afin de mettre en évidence les composés responsables de cet effet.

Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal

Cette étude a été réalisée sur les feuilles et les graines de *Pistacia lentiscus* (Figure 17).

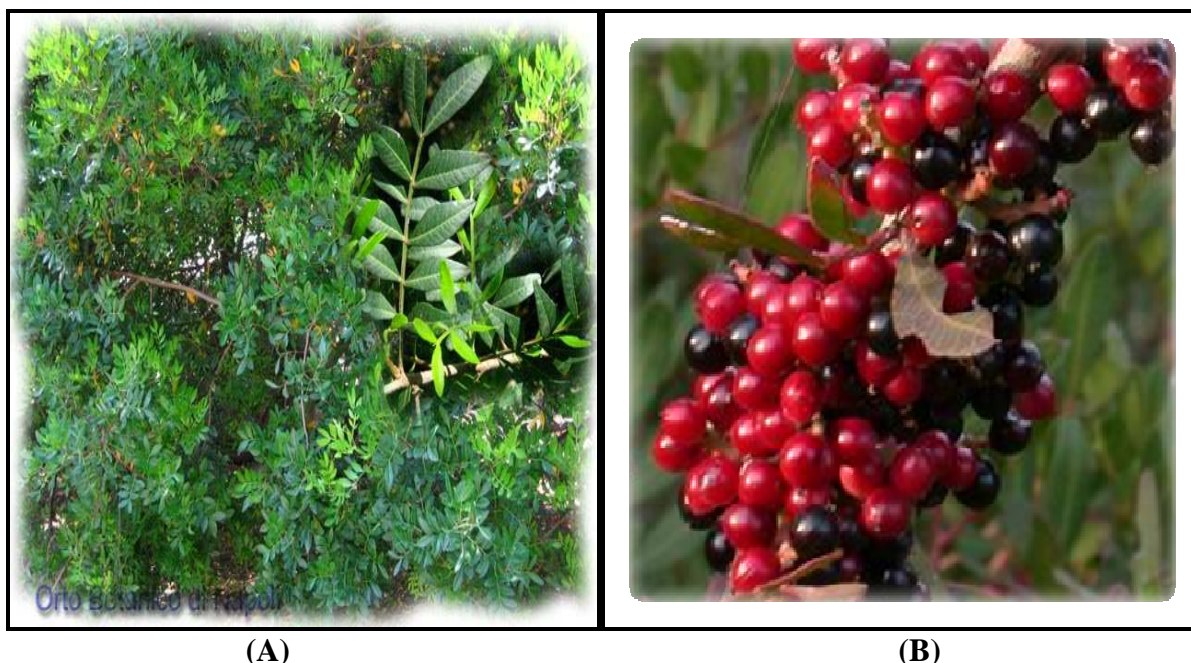


Figure 17: Photographies des feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

II.1.1. Classification

Règne : Plantea

Famille : Anacardiaceae

Genre: Pistacia

Espèce: *Pistacia lentiscus*

Nom français : Lentisque, pistachier

Nom local: Amadagh, Thidekth

II.1.2. Données générales sur l'espèce *Pistacia lentiscus*

Pistacia lentiscus appartient à la famille des Anacardiaceae et pousse sur tout le bassin méditerranéen. En Algérie, elle est très répandue sur le littoral. Dotée d'une odeur aromatique, la plante contient plusieurs familles de composés (huiles essentielles, polyphénols, tannins...etc), auxquels reviennent ses propriétés thérapeutiques et son utilisation dans divers domaines, notamment en médecine traditionnelle (Triantafyllou et *al.*, 2007 ; Benhamou et *al.*, 2008). Parmi les principaux composés identifiés à partir de cette plante, la myricétine, la quercétine, la cyanidine, l'acide vanillique et l'acide caféique (Benhamou et *al.*, 2008).

Pistacia lentiscus est un arbrisseau touffu toujours vert et peut atteindre 1 à 8 mètres de hauteur (Abdelwahed et al., 2007 ; Longo et al., 2007). Les fruits sont légèrement globulaires, d'abord rouges puis noirs à la maturité (Abdelwahed et al., 2007 ; Charef, et al., 2008) ; par incision, on obtient une résine d'odeur forte en larme jaune pâle ; le mastic chio (Triantafyllou et al., 2007).

II.1.3. Composition chimique et activités thérapeutiques

Les études pharmacologiques qui ont été effectuées sur *Pistacia lentiscus* ont révélé que les composés contenus dans cette plante ont des activités anti-microbiennes (Longo et al., 2007 ; Benhamou et al., 2008), contre les ulcères gastriques (Triantafyllou et al., 2007) et anti-inflammatoires (Longo et al., 2007). Elle est utilisée dans le traitement de l'eczéma, la paralysie, l'infection de la gorge, l'asthme, ainsi que des propriétés astringentes (Abdelwahed et al., 2007; Longo et al., 2007). En effet, les fruits, l'écore, la résine et les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont une longue tradition dans la médecine populaire (Benhamou et al., 2008). Les fruits du pistachier donnent une huile comestible riche en acides gras insaturés tels que les acides oléique et linoléique (Charef et al., 2008).

II.1.4. Récolte de la plante

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été récoltées en juillet 2008, et les graines en novembre de la même année dans un endroit loin de la pollution dans la forêt d'Azru n Bechar, commune d'Amizour située à l'est de Bejaia.

II.1.4.1. Broyage et tamisage

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été séchées pendant la période de Juillet-Août à l'air libre, alors que les graines ont été séchées à l'étuve à une température de 37 C°, ensuite les échantillons de la plante (feuilles et graines) ont été broyés par un broyeur électrique de marque Kika Labortechnik. Le broyat de feuilles a été tamisé à travers des tamis de différentes granulométries, afin de pouvoir récupérer la poudre fine de granulométrie inférieure à 63 µm ; cependant, le broyat de graines, était sous forme d'une pâte visqueuse.

II.1.4.2. Extraction des composés phénoliques

Le protocole d'extraction appliqué est celui de Chiang et al. (1994), avec quelques modifications (Figure 18). Le principe de cette méthode est basé sur l'extraction sélective de composés phénoliques en fonction de la polarité de différents solvants.

La première étape de ce protocole est une extraction solide-liquide ; le broyat obtenu des feuilles et des graines a été macéré dans l'éthanol à 95 % avec un rapport de (1:4 / p:v) pendant 24 heures sous agitation. La suspension obtenue a subi une décantation pendant 12 heures suivi d'une centrifugation à 1500g durant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse de marque Sigma, afin de récupérer le surnageant. Ce dernier a été séché à l'air libre et à température ambiante jusqu'à l'évaporation totale du solvant.

La deuxième étape consiste en une partition de l'extrait éthanolique dans un mélange d'acétate d'éthyle et d'eau suivant les rapport 1:3:1 (p/v/v). Après 12 heures de macération, la décantation subséquente a donné naissance à deux phases distinctes, organique et aqueuse. Les deux phases ont été récupérées, séchées séparément et pesées. L'extrait organique (acétate d'éthyle) est divisé en deux, une partie mise dans un mélange (hexane-eau) et l'autre dans un mélange (chloroforme-eau), avec un rapport (3:1) (v/v). Après 12 heures de macération, les deux phases résultantes ont été séparées et mises à sécher jusqu'à évaporation totale du solvant. Le taux d'extraction a été évalué comme suit :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_1 - P_0)/E] 100$$

P_0 : poids vide du cristalliseur ou boîte de pétri.

P_1 : poids après évaporation.

E : poids de l'échantillon initial (poudre ou extrait sec de la phase précédente (g)).

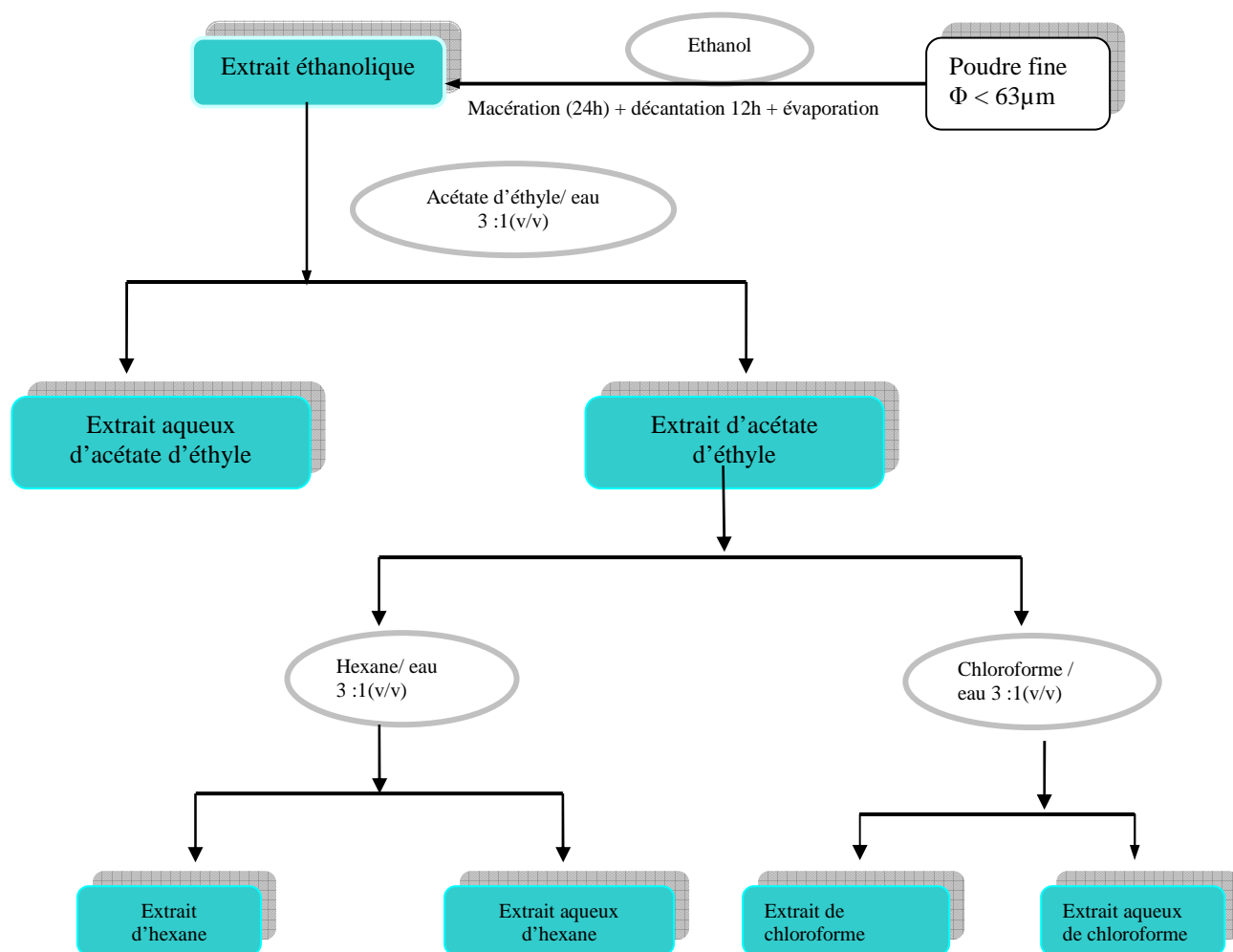


Figure 18 : Protocole de l'extraction des composés phénoliques (Chiang et al., 1999).

II.2. Dosage des composés phénoliques des extraits de *Pistacia lentiscus*

II.2.1. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux dans les différents extraits de *Pistacia lentiscus* a été estimée selon la méthode de Folin–Ciocalteu préconisée par Singleton et Rossi (1965) in Kahkonen et al. (1999). Cette méthode est basée sur la réaction des composés phénoliques avec le réactif de Folin–Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

A 200 µl de l'extrait ont été ajoutés 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 800 µl de carbonate de sodium (7,5 %). Le mélange est laissé incubé pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance a été mesurée à 765 nm contre un blanc sans extrait. La teneur des phénols totaux est exprimée en milligramme équivalent catéchine par gramme d'extrait (mg EqCat/g d'extrait), en se référant à une courbe d'étalonnage effectuée dans les mêmes conditions de dosage (annexe 2).

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

La détermination de la teneur en flavonoïdes des différents extraits de *Pistacia lentiscus* a été effectuée selon la méthode de Mimika-Dukié (1992) in Maksimović et al. (2005), avec quelques modifications. La méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à chélater des métaux (chlorure d'aluminium) et de former un complexe de coloration jaunâtre (Ribéreau-Gayon, 1968).

2 ml de l'extrait préparé dans le méthanol (1mg/ml) ont été ajoutés à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (133mg de chlorure d'aluminium et 400mg d'acétate de sodium cristalline dans 100 ml d'eau distillée). Après 10 minutes, l'absorbance est enregistrée à 430 nm. Les teneurs des flavonoïdes ont été déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la rutine et sont exprimées en milligramme d'équivalent de rutine par gramme d'extrait (mg Eq R /g d'extrait) (annexe 2).

II.2.3. Dosage des tannins

Le dosage des tannins a été effectué selon la méthode d'Hagerman et Butler (1978), qui est basée sur la formation d'un précipité entre les tannins et la BSA (l'albumine du sérum bovin). Le précipité a été récupéré et dissout à pH élevé en présence d'un détergent (SDS/TEA), et le complexe coloré d'ion ferrique-tannins est mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 510 nm.

Un volume de 2 ml de la solution de BSA et 1 ml de la solution de l'extrait de plante ont été mélangés et incubés pendant 24 heures à 4°C. Le mélange subit une centrifugation à 3000g pendant 15 minutes et le culot a été récupéré et dissout dans 4 ml de la solution SDS/TEA. Enfin, 1ml de FeCl₃ a été ajouté à la solution, puis vortexé immédiatement. Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 510nm contre un blanc contenant 1 ml du réactif FeCl₃ et 4ml de la solution SDS/TEA. La teneur en tannins a été estimée par rapport à une courbe d'étalonnage, en utilisant l'acide tannique comme référence et exprimée en mg d'équivalent acide tannique /g d'extrait (mg E AT/g) (annexe 2).

II.3. Mesure du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits de *Pistacia lentiscus* a été déterminé selon la méthode de Oyaizu et *al.* (1986) in Atmani et *al.* (2009). Le pouvoir réducteur est l'aptitude des antioxydants présents dans l'extrait à donner un électron ; ce dernier réduit le fer ferrique Fe^{3+} (FeCl_3) en fer ferreux Fe^{2+} (FeCl_2) en présence d'un agent chromogène, le ferricyanure de potassium $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Le virage de la couleur jaune de ce dernier vers une couleur bleue verte dépend du pouvoir réducteur de l'extrait (Benhamou et *al.*, 2008).

Un volume de 1ml d'extrait de plante est additionné à 2,5ml de tampon phosphate (0,2M, pH 6,6) et 2,5ml de ferricyanure de potassium $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ à 1 %. Après incubation à 50°C pendant 20 min, 2,5 ml de l'acide trichloroacétique (TCA à 10%) ont été ajoutés au mélange, puis centrifugé pendant 10 min à 1500g. Le surnageant (2,5 ml) a été récupéré, puis mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique (FeCl_3 à 0,1 %) et l'absorbance a été mesurée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance indique une augmentation du pouvoir réducteur. Le même test a été réalisé avec des molécules de référence (l'acide tannique et l'acide gallique), avec les mêmes concentrations que les extraits. Tous les tests ont été réalisés en trois répliques.

II.4. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de *Pistacia lentiscus*

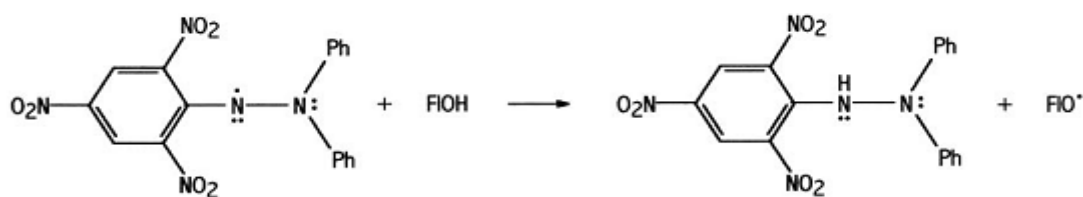
II.4.1. Activité scavenging du radical DPPH \cdot par les extraits de *Pistacia lentiscus*

L'activité scavenging des extraits de *Pistacia lentiscus* contre le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH \cdot) a été évaluée selon la méthode de Massuda et *al.* (1999) in Zhang et *al.* (2009) avec quelques modifications.

Les antioxydants présents dans les extraits de la plante (AH) pouvant donner un hydrogène (tels que les groupements hydroxyles des composés phénoliques), réduiront le DPPH \cdot qui est un radical libre, stable et accepteur d'hydrogène (Mohcen et Ammar, 2009). La réaction peut se résumer comme suit:



La réduction de DPPH s'accompagne par le virage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution, mesurable à 517 nm.

DPPH[•] (Violet)

flavonoïde

DPPH-H

radical phenoxy

Une quantité du radical DPPH[•] (50 µl, 5mM) préparée dans le méthanol a été ajoutée à 2,45 ml de la solution de différents extraits. Après incubation à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le même test a été réalisé avec des molécules de référence (quercétine, catéchine et acide tannique), avec les mêmes concentrations que les extraits. Tous les tests ont été réalisés en trois répliques. Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH[•] est calculé comme suit :

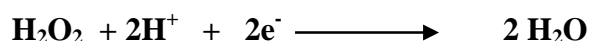
$$\% \text{ d'activité scavenging de radical DPPH}^{\bullet} = [(A_0 - (A_1 - A_S)) / A_0] \cdot 100$$

Avec :

A₀ : Absorbance de la solution contrôle (la solution DPPH[•]).A₁ : Absorbance de la solution DPPH[•] + extrait.A_S : Absorbance de l'échantillon de la solution d'extrait sans le DPPH[•]

II.4.2. Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par les extraits de *Pistacia lentiscus*

Le principe de ce test est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par un antioxydant qui va faciliter sa décomposition en molécules d'eau (Wang et al., 2007), selon la réaction suivante :



La capacité des extraits de *Pistacia lentiscus* à piéger le peroxyde d'hydrogène a été déterminée selon la méthode de Ruch et al. (1989) in Lu et Chen, (2008), avec quelques modifications.

Une solution de peroxyde d'hydrogène (45 mM) a été préparée dans le tampon phosphate (pH 7,4). La concentration de peroxyde d'hydrogène a été déterminée spectrophotométriquement à 230 nm en utilisant, le coefficient d'extinction molaire de H₂O₂, qui est de 81 mole⁻¹.cm⁻¹.

2 ml de l'extrait ont été ajoutés à une solution de H₂O₂ (1,2ml) et le mélange réactionnel a été incubé à température ambiante pendant 10 min, puis l'absorbance a été enregistrée à 230 nm.

Le même test a été réalisé avec des molécules de référence (quercétine, acide tannique et acide coumarique), avec les mêmes concentrations que les extraits.

Tous les tests ont été réalisés en trois répliques. Le pourcentage de l'activité scavenging du H₂O₂ est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité scavenging du H}_2\text{O}_2 = [A_{\text{Cont}} - A_{\text{test}}] / A_{\text{Cont}} \cdot 100$$

Tels que :

A_{Cont} : l'absorbance du contrôle qui consiste en la solution du H₂O₂.

A_{test} : l'absorbance du H₂O₂ en présence de l'extrait.

II.4.3. Activité scavenging du radical hydroxyle par les extraits de *Pistacia lentiscus*

La mise en évidence de la formation du radical hydroxyle (OH[•]) n'est pas facile à cause de sa réactivité et de sa durée de vie très courte. En plus, il se trouve généralement en concentration très faible. Pour le détecter, des méthodes dites indirectes sont utilisées, qui détectent les produits de sa réaction, en mesurant l'oxydation et/ou la décomposition de certains substrats cibles, tels que le désoxyribose.

Le degré de l'oxydation du désoxyribose est apprécié par la méthode de Halliwell et Gutteridge, (1987) in Kaur et al. (2008). Ce test consiste à mettre une solution de désoxyribose (2mM) dans un tampon phosphate (20mM, pH 7,4) en présence de l'EDTA (100µM), FeCl₃ (100µM), une solution de H₂O₂ (20mM) et l'acide ascorbique (100mM), ainsi que les différents extraits à étudier à 100µg/ml. Après incubation à 37°C pendant une heure, une solution de l'acide trichloroacétique (TCA à 2%) a été additionnée au mélange réactionnel afin, de stopper la réaction. L'addition d'acide thiobarbiturique (TBA à 1%) permet de former un complexe chromogène avec le malonodialdéhyde (MDA), composé issu de la dégradation oxydative du désoxyribose en milieu acide. Ce complexe se forme après 15 min d'incubation à 100°C, qui présente un maximum d'absorption à 532 nm. La diminution de l'absorbance du mélange réactionnel indique une diminution de l'oxydation du désoxyribose. Le même test a été réalisé avec des molécules de référence (mannitol, acide tannique et acide ascorbique), avec les mêmes concentrations que les extraits. Tous les tests ont été réalisés en trois répliques. Le pourcentage de l'activité scavenging de radical OH[•] est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité scavenging de radical OH}^\cdot = [A_{\text{Cont}} - A_{\text{test}}] / A_{\text{Con}} \cdot 100$$

Tels que :

A_{Cont} : l'absorbance du contrôle qui consiste en la solution de désoxyribose sans extrait.

A_{test} : l'absorbance du désoxyribose en présence de l'extrait.

II.5. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

II.5.1. Fractionnement des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

II.5.1.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne

Une chromatographie sur colonne de gel de silice a été effectuée sur les extraits de *Pistacia lentiscus* ayant une activité scavenging qui dépasse un taux de 50 %, les fractions présentant des profils identiques en chromatographie sur couche mince (CCM) ont été réunies, puis subit les mêmes tests anti-radicalaires précédents. Les fractions les plus actives ont été analysées par CCM, afin de mettre en évidence les composés contenus dans les différentes fractions testées.

20 mg de chaque extrait actif de *Pistacia lentiscus* ont été soumis à chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution a été réalisée en utilisant le chloroforme dont la polarité est augmentée par l'addition progressive de l'acétate d'éthyle, puis un mélange de l'acétate d'éthyle-méthanol, méthanol-eau et on termine la chromatographie avec un rapport d'eau-acide acétique. Les différentes fractions sont collectées, séchées et ensuite analysées.

II.5.1.2. Caractérisation des fractions actives de *Pistacia lentiscus* par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique simple utilisée dans le but de séparer différents constituants d'un mélange complexe en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage. Des plaques de gel de silice (20×20 cm, Silica gel 60 F254 avec indicateur fluorescent) sont utilisées pour analyser les fractions actives de *Pistacia lentiscus*. Le système de migration (phase mobile) est constitué du mélange de solvant : acétate d'éthyle- Acide formique - Acide acétique – Eau (EA: AF: AAc: H₂O) (100 :11 :11 :26) (V/V/V/V) (Andriambelason et *al.*, 1999).

10 µl de chaque fraction de concentration indéterminée et de molécule de référence (5 mg/ml) ont été déposés sur des plaques de silice qui ont été activées dans l'étuve à 110°C pendant 30 min. Ces dernières sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par la phase mobile. Après développement, les plaques ont été séchées, examinées à la lumière du jour et révélées à la vanilline sulfurique, puis séchées à 110°C pendant 10 minutes. Les rapports frontaux ont été calculés et comparés à ceux des molécules de références permettant ainsi la caractérisation des constituants de différentes fractions.

II.5.2. Caractérisation de l'activité anti-DPPH[•] des fractions actives de *Pistacia lentiscus* sur CCM

Le test chimique que nous avons employé pour déceler la présence de composés antioxydants dans les fractions actives de *Pistacia lentiscus* est basé sur le principe de la réduction des RL fournis par le DPPH[•].

10 µl de chaque fraction de concentration indéterminé et de standard (5 mg/ml) ont été déposés sur la plaque. Le développement des plaques a été réalisé dans le système de solvant : EA : AF : AAc : H₂O (100 :11 :11 :26) (V/V/V/V). Après migration, les chromatogrammes ont été séchés puis pulvérisés à l'aide d'une solution de DPPH[•] à la concentration de 500 µM dans l'éthanol. En présence de composés possédant des propriétés antioxydants, la solution DPPH[•] est réduite et passe de la couleur violette au jaune. Sur la plaque CCM, les zones d'activités antiradicalaires apparaissent jaune sur un fond violet après un temps optimal de 30 minutes.

II.6. Etude statistique

Une étude statistique a été réalisée pour la comparaison des résultats et la mise en évidence des différences entre les échantillons, l'analyse de la variance, ANOVA (STATISTICA 5.5) est utilisée et le degré de signification de données est pris à la probabilité $p < 0,05$. Toutes les données représentent la moyenne de trois essais.

Chapitre III

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.I. Taux d'extraction

Les protocoles d'extraction des composés phénoliques de la plante sont très divers, cette diversité est non seulement due à la complexité des composés phénoliques mais aussi à la nature de la matrice végétale (Contini *et al.*, 2008).

La procédure d'extraction des principes actifs d'une matière végétale est basée principalement sur l'utilisation de solvants comme le méthanol et l'éthanol. Puisque les principes actifs de la plante se trouvent en faible concentration, la méthode de l'extraction sélective peut être utilisée (Hayouni *et al.*, 2007). L'extraction des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus* a été réalisée selon la méthode préconisée par Chiang *et al.* (1994) avec quelques modifications. Cette méthode est basée sur le degré de solubilité des composés phénoliques dans différents solvants de polarités variables, elle comprend deux étapes, la première a été réalisée avec l'éthanol pour solubiliser les composés phénoliques, l'éthanol est largement utilisé pour son taux d'extraction élevé et sa faible toxicité (Contini *et al.*, 2008).

La deuxième étape de l'extraction a été réalisée avec une série de solvants, afin de fractionner d'une façon sélective les composés phénoliques de l'extrait brut en fonction de la nature du solvant utilisé. Les taux d'extraction obtenus dans chaque phase à partir de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau II : Taux d'extraction des composés phénoliques des extraits de *Pistacia lentiscus* .

Solvants	Taux d'extraction (%)	
	Feuilles	Graines
Ethanol	21,35	3,60
Acétate d'éthyle	26,29	47,54
Aqueux d'acétate d'éthyle	64,81	38,19
Hexane	30,69	84,00
Aqueux d'hexane	35,25	1,33
Chloroforme	20,49	66,28
Aqueux du chloroforme	34,57	1,16

D'après le tableau II, on remarque que le taux d'extraction de la première phase est beaucoup plus élevé pour les feuilles que les graines ; il est de sept fois supérieur chez les feuilles par rapport aux graines, ceci s'explique par la richesse des feuilles en composés phénoliques contrairement aux graines qui ont donné un taux faible inférieur à 4 %,

ce qui confirme que le taux d'extraction est lié au matériel végétal spécifique (Contini *et al.*, 2008). Le taux d'extraction des composés phénoliques est également influencé par le type du solvant, le rapport solide-liquide, la granulométrie de la poudre végétale, le nombre d'extraction, la température et le pH du milieu...etc (Nazck et Shahidi, 2006 ; Falleh *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus de la deuxième étape d'extraction montrent que les extraits aqueux de feuilles ont un taux d'extraction plus élevé : (64,81 %, 35,25 %, 34,57 %) pour les extraits aqueux d'acétate d'éthyle, aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme respectivement, ce qui suggère la richesse des feuilles en composés phénoliques hydrosolubles. Par contre, les graines montrent des taux d'extraction élevés au niveau des phases organiques (47,54%, 84,00%, 66,28%) pour les extraits d'acétate d'éthyle, d'hexane et du chloroforme, respectivement. Ce type d'extraction nous a permis de fractionner et de sélectionner les composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, en fonction de leur degré de polarité, dont les plus polaires sont concentrés dans les phases aqueuses, alors que les composés apolaires sont concentrés au niveau des phases organiques.

III.2. Dosage des composés phénoliques des extraits de *Pistacia lentiscus*

III.2.1. Dosage des phénols totaux

La teneur en phénols totaux exprimée en mg E Cat /g d'extrait contenu dans les extraits obtenus avec différents solvants est montrée dans la figure 19.

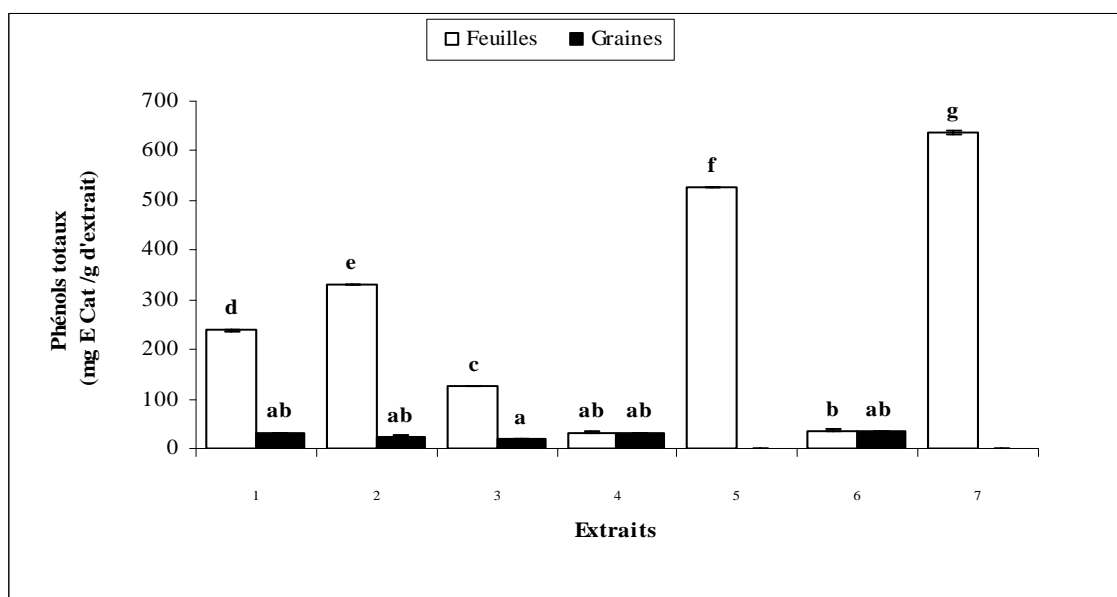


Figure 19 : Taux de phénols totaux dans les extraits de *Pistacia lentiscus*.

1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait d'acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle, 4 : Extrait d'hexane
5 : Extrait aqueux d'hexane, 6 : Extrait du Chloroforme, 7 : Extrait Aqueux du Chloroforme.

Les résultats obtenus indiquent que les différents solvants utilisés montrent une différence dans leur capacité à extraire les substances phénoliques de *Pistacia lentiscus*. Par ailleurs, l'extrait éthanolique montre une teneur élevée au niveau des feuilles avec une valeur de $232,22 \pm 1,59$ mg ECat /g d'extrait, ce qui confirme la richesse des feuilles en ces composés. Plusieurs études effectuées sur les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont démontré qu'elles constituent une source majeure de composés phénoliques (Ljubuncic et al., 2005 ; Benhamou et al., 2008 ; Gardeli et al., 2008 ; Atmani et al., 2009). Une étude réalisée par Gardeli et ses collaborateurs (2008) sur l'extrait méthanolique de feuilles de *Pistacia lentiscus* a confirmé sa richesse en composés phénoliques, elle a enregistré une teneur de 588 mg EG/g d'extrait.

La teneur des phénols totaux dans les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* est donnée dans l'ordre : aqueux du chloroforme > aqueux d'hexane > d'acétate éthyle > éthanol > aqueux d'acétate d'éthyle > chloroforme > hexane. Les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane marquent les taux les plus élevés ($p < 0,05$) avec des teneurs de $637,58 \pm 4,72$ mg ECat /g d'extrait et $527,51 \pm 0,71$ mg ECat /g d'extrait, respectivement, ce qui confirme la richesse des feuilles en composés phénoliques notamment de nature polaire.

Les extraits de la phase organique issus de l'hexane et du chloroforme représentent des teneurs relativement faibles qui ne dépassent pas $37,05 \pm 1,48$ mg ECat/g d'extrait pour l'extrait du chloroforme.

Le taux de polyphénols totaux dans les extraits de graines est significativement plus faible ($p < 0,05$) que celui retrouvé dans les extraits de feuilles. En effet, l'extrait éthanolique montre un taux de $32,18 \pm 0,25$ mg ECat /g d'extrait qui est sept fois plus faible que celui des feuilles. D'après la figure 19, on remarque que les composés phénoliques des graines sont concentrés au niveau des phases organiques, indiquant leur nature apolaire.

Les résultats obtenus dans cette étude appuient fortement la richesse des feuilles ainsi que la pauvreté des graines de *Pistacia lentiscus* en composés phénoliques.

III.2.2. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus large et le plus répandu de composés phénoliques (Abubakar et al., 2008). Plusieurs études effectuées sur les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont montré sa richesse en composés de type flavonoïdes tels que les flavonols glycosylés (y compris la myrecétine, la quercétine glycosylée) les flavones et les anthocyanes (Ljubuncic et al., 2005; Longo et al., 2007 ; Benhamou et al., 2008).

Les résultats de la présente étude réaffirment la richesse des feuilles en ces composés. En effet, l'extrait éthanolique des feuilles montre une teneur élevée ($p < 0,05$) de $150,05 \pm 1,35$ mg ER/g d'extrait qui est huit fois plus élevée que celle enregistrée par l'extrait éthanolique de graines avec une teneur de $17,76 \pm 1,01$ mg ER/g d'extrait (Figure 20).

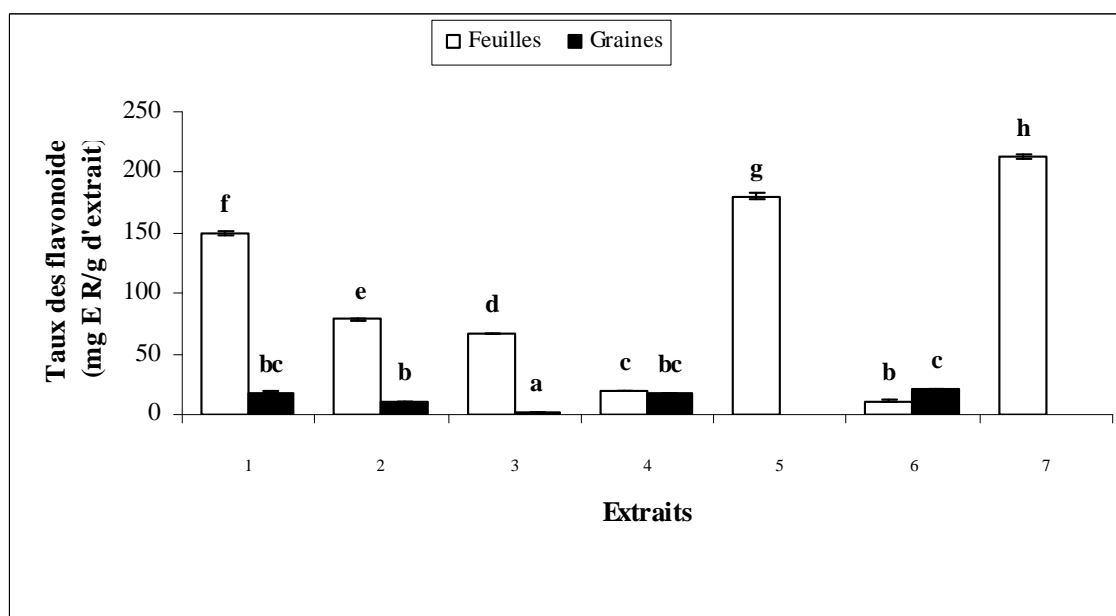


Figure 20 : Taux de flavonoïdes dans les extraits de *pistacia lentiscus*.

1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait d'acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle, 4 : Extrait d'hexane
5 : Extrait aqueux d'hexane, 6 : Extrait du Chloroforme, 7 : Extrait Aqueux du Chloroforme.

D'après la figure 20, les flavonoïdes des feuilles sont localisés principalement au niveau des phases aqueuses. Les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane ont exhibé les taux les plus élevés ($p < 0,05$) avec $212,36 \pm 1,64$ mg ER/g d'extrait et $180,34 \pm 2,75$ mg ER/g d'extrait, respectivement, tandis que les extraits organiques ont montré des teneurs faibles ($p < 0,05$). Par ailleurs, l'extrait du chloroforme marque la teneur la plus faible ($p < 0,05$) avec $10,76 \pm 1,04$ mg ER/g d'extrait. Une étude menée par Veličkovic et ses collaborateurs (2007), sur les extraits de *Salvia officinalis* et *Salvia glutinosa*, ont montré que les solvants les moins polaires comme le benzène et le chloroforme sont utilisés pour l'extraction des flavonoïdes aglycones, alors que les plus polaires comme l'acétone, l'éthanol sont utilisés pour extraire les flavonoïdes glycosylés. Dans le cas des graines, la teneur la plus élevée en flavonoïdes a été observée au niveau de l'extrait du chloroforme ($20,86 \pm 0,11$ mg ER/g d'extrait), ce qui reflète la pauvreté des graines en flavonoïdes.

III.2.3. Dosage des tannins

Plusieurs études phytochimiques ont montré que le genre *Pistacia* est une source importante de tannins. Ljubuncic et ses collaborateurs (2005) ont révélé la présence des tannins condensés au niveau des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Aussi, des gallotanins ont été purifiés à partir de feuilles de *Pistacia weinmannifolia*, une plante du même genre que *Pistacia lentiscus* (Wei et al., 2002 ; Zhao et al., 2005 ; Topçu et al., 2007).

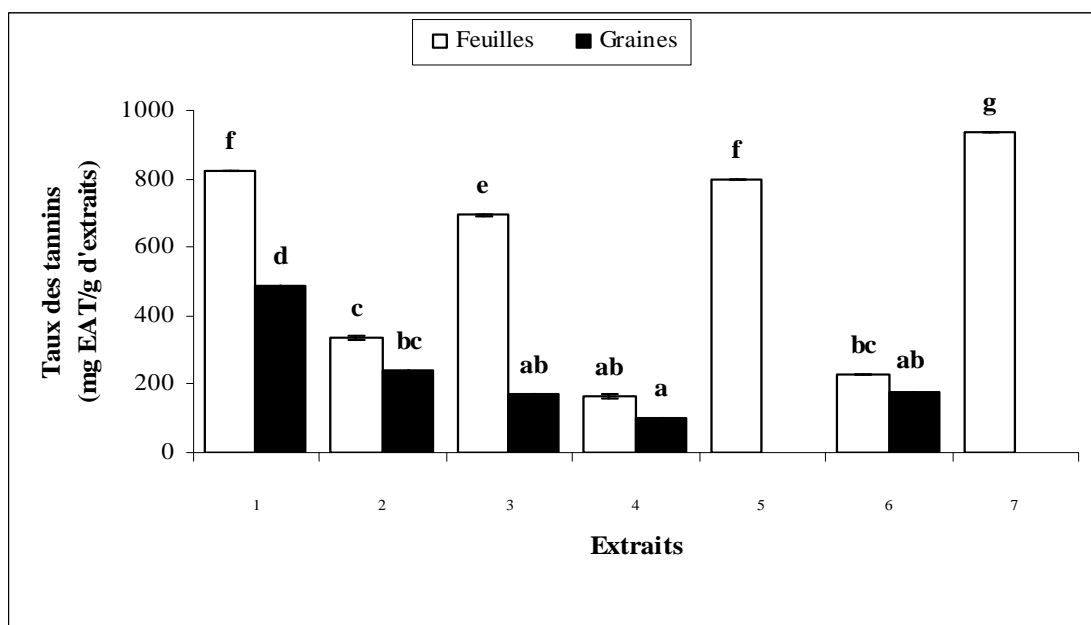


Figure 21 : Taux de tannins dans les extraits de *pistacia lentiscus*.

1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait d'acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle, 4 : Extrait d'hexane
5 : Extrait aqueux d'hexane, 6 : Extrait du Chloroforme, 7 : Extrait Aqueux du Chloroforme.

D'après la figure 21, tous les extraits aqueux de feuilles ont exhibé des teneurs élevées en tannins ($p < 0,05$). En effet, l'extrait aqueux du chloroforme marque le taux le plus élevé ($p < 0,05$) avec $937,22 \pm 0,67$ mg EAT /g d'extrait, suivi par les extraits aqueux d'hexane et aqueux d'acétate d'éthyle avec des teneurs de $795,83 \pm 0,11$ mg EAT /g d'extrait et de $693,33 \pm 1,53$ mg EAT /g d'extrait, respectivement, tandis que les taux les plus faibles sont observés au niveau des extraits organiques : un taux de $164,16 \pm 3,65$ mg EAT /g d'extrait a été enregistré au niveau de l'extrait d'hexane.

Concernant les graines, tous les extraits ont montré des quantités relativement proches ($p < 0,05$) en tannins, elles varient de $238,27 \pm 1,13$ mg EAT /g d'extrait à $101,16 \pm 1,17$ mg EAT /g d'extrait, cependant l'extrait éthanolique montre la teneur la plus élevée ($p < 0,05$) avec $488,25 \pm 0,58$ mg EAT /g d'extrait, ce qui suggère la richesse des graines en tannins. En effet, des pentagaloylglucose et des acides galliques ont été isolés à partir d'extrait d'acétate d'éthyle des fruits de *Pistacia lentiscus* (Abdelwahed et al., 2007).

III.3. Mesure du pouvoir réducteur des extraits de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml

Le pouvoir réducteur d'une substance indique sa capacité de transférer un électron ou un atome d'hydrogène en réduisant le Fe (III) en Fe (II) en présence du complexe $K_3(FeCN)_6$ (Benhamou et al., 2008).

Le pouvoir réducteur des extraits de *Pistacia lentiscus* est représenté dans la figure suivante.

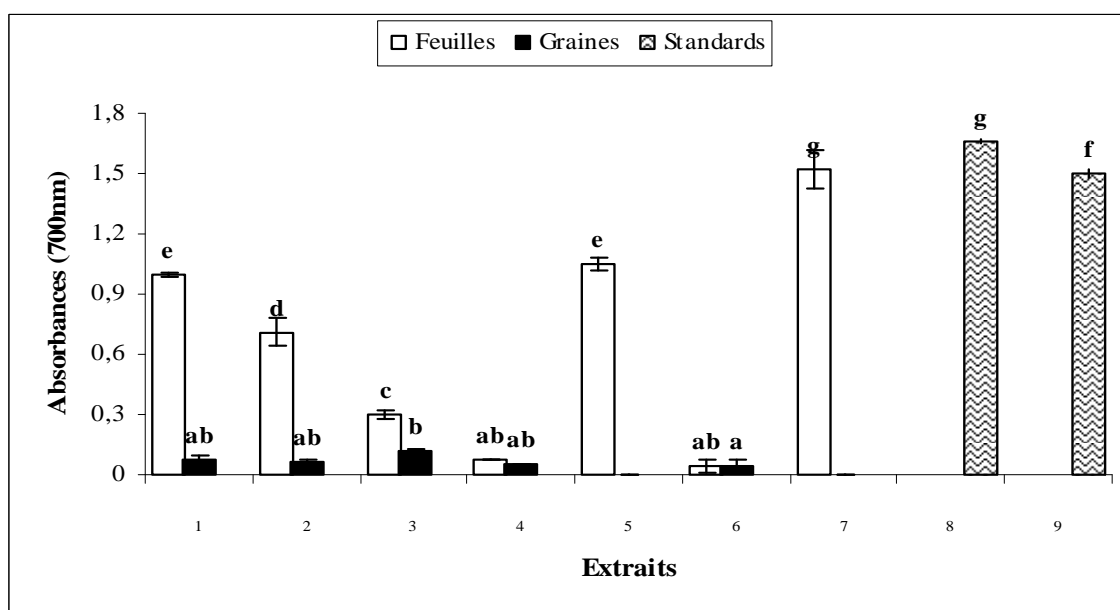


Figure 22 : Représentation graphique du pouvoir réducteur des extraits de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml.

1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait d'acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle, 4 : Extrait d'hexane 5 : Extrait aqueux d'hexane, 6 : Extrait du Chloroforme, 7 : Extrait Aqueux du Chloroforme, 8 : acide tannique, 9 : acide gallique.

La figure 22 montre des différences significatives entre le pouvoir réducteur de différents extraits de feuilles et celui des extraits de graines ($p < 0,05$), dont l'extrait éthanolique de feuilles montre une capacité réductrice beaucoup plus élevée que celle retrouvée avec l'extrait éthanolique de graines ($p < 0,05$), les valeurs sont de $1,00 \pm 0,01$ UA et $0,08 \pm 0,02$ UA, respectivement. La capacité réductrice élevée de l'extrait éthanolique de feuilles de *Pistacia lentiscus* a été montrée également par Benhamou et ses collaborateurs (2008), avec un pouvoir réducteur de 1,08 UA à une concentration de 0,25 mg/ml.

Les extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* ont montré une forte capacité réductrice ($p < 0,05$), notamment l'extrait aqueux du chloroforme qui a exhibé une capacité réductrice similaire à celle obtenue par l'acide tannique ($p < 0,05$), qui est considéré comme étant un puissant agent réducteur (Arabshahi et Urooj, 2007). Les extraits de graines quant à eux montrent un pouvoir réducteur très faible, ainsi le meilleur pouvoir réducteur a été enregistré par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle ($0,12 \pm 0,01$ UA).

D'après ces résultats, il nous paraît clair que les feuilles exhibent une capacité réductrice supérieure à celle de graines ($p < 0,05$), ce qui suggère que les extraits de feuilles peuvent jouer un rôle de donneur d' (é) ou de (H).

III.4. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de *Pistacia lentiscus*

III.4.1. Activité scavenging du radical DPPH[•] par les extraits de *Pistacia lentiscus*

III.4.1.1. Activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml

L'activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits de *Pistacia lentiscus* et certains standards à une concentration de 100 µg/ml est illustrée dans la figure 23.

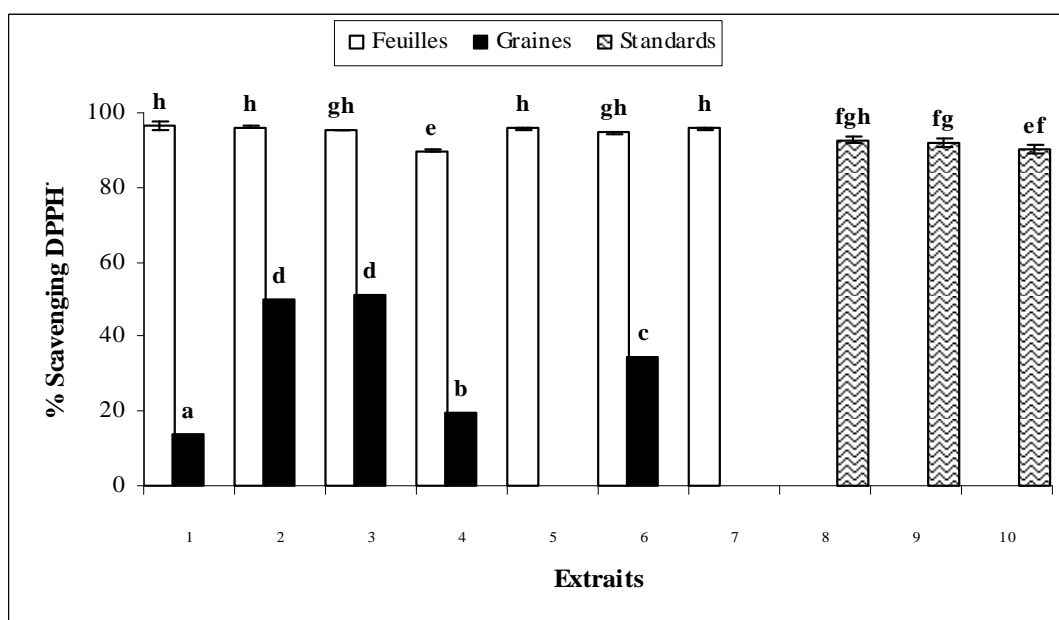


Figure 23 : Activité scavenging du radical DPPH[•] par les extraits de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml.

1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait d'acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle, 4 : Extrait d'hexane
5 : Extrait aqueux d'hexane, 6 : Extrait du Chloroforme, 7 : Extrait Aqueux du Chloroforme, 8 : acide tannique, 9 : quercétine, 10 : catéchine.

Une différence significative a été enregistrée entre l'activité scavenging des extraits des feuilles et celle des graines, cependant aucune différence significative n'est relevée entre les extraits aqueux et organiques d'acétate d'éthyle de graines, qui présentent les pourcentages les plus élevés respectivement de 51,09 % et 50,03 %. Il a été rapporté par Abdelwahed et ses collaborateurs (2007), que l'acide gallique, un composé isolé à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle de fruits de *Pistacia lentiscus* a exhibé un puissant effet scavenging contre le radical DPPH[•] à 100 µg/ml, avec un pourcentage de 90,14 %.

Concernant les feuilles, à l'exception de l'extrait de la phase organique d'hexane, tous les extraits ont montré une grande capacité à piéger le radical DPPH \cdot à 100 μ g/ml, qui dépasse les 90 %. En effet, aucune différence significative ($p < 0.05$) n'est relevée entre l'activité scavenging de ces extraits et celle obtenue par l'acide tannique, puissant scavenger du radical DPPH \cdot , qui exhibe un pourcentage de 92.63 % (figure 23).

L'activité scavenging du radical DPPH \cdot par les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* à 10 μ g/ml est illustrée dans la figure suivante :

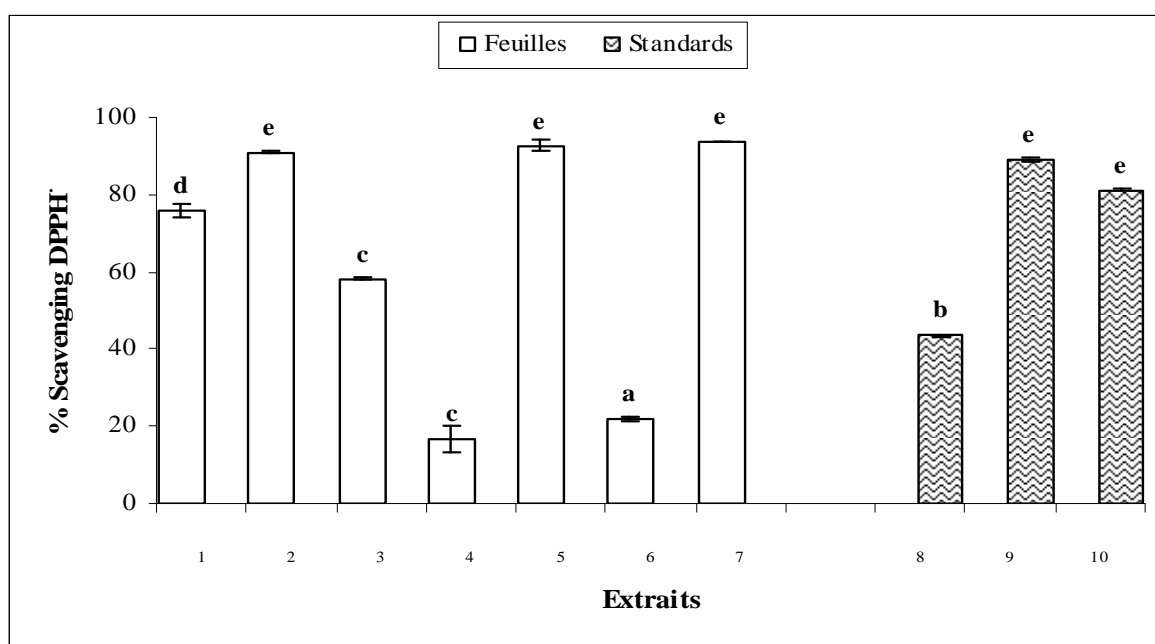


Figure 24 : Activité scavenging du radical DPPH \cdot par les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* à 10 μ g/ml.

1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait d'acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle, 4 : Extrait d'hexane 5 : Extrait aqueux d'hexane, 6 : Extrait du Chloroforme, 7 : Extrait Aqueux du Chloroforme, 8 : acide tannique, 9 : quercétine, 10 : catéchine.

A 10 μ g /ml les extraits acétate d'éthyle, aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme présentent les pourcentages scavenging les plus élevés ; ils sont de 91,06%, 92,69% et 93.46%, respectivement, similaires à ceux de la quercétine et de la catéchine ($p < 0,05$).

Une étude menée par Smarth et krishna (2007) sur une variété de plantes médicinales a montré que l'effet scavenger du radical DPPH \cdot par l'extrait méthanolique de feuilles de *Pistacia chinensis*, espèce qui appartient au même genre que *Pistacia lentiscus*, est de 30,12% à une concentration de 125 μ g/ml. La capacité antioxydante des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* peut être attribuée à leurs constituant actifs, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques...etc. Par ailleurs, Gardeli et ses collaborateurs (2008) ont conclu que les dérivés galloyl isolés de feuilles de *Pistacia lentiscus* ont un puissant effet anti-DPPH \cdot .

III.4.1.2. Détermination des IC₅₀ des extraits de *Pistacia lentiscus* et quelques standards

L'activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* et de la catéchine à différentes concentrations est illustrée dans la figure suivante :

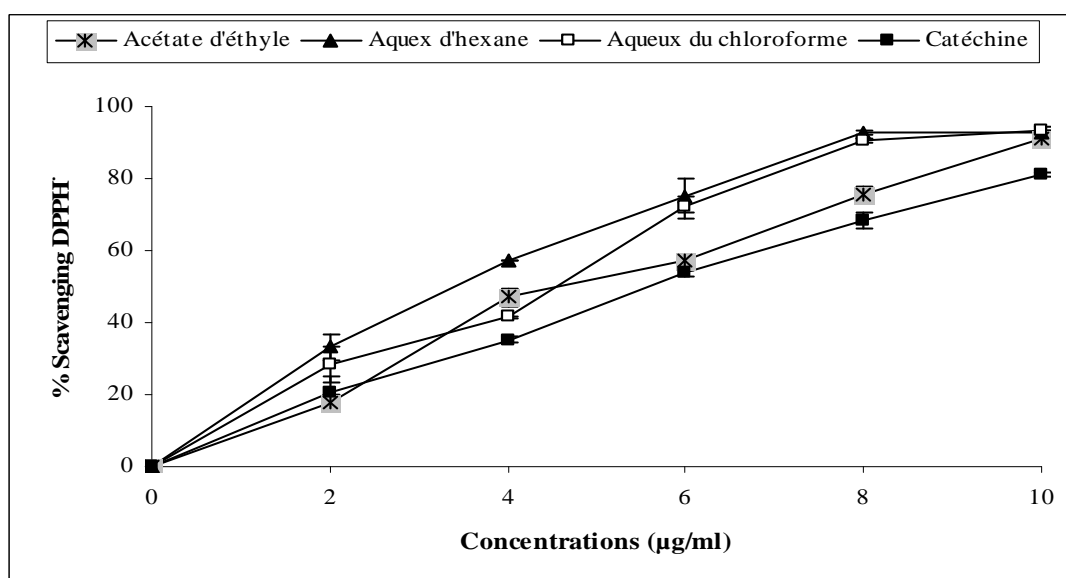


Figure 25 : Activité scavenging du radical DPPH[•] par les extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'hexane, aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* et de la catéchine à différentes concentrations.

Comme le montre la figure 25, l'activité scavenging du radical DPPH[•] est proportionnelle aux concentrations des extraits et de la catéchine. Aussi, les extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme ont maintenu la même activité contre le radical DPPH[•] jusqu'à une concentration de 8 µg/ml. A partir de cette concentration, l'effet anti-DPPH[•] commence à diminuer pour atteindre les taux les plus faibles, 33,17 % et 28,22 %, respectivement à 2 µg /ml. Ces extraits manifestent des IC₅₀ de 4,09 µg /ml et 3,84 µg/ml respectivement, inférieures à celle de la catéchine qui est de 5,59 µg/ml, indiquant que ces extraits sont riches en composés donneurs d'hydrogène.

Une étude récente réalisée par Ling et ses collaborateurs (2009), s'intéressant à l'activité anti-DPPH[•] des extraits aqueux de feuilles de *Mangifera indica*, espèce qui appartient à la même famille que *Pistacia lentiscus*, a révélé une IC₅₀ de 0,49 mg/ml, beaucoup plus élevée que celle obtenue par les extraits aqueux de *Pistacia lentiscus*. En plus, l'extrait de la phase organique d'acétate d'éthyle exprime une capacité importante à piéger le radical DPPH[•] en manifestant une IC₅₀ de 5,20 µg/ml, comparable à celle de la catéchine (p < 0,05). L'étude réalisée par Ahmed et ses collaborateurs (2008) sur l'extrait d'acétate d'éthyle de feuilles de *Pistacia integerrima* a rapporté une IC₅₀ de 6 µg/ml.

Ksouri et ses collaborateurs (2008) ont rapporté que la différence de l'activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits de plante peut être due à la différence de la sélectivité du solvant pour l'extraction de certains groupes de phénols.

L'activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle des graines de *Pistacia lentiscus* et de quelques molécules de référence à différentes concentrations est illustrée dans la figure 26.

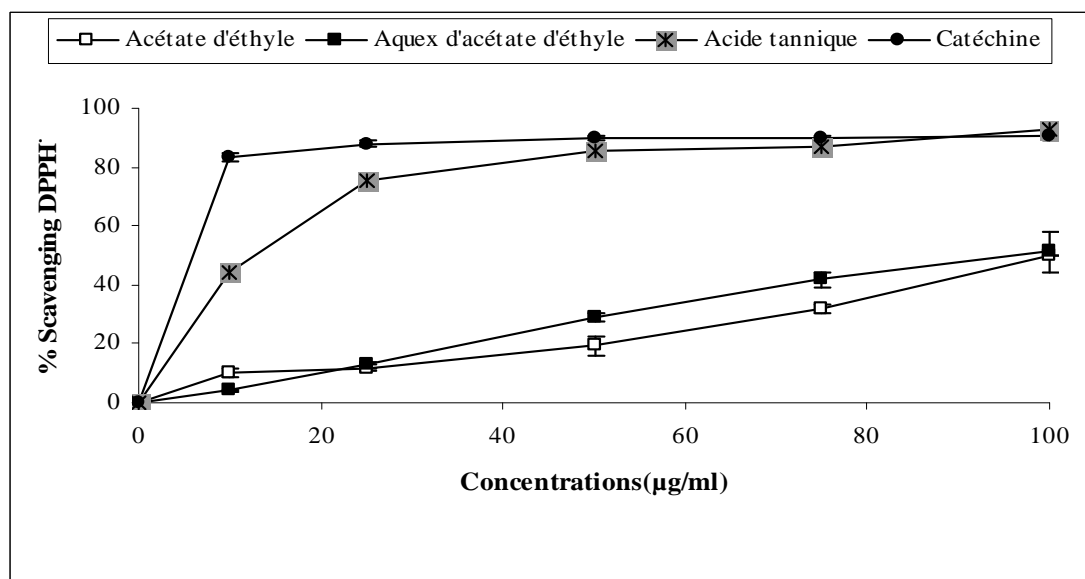


Figure 26 : Activité scavenging du radical DPPH[•] par les extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle de graines de *Pistacia lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

Une diminution linéaire de l'activité scavenging du radical DPPH[•] est observée pour les extraits aqueux et organiques d'acétate d'éthyle des graines. Ces extraits ont exhibé un effet puissant de piéger le radical DPPH[•] à 100 µg/ml ; cependant, à une concentration de 10 µg/ml cette capacité n'est pas significative (< 20 %), contrairement aux standards utilisés, notamment la catéchine qui montre un effet scavenger de 83,42 % à 10 µg/ml.

Les résultats obtenus indiquent que l'effet scavenging du radical DPPH[•] par les standards (catéchine et acide tannique) est important même à faibles concentrations. En effet, Heim et ses collaborateurs (2002) ont rapporté que l'activité antioxydante des extraits de plantes est due principalement aux concentrations élevées en composés phénoliques. Les extraits aqueux et organique d'acétate d'éthyle présentent des IC₅₀ de 108,00 µg/ml et 96,54 µg/ml respectivement, qui sont largement supérieures aux valeurs exprimées par les standards, 6,24 µg/ml et 11,9 µg/ml pour la catéchine et l'acide tannique, respectivement.

L'étude de Abdelwahed et ses collaborateurs (2007) a pu démontrer que l'acide gallique, composé isolé de l'extrait acétate d'éthyle des fruits de *Pistacia lentiscus* exhibe une IC_{50} de $20\mu\text{g/ml}$ qui est largement inférieure aux valeurs exprimées par les extraits utilisés dans la présente étude. Cette différence peut être due à l'effet antagoniste entre les molécules de l'extrait, ayant un effet scavenging contre le radical DPPH.

III.4.2. Activité scavenging du H_2O_2 par les extraits de *Pistacia lentiscus*

III.4.2.1. Activité scavenging du H_2O_2 par les extraits de *Pistacia lentiscus* à $100\mu\text{g/ml}$

L'effet scavenging du H_2O_2 par les extraits de *Pistacia lentiscus* est représenté dans la figure ci-dessous. L'acide tannique, la quercétine et l'acide coumarique ont été utilisés comme molécules de références.

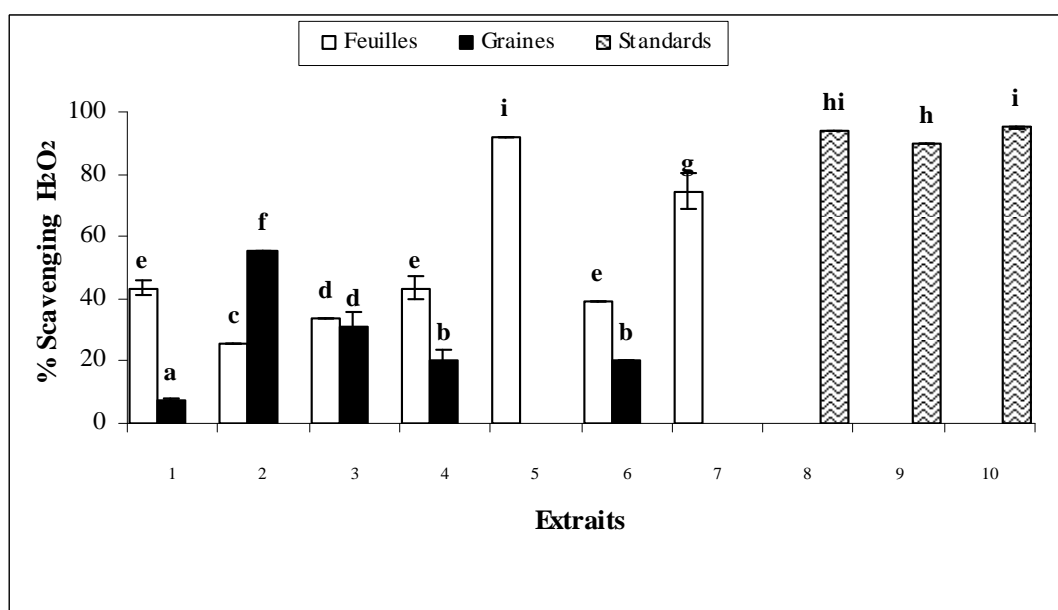


Figure 27 : Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par les extraits de *Pistacia lentiscus* à $100\mu\text{g/ml}$.
 1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait d'acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle, 4 : Extrait d'hexane
 5 : Extrait aqueux d'hexane, 6 : Extrait du Chloroforme, 7 : Extrait Aqueux du Chloroforme, 8 : acide tannique,
 9 : quercétine, 10 : coumarique.

La figure 27 montre que les extraits de feuilles présentent une capacité inhibitrice du H_2O_2 beaucoup plus élevée que celle montrée par les extraits de graines ($p < 0,05$). Les extraits aqueux du chloroforme et aqueux d'hexane ont exhibé les activités anti- H_2O_2 les plus élevées ; elles sont de 74,42% et 91,94% respectivement, comparées à celles de l'acide tannique et de l'acide coumarique, qui sont de 93,79 % et 94,94 %, respectivement. L'ordre de l'activité scavenging obtenue est le suivant : aqueux d'hexane > aqueux du chloroforme > hexane > éthanol > chloroforme > aqueux acétate d'éthyle > acétate d'éthyle.

Une étude réalisée par Ozsoy et ses collaborateurs (2008), sur différents extraits des feuilles de *Smilax excelsa* (Liliaceae), a montré que les extraits aqueux ont exhibé un potentiel scavenging du H_2O_2 de 95,6% à une concentration de 5mg/ml. Cette activité est significativement plus faible que celle obtenue par les extraits aqueux de notre plante, ce qui indique que les extraits aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus* renferment des composés puissants, de nature polaire ayant la capacité de donation de l'(é) ou d'atome d'(H) qui interviennent dans la conversion du H_2O_2 en H_2O . Les travaux menés par Sroka et Cisonski (2003) sur les acides phénoliques, ont montré que l'activité scavenging du H_2O_2 est corrélée au nombre et à la position du groupement hydroxyle liés au cycle aromatique, en plus de la structure *ortho* et *para* de substitution (OH) qui joue un rôle primordial dans cette activité.

Concernant les graines, tous les extraits à l'exception de l'extrait acétate d'éthyle, ont montré une activité scavenging H_2O_2 faible ($p < 0,05$), qui ne dépasse pas 40%. L'activité la plus importante a été relevée pour l'extrait acétate d'éthyle qui exprime un pourcentage de 55,21%, suggérant ainsi la richesse de cet extrait en composés ayant un potentiel donneur d'hydrogène. Une étude récente, réalisée par Bhouri et ses collaborateurs (2009), sur les fruits de *Pistacia lentiscus* a rapporté que l'acide digallique, composé isolé de l'extrait d'acétate d'éthyle, exhibe un pourcentage scavenging du radical ABTS \cdot de 35 % à une concentration de 50 μ g/ml, un effet scavenging sur l' O_2 de 17% à 100 μ g/ml et un effet anti- H_2O_2 de 55% à une concentration de 200 μ g/ml (Bhouri et *al.*, 2009).

III.4.2.2. Détermination des IC₅₀ des extraits de *Pistacia lentiscus* et quelques standards

L'activité scavenging du H_2O_2 des extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* à différentes concentrations est illustrée dans la figure suivante :

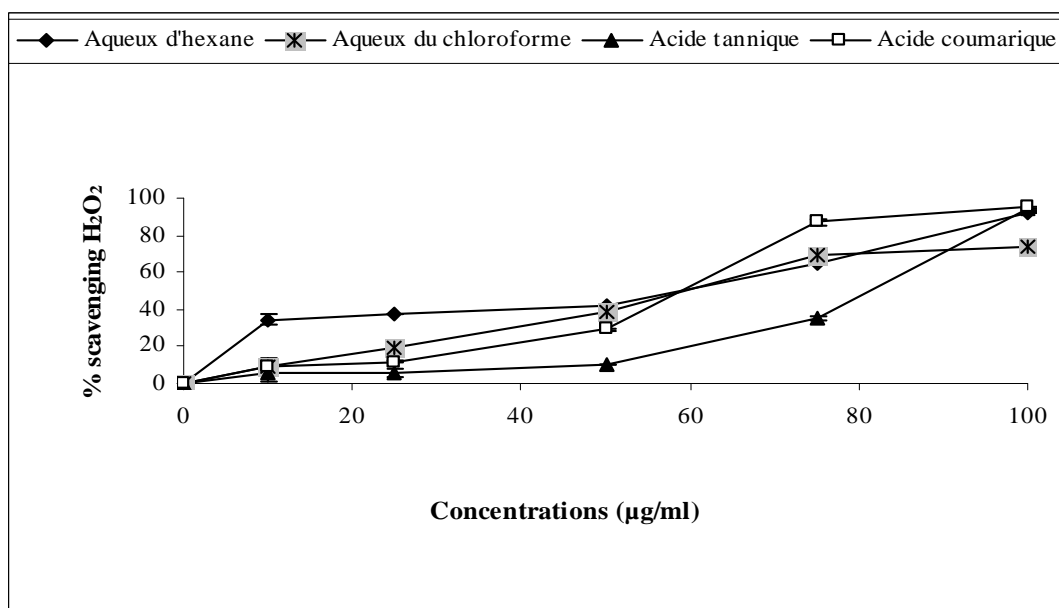


Figure 28: Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par les extraits aqueux d'hexane, aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

La figure 28 montre que l'effet scavenger du H_2O_2 des extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* et les standards utilisés augmente au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration. Par ailleurs, l'extrait aqueux du chloroforme a maintenu son activité stable à la concentration de $75\mu\text{g/ml}$ à partir de laquelle l'effet scavenging commence à diminuer pour atteindre le taux le plus bas (8,92%) à $10\mu\text{g/ml}$.

Les IC_{50} des extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme, l'acide coumarique et l'acide tannique sont de $51,82\mu\text{g/ml}$, $56,72\mu\text{g/ml}$, $51,70\mu\text{g/ml}$, et $82,70\mu\text{g/ml}$, respectivement. En outre, les IC_{50} des extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme sont comparables à celle de l'acide coumarique, indiquant que ces extraits ont une bonne activité scavenging du H_2O_2 . En effet, Ozsoy et ses collaborateurs (2008), qui ont testé l'activité anti- H_2O_2 des extraits aqueux de feuilles de *Smilax excelsa* (Liliaceae), ont obtenu une IC_{50} de $2,94\text{ mg/ml}$, qui est largement supérieure à celle exprimée par les extraits aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus*, ce qui implique la forte activité scavenging de nos extraits sur le H_2O_2 , indiquant le potentiel des phénols polaires. Dans une autre étude, réalisée par Wang et ses collaborateurs (2008), sur les extraits aqueux du fruit du *Choerospondias axillaris* (Anacardiaceae), l' IC_{50} obtenue est supérieure à 20 mg/ml . D'autre part, des travaux menés par Senevirathne et ses collaborateurs (2006) sur les extraits de *Ecklonia cava*, ont montré que les extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme présentent des IC_{50} de $100\mu\text{g/ml}$ et $173\mu\text{g/ml}$, respectivement,

qui sont supérieures à celles exprimées par les extraits aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus*, ce qui implique la faible activité scavenging de ces extraits sur le H_2O_2 .

L'activité scavenging du H_2O_2 de l'extrait acétate d'éthyle de graines de *Pistacia lentiscus* et certains standards à différentes concentrations est montrée dans la figure suivante.

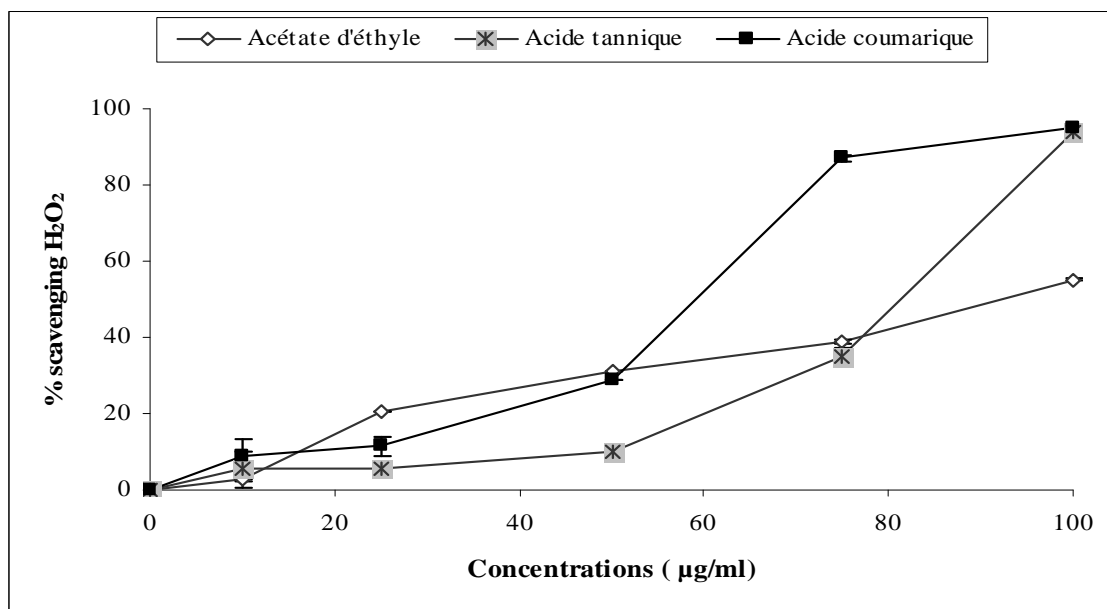


Figure 29: Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par l'extrait d'acétate d'éthyle de graines de *Pistacia lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

Comme le montre la figure 29, le pourcentage scavenging du H_2O_2 est proportionnel à la concentration de l'extrait qui a montré une capacité scavenging dépassant 50% à partir de $50\mu g/ml$. De ce fait, cet extrait manifeste une IC_{50} de $91,8\mu g/ml$ qui est comparable à celle de l'acide tannique ($p < 0,05$). Par ailleurs, une étude réalisée par Jun et ses collaborateurs (2008) sur l'extrait éthanolique de *Caepalpia sappan*, a fait révéler une IC_{50} de $960\mu g/ml$, d'où une inhibition plus faible.

III.4.3. Activité scavenging du radical ($OH\cdot$) par les extraits de *Pistacia lentiscus*

III.4.3.1. Activité scavenging du radical ($OH\cdot$) par les extraits de *Pistacia lentiscus* à $100\mu g/ml$

L'activité inhibitrice du radical hydroxyle par les extraits de *Pistacia lentiscus* est représentée dans la figure suivante :

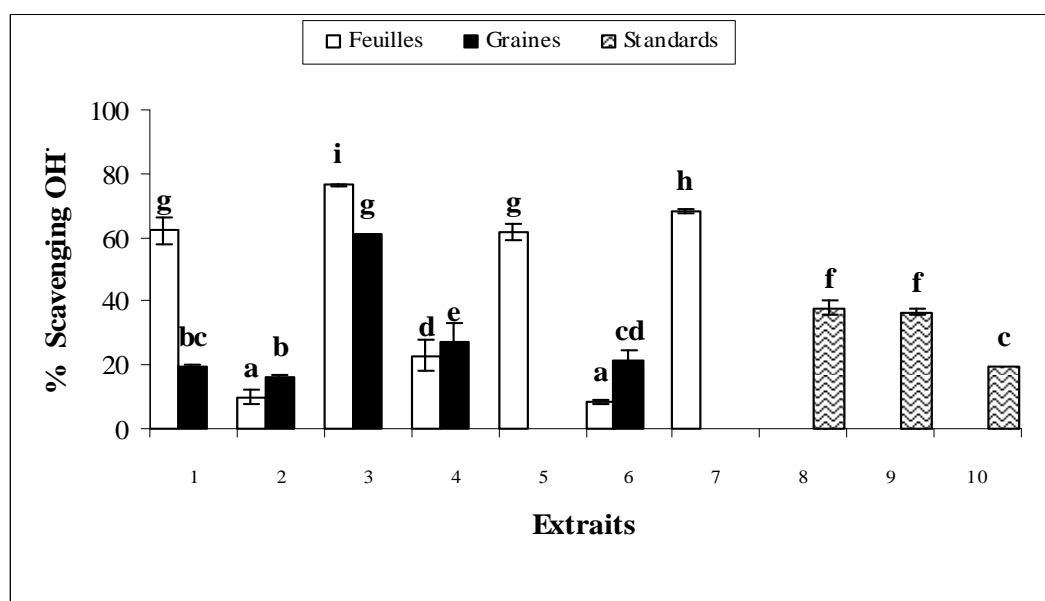


Figure 30 : Activité scavenging du radical OH \cdot Par les extraits de *Pistacia lentiscus* à 100 μ g/ml.

1 : Extrait éthanolique, 2 : Extrait d'acétate d'éthyle, 3 : Extrait aqueux d'acétate d'éthyle, 4 : Extrait d'hexane 5 : Extrait aqueux d'hexane, 6 : Extrait du Chloroforme, 7 : Extrait Aqueux du Chloroforme, 8 : catéchine, 9 : acide ascorbique, 10 : mannitol.

D'après la figure 30, tous les extraits aqueux de feuilles présentent des activités scavenging du radical OH \cdot importantes comprises entre 61,64% et 76,40%, plus élevées que celles exprimées par les standards ($p < 0,05$), l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle montre la l'activité la plus élevée avec un pourcentage scavenging de (76,40%). Les activités les plus faibles ont été obtenues par les extraits organiques, avec l'extrait du chloroforme qui a exhibé la plus faible capacité scavenging du radical OH \cdot (8,26 %). Aussi, il a été rapporté lors d'une étude effectuée sur les différents extraits de bourgeons de *Mammea congifolia* (Guttiferae), que la différence de la composition entre les différents extraits de la plante est à l'origine de la différence de l'activité scavenging du radical OH \cdot (Ratte et al., 2006).

L'activité scavenging élevée des extraits aqueux des feuilles suggère l'implication des composés hydrophiles dans cette activité. En effet, la capacité élevée des extraits aqueux de piéger le radical OH \cdot a été rapportée par plusieurs études (Jun et al., 2006 ; Ozsoy et al., 2008; Ling et al., 2009).

Des différences significatives ont été observées entre l'activité scavenging des extraits de feuilles et celle des graines ($p < 0,05$). En effet, tous les extraits, à l'exception de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle qui a exhibé une activité élevée (60,92 %) et supérieure à celle exprimée par les standards, ont montré une activité scavenging inférieure à 30%.

En effet, une étude réalisée par Kaur et ses collaborateurs (2008) sur différents extraits des feuilles de *Chukrasia tubularis* (Meliaceae), a montré que les extraits aqueux ont exhibé un potentiel scavenging de 51,31 % à une concentration de 60 μ g/ml. L'activité scavenging élevée exhibée par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle est probablement liée à la richesse de cet extrait en composés donneurs d'hydrogène. En outre, les fruits de *Pistacia lentiscus* sont caractérisés par la présence de dérivés galloyl, y compris galloyl glycosidés, ellagitannins et acides quiniques galloyl, qui jouent un rôle primordial dans l'activité anti-oxydante (Bhouri et al., 2009).

III.4.3.2. Détermination des IC₅₀ des extraits de *Pistacia lentiscus* et quelques standards

L'activité scavenging du radical OH \cdot des extraits de feuilles et certains standards à différentes concentrations est illustrée dans la figure 31.

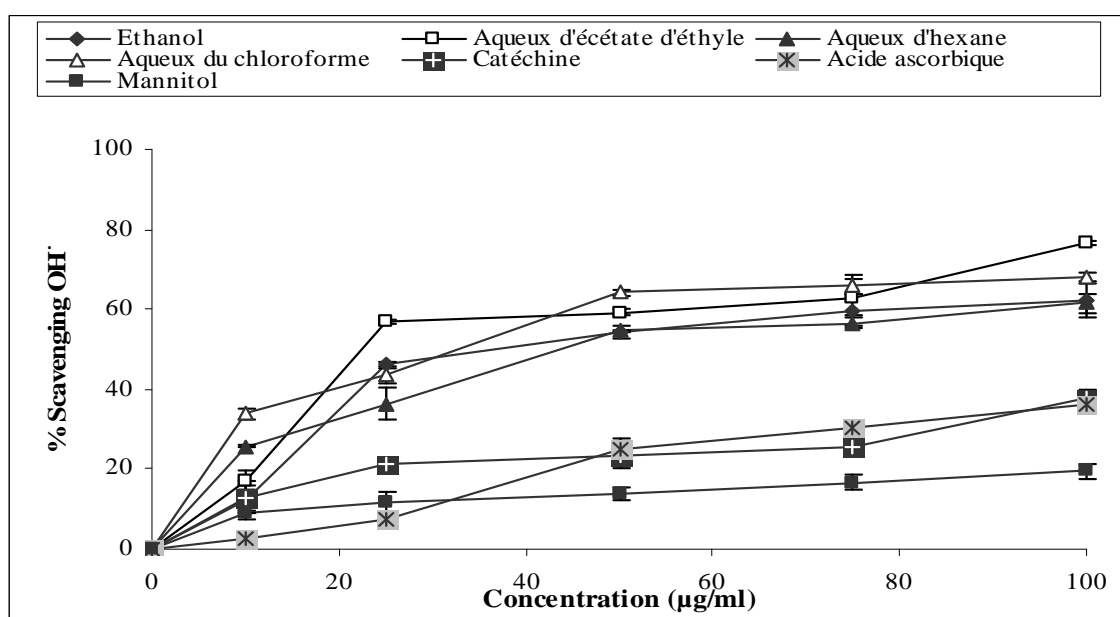


Figure 31: Activité scavenging du radical OH \cdot par les extraits, éthanolique, aqueux d'acétate d'éthyle, aqueux d'hexane, aqueux du chloroforme des feuilles de *Pistacia lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

D'après la figure 31, l'effet scavenging sur le radical OH \cdot de tous les extraits augmente proportionnellement avec la concentration, impliquant l'augmentation de la concentration en composés piègeurs du radical OH \cdot . L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle exhibe une activité satisfaisante (75%) à une concentration de 25 μ g/ml. Ce dernier montre une IC₅₀ de 21,38 μ g/ml, indiquant une forte activité anti-OH \cdot , de ce fait les extraits éthanolique, aqueux d'hexane et queux du chloroforme manifestent des IC₅₀ de 27,92 μ g /ml, 39,51 μ g /ml et 25,53 μ g /ml, respectivement, qui sont largement inférieures à celles obtenues par les standards, ce qui signifie que ces extraits ont une meilleure activité anti-OH \cdot .

Par ailleurs, Singh et ses collaborateurs (2007) ont rapporté une IC_{50} de $50,8\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait aqueux de l'écorce de *Accacia auriculiformis* (Mimosaciae). D'autre part, des travaux récents menés par Li et ses collaborateurs (2009) sur les différents extraits de *Foenum graecum*, ont montré que l'extrait aqueux exprime une IC_{50} de $113\mu\text{g/ml}$, d'où une activité inhibitrice plus faible.

L'effet scavenging des différentes concentrations de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle des graines de *Pistacia lentiscus* et certains standards est montré dans la figure ci-dessous.

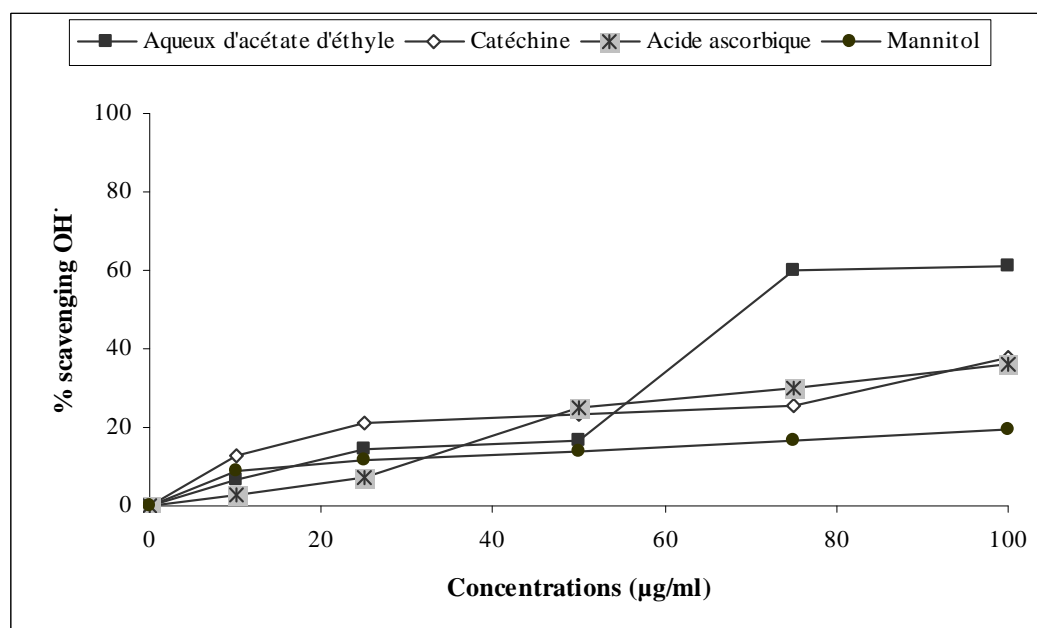


Figure 32: Activité scavenging du radical OH· par l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de *Pistacia lentiscus* et certains standards à différentes concentrations.

L'analyse de la figure 32 indique que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle a une forte activité scavenging contre le radical OH· qui atteint le maximum à $75\mu\text{g/ml}$, au de là de cette concentration le pourcentage scavenging reste inchangé, d'autre part l'activité scavenging des standards à $100\mu\text{g/ml}$ reste inférieure à 40%. Les IC_{50} de l'acide ascorbique, catéchine, mannitol et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle ont été estimées à $129,22\mu\text{g/ml}$, $141,78\mu\text{g/ml}$, $281,15\mu\text{g/ml}$ et $78,25\mu\text{g/ml}$, respectivement.

L'extrait aqueux d'acétate d'éthyle présente une IC_{50} largement inférieure à celle exprimée par les standards, impliquant que son activité scavenging est beaucoup plus importante que celle de molécules de références.

Une étude menée par Wang et ses collaborateurs (2008) sur les extraits aqueux du fruit de *Cherospondies axillaris* (Anacardiaceae), qui ont testé l'activité anti-OH[•] par la méthode de salicylate, a montré une IC₅₀ de 7,44 mg/ml.

D'autre part, des travaux menés par Lantto et ses collaborateurs (2009) sur l'extrait de graines de *Pinus sibirica* (Pinaceae) a montré une IC₅₀ de 338 µg/ml largement supérieure à celle exprimée par l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de graines de *Pistacia lentiscus*.

D'après ces résultats, on conclut que les extraits aqueux de *Pistacia lentiscus* renferment des molécules possédant un potentiel scavenging hautement appréciable contre le radical OH[•], confortant ainsi la thèse selon laquelle les composés qui portent le plus grand nombre de groupements (OH) exercent une grande capacité antioxydante dans le système aqueux (Shuldt et al., 2004).

III.5. Corrélation entre les teneurs en polyphénols et les activités antiradicalaires testées

Afin de déterminer la relation qui existe entre la teneur en composés phénoliques des extraits de *Pistacia lentiscus* et leurs activités anti-radicalaires testées ainsi que leur pouvoir réducteur, nous avons déterminé les facteurs de corrélation et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau III : Corrélation entre l'effet anti-radicalaire et les teneurs en polyphénols des extraits de *Pistacia lentiscus*.

Composés phénoliques	pouvoir réducteur		DPPH [•]		H ₂ O ₂		OH [•]	
	Feuilles	graines	Feuilles	graines	Feuilles	graines	Feuilles	graines
Phénols totaux	0,93	-0,82	0,56	-0,78	0,73	-0,55	0,46	-0,78
Flavonoïdes	0,97	-0,84	0,60	-0,72	0,73	-0,52	0,68	-0,79
Tannins	0,83	0,19	0,65	-0,42	0,59	-0,35	0,90	-0,35

III.5.1. Corrélation entre la teneur en polyphénols et le pouvoir réducteur

Le coefficient de corrélation entre la teneur en polyphénols et le pouvoir réducteur des extraits de feuilles est élevé (0,93), en accord avec l'étude réalisée par Tachakittirungrod et ses collaborateurs (2007), qui ont obtenu un coefficient de corrélation de 0,98 entre la teneur en polyphénols et le pouvoir réducteur des extraits de *Psidium guajava* (Myrtaceae). Cependant, les extraits de graines présentent une corrélation négative (r = -0,82) entre la teneur en composés phénoliques et leurs pouvoir réducteur.

Une forte corrélation ($r= 0,97$) a été trouvée entre la teneur en flavonoïdes des extraits de feuilles et leurs pouvoirs réducteurs, ce qui est en accord avec des études menées par Erasto (2007), qui a montré que les flavonoïdes isolés de feuilles de *Vernomica amygdalin*, sont de puissants réducteurs. Les extraits de graines présentent une corrélation négative entre le pouvoir réducteur et le taux en flavonoïdes.

Il existe une corrélation positive et significative entre la capacité réductrice des extraits de feuilles et le taux en tannins ($r = 0,83$), alors que celle des extraits de graines est insignifiante ($r = 0,19$). En effet, il a été rapporté par plusieurs auteurs que les tannins sont des agents réducteurs puissants des extraits de plantes médicinales (Zhao et *al.*, 2005 ; Arabshahi et Urooj, 2007; Atmani et *al.*, 2009).

III.5.2. Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-DPPH

De nombreuses études ont montré l'existence d'une corrélation linéaire entre l'activité antioxydant des extraits de plantes et la teneur en composés phénoliques (Djeridane et *al.*, 2006 ; Turkman et *al.*, 2006 ; Atmani et *al.*, 2009 ; Mohsen et *al.*, 2009). L'effet anti-DPPH trouvé dans les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* est en relation avec la teneur en polyphénols totaux dont le coefficient de corrélation est de 0,56, ce qui est en accord avec une étude réalisée par Abubakar et ses collaborateurs (2008), qui ont obtenu un coefficient de corrélation moyen entre l'activité anti-DPPH des extraits de *Mangifira pajang* (Anacardiaceae) et la teneur en composés phénoliques ($r=0,55$). Cependant, une autre étude menée par Gardeli et ses collaborateurs (2008) sur les feuilles de *Pistacia lentiscus* a révélé une corrélation élevée ($r=0,91$) entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydant. Par contre, une corrélation négative ($r = -0,78$) a été observée entre l'activité anti-DPPH et la teneur en phénols totaux des extraits de graines.

D'autre part, les travaux menés par Tachakittirungrod et ses collaborateurs (2007) ont prouvé une faible corrélation entre les valeurs TEAC et le contenu phénoliques des extraits de feuilles de *Psidium guajavae* (Myrthaceae), qui indique que non seulement les composés phénoliques peuvent être impliqués dans l'activité antioxydant, mais aussi d'autres composés, tels que les vitamines et les terpenoïdes.

Une corrélation positive moyenne a été observée entre l'activité scavenging de radical DPPH et le taux en flavonoïdes des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*, qui indique la participation modérée des flavonoïdes dans cette activité.

Alors que les extraits de graines présentent une corrélation négative ($r = -0,72$), ce qui suggère que l'activité anti-DPPH des extraits de graines n'est pas en relation directe avec sa composition en flavonoïdes. L'extrait éthanolique de feuilles de *Dorystoechas hastata* (Lamiaceae), montre une faible corrélation entre la teneur en flavonoïdes et l'activité antioxydante, indiquant une faible contribution des flavonoïdes dans cette activité scavenging (Karagözler et al., 2008).

Les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* présentent une corrélation positive entre les taux en tannins et l'activité scavenging DPPH ($r = 0,65$), qui indique l'implication des tannins dans cette activité. Par ailleurs, une corrélation positive linéaire a été révélée entre l'activité anti-DPPH et la teneur en tannins des extraits de *Corylus avellana* ($R^2 = 0,99$), ce qui suggère leur implication dans cet effet (Contini et al., 2008). Les graines de *Pistacia lentiscus* montre une faible corrélation ($r = -0,42$).

III.5.3. Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti- H_2O_2

Une corrélation positive a été observée entre la teneur en polyphénols des extraits de feuilles ($r = 0,73$) et l'activité scavenging du H_2O_2 , indiquant que l'effet scavenging du H_2O_2 est proportionnel à la teneur en phénols totaux, ce qui suggère leur implication dans cet effet. Des travaux menés par Wang et ses collaborateurs (2007) ont aboutit à l'établissement d'un coefficient de corrélation fort ($r^2 = 0,90$) entre les phénols totaux et l'activité scavenging du H_2O_2 par les extraits de *Arachis hypogaea* (Leguminosae). Cependant ce n'était pas le même cas pour les extraits de graines qui expriment un coefficient de corrélation négatif ($r = -0,55$), indiquant que les composés ayant la capacité scavenging contre le H_2O_2 ne sont probablement pas présents au niveau de ces extraits. L'absence d'une corrélation significative entre la teneur en polyphénols et l'activité scavenging du H_2O_2 a été rapportée par Oktay et ses collaborateurs (2003) sur les extraits de graines de *Foeniculum vulgare* (Apiaceae).

Les coefficients de corrélation entre les taux en flavonoïdes des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* et leurs capacités à piéger le H_2O_2 sont ($r = 0,73$) et ($r = -0,52$), respectivement. D'après les résultats obtenus concernant l'activité scavenging du H_2O_2 par les extraits de feuilles, il paraît évident que leurs teneurs en flavonoïdes soient proportionnelles à leurs activités ; cependant, une faible corrélation négative exprimée par les extraits de graines peut être expliquée par l'absence dans les extraits des composés responsables de l'activité anti- H_2O_2 .

Le coefficient de corrélation entre les taux des tannins des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* et leur activité scavenging du H₂O₂ est de 0,59, suggérant probablement un rôle modeste des tannins dans cette activité. Une étude récente réalisée par Lu et Chen (2008) sur les extraits de feuilles de thé vert a rapporté que l'effet inhibiteur du H₂O₂ exprimé par cette plante est fortement liée aux catéchines gallates (EGCG et ECG) contenus dans leurs extraits. Une faible corrélation négative est observée ($r = -0,35$) dans le cas des extraits de graines.

III.5.4. Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-OH[•]

Les résultats obtenus montrent une corrélation faible mais positive entre la teneur en polyphénols des extraits de feuilles et leurs activités scavenging du radical OH[•] ($r = 0,46$), ce qui suggère que l'activité scavenging du radical OH[•] par les extraits de feuilles n'est pas en relation directe avec sa composition en phénols. Cependant une corrélation négative ($r = -0,78$) est observée dans le cas des extraits de graines.

Une corrélation positive moyenne ($r=0,68$) a été observée entre les taux en flavonoïdes des feuilles de *Pistacia lentiscus* et l'activité scavenging du radical OH[•], qui indique la probable implication des flavonoïdes dans cette activité. Une étude menée par Djeridane et ses collaborateurs (2006) sur une variété de plantes médicinales de la flore algérienne a montré l'existence d'une corrélation significative entre la teneur en flavonoïdes et l'effet antioxydant de ces plantes ($r^2 = 0,78$). Les extraits de graines n'ont présenté aucune corrélation entre l'effet scavenging du radical OH[•] et le taux en flavonoïdes ($r = -0,79$). Su et ses collaborateurs (2008) ont obtenu un coefficient de corrélation ($r = -0,11$) entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antiradicalaire des extraits de fruit de *Citri reticulatae*.

L'effet scavenging du radical OH[•] par les extraits de feuilles peut être dû en partie à sa composition en tannins vu la bonne corrélation ($r = 0,90$), puisque plusieurs études ont rapporté le rôle des tannins dans l'activité antioxydant. Wei et ses collaborateurs (2002) ont montré que le Pistafolia A (gallotannin), composé isolé à partir de feuilles de *Pistacia winmannifolia* (Anacardiaceae), exerce un effet scavenging puissant sur le radical OH[•]. Les extraits de graines présentent une faible corrélation négative ($r = -0,35$) entre l'activité anti-OH[•] et leurs teneurs en tannins. L'étude de Abubakar et ses collaborateurs (2008) a rapporté l'absence d'une corrélation entre la teneur en anthocyanes et l'activité antioxydante des extraits de *Mangifera pajang* (Anacardiaceae).

III.6. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

III.6.1. Activité scavenging du radical DPPH' par les fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

Les résultats de l'activité scavenging du radical DPPH' des différentes fractions chromatographiques obtenues à partir des extraits actifs de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* sont illustrés dans les figures 33 et 34.

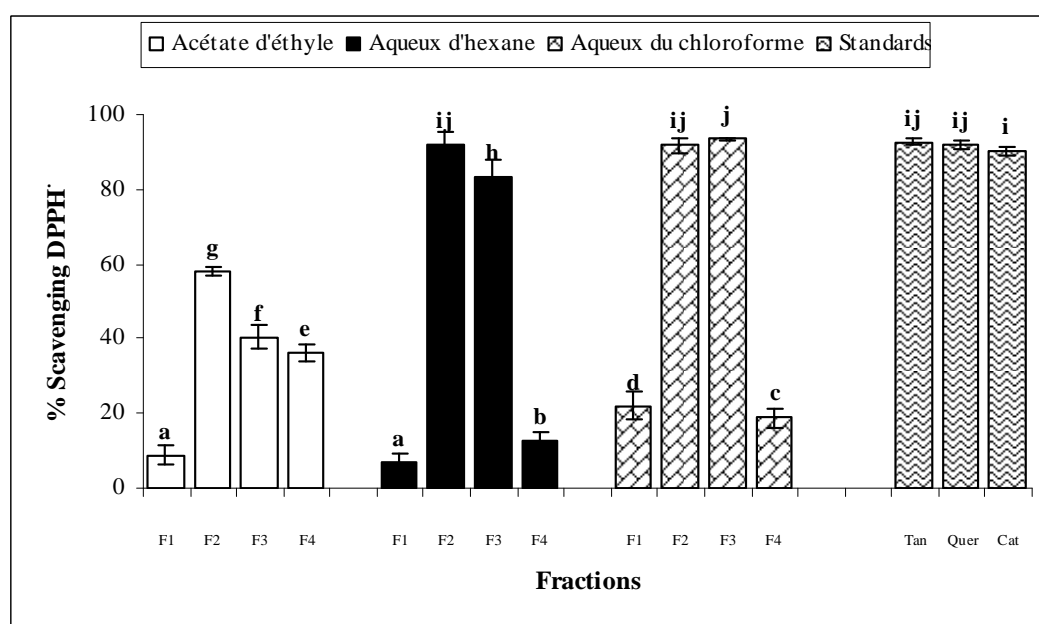


Figure 33 : Activité scavenging du radical DPPH' Par les fractions chromatographiques des extraits actifs de feuilles de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml. Tan : acide tannique, Quer : quercétine, Cat : catéchine.

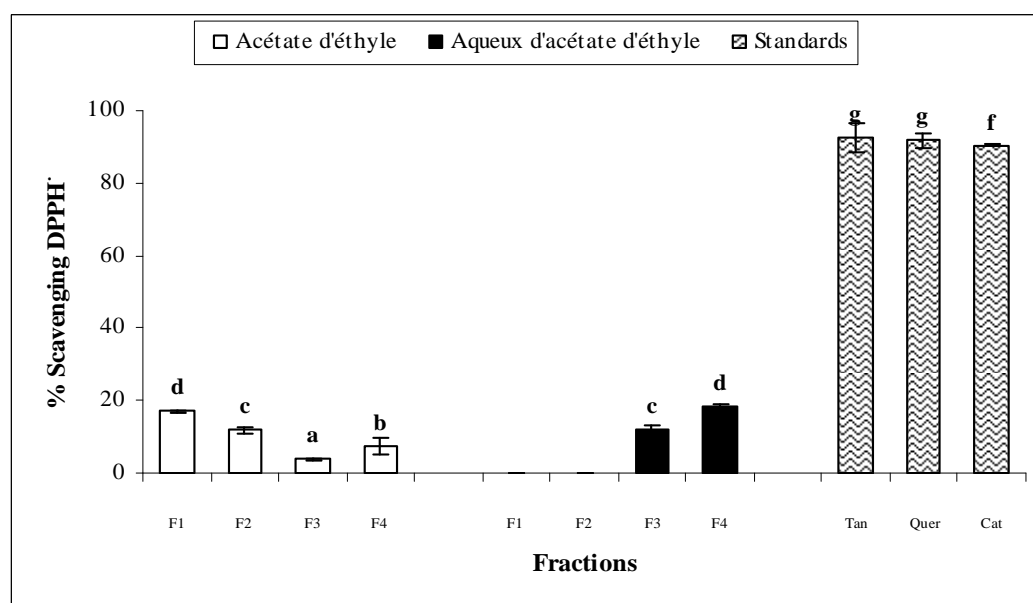


Figure 34 : Activité scavenging du radical DPPH' par les fractions chromatographiques des extraits actifs de graines de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml. Tan : acide tannique, Quer : quercétine, Cat : catéchine

Le fractionnement des extraits acétate d'éthyle, aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* a permis de distinguer deux fractions actives ; F2 et F3 responsables de l'effet scavenging du radical DPPH \cdot . Par ailleurs, ces fractions ont été éluées par un mélange de solvants (acétate d'éthyle-méthanol ; 50 : 50) et (méthanol-eau ; 80 :20), respectivement, ce qui suggère que les molécules responsables de cette activité sont de nature polaire. Comme le montre la figure 33, F2 et F3 issues des extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme ont montré une grande capacité à piéger le radical DPPH \cdot , similaire à celles obtenues par les standards ($p < 0,05$). En effet la fraction F2 issue de la phase aqueuse de l'hexane exhibe une activité anti-DPPH \cdot de 93,61%. D'autre part, l'extrait aqueux d'hexane inhibe le radical DPPH \cdot avec une capacité scavenging de 95,9%, suggérant ainsi que l'activité anti-DPPH \cdot de l'extrait aqueux d'hexane serait due à la présence de composés phénoliques concentrés au niveau de la fraction F2.

Les travaux menés par Topçu et ses collaborateurs (2007) sur les feuilles de *Pistacia terebinthus* ont abouti à la purification d'un composé (I) (hydroxy hyppolaetin 3'-methyl ether), qui exhibe une activité scavenging contre le DPPH \cdot de 25 % à 100 $\mu\text{g/ml}$, largement inférieure à celle obtenue par l'extrait brut. D'autre part le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Hypericum hyssopifolium* (Guttiferaceae) a permis à Cakir et ses collaborateurs (2003) d'obtenir sept fractions, dont la fraction (A) montre un effet scavenging élevé de 95% à une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$.

L'activité antioxydante d'un extrait de plante peu s'effectuer par différents modes. En effet Lacopini et ses collaborateurs (2008) ont montré que les composés phénoliques peuvent agir en synergie ou d'une façon antagoniste avec d'autres composés présents dans l'extrait, mais aussi d'une façon indépendante.

En ce qui concerne les graines, toutes les fractions ont exhibé des activités faibles ; la fraction F1 de l'extrait d'acétate d'éthyle et la fraction F4 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle expriment les activités scavenging les plus élevées avec des pourcentage scavenging de 17,01 % et 18,38 %, respectivement.

III.6.2. Activité scavenging du peroxyde d'hydrogène par les fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

Les résultats de l'activité scavenging du peroxyde d'hydrogène des différentes fractions obtenues à partir des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus* sont représentés dans les figures 35 et 36.

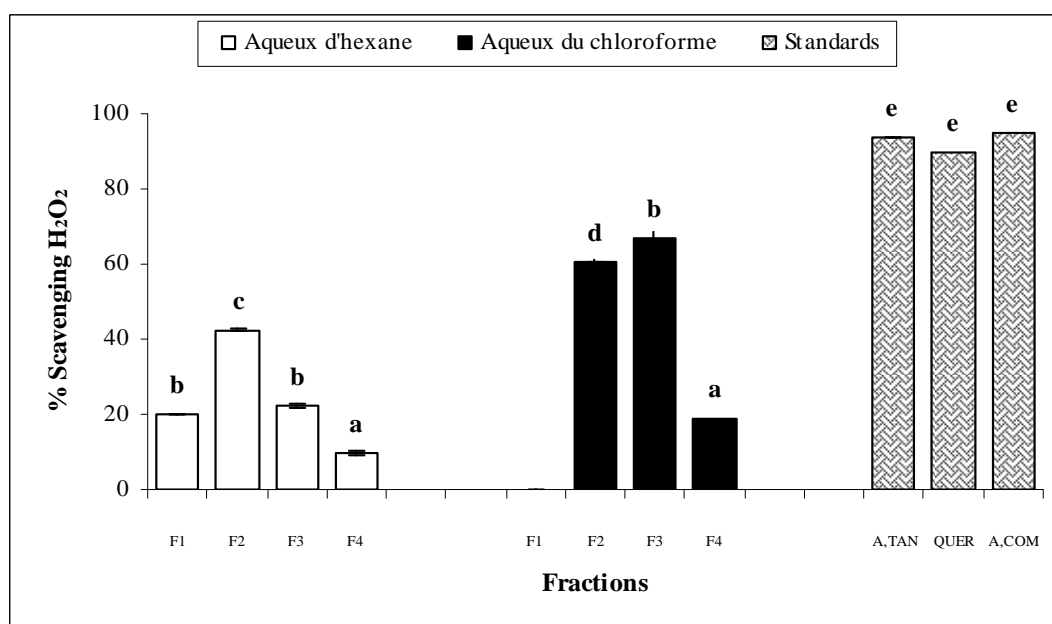


Figure 35 : Activité scavenging du H₂O₂ par les fractions chromatographiques des extraits actifs de feuilles de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml. A.TAN: acide tannique, QUER : quercétine, A.COM acide coumarique.

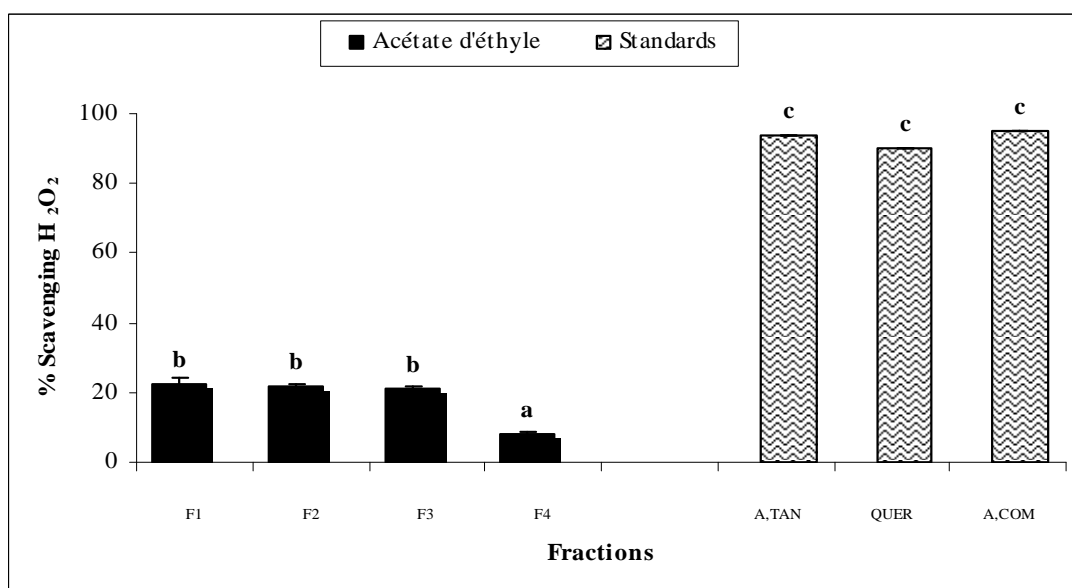


Figure 36 : Activité scavenging du H₂O₂ par les fractions chromatographiques des extraits actifs de graines de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml. A.Tan: acide tannique, Quer : quercétine, A.COM acide coumarique.

Les résultats du fractionnement obtenus par les extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* révèlent que les principes actifs de ces extraits sont concentrés au niveau des fractions F2 et F3, éluées par le mélange de solvant (acétate d'éthyle-méthanol ; 50 :50) et (méthanol-eau ; 80 :20), respectivement, suggérant leur nature polaire.

En effet, la fraction F3 de l'extrait aqueux du chloroforme représente l'activité scavenging la plus élevée ($p < 0,05$) avec un pourcentage scavenging de 66,76% à une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, proche de celle de l'extrait aqueux du chloroforme (74,42%) à la même concentration. D'après ces résultats, on peut donc déduire que l'activité scavenging du peroxyde d'hydrogène exprimée par les antioxydants des extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* est due à l'effet synergique de ces fractions.

Concernant l'extrait acétate d'éthyle de graines, à l'exception de la fraction F4, aucune différence significative n'est observée entre l'activité scavenging H_2O_2 des fractions issus de cet extrait, ce qui laisse présumer que les composés responsables de cette activité ont été réparties entre les différentes fractions, induisant ainsi une diminution de l'activité. Par ailleurs, l'extrait acétate d'éthyle a exhibé une activité scavenging significative de 55,21% à une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Une étude réalisée par Hoe et ses collaborateurs (2007) a montré l'existence d'un effet additif des fractions du même extrait.

III.6.3. Activité scavenging du radical $\text{OH}\cdot$ par les fractions chromatographiques des extraits actifs de *Pistacia lentiscus*

Les figures 37 et 38 montrent les résultats de l'activité scavenging du radical $\text{OH}\cdot$ des différentes fractions obtenues à partir des extraits de feuilles et de graines de *P. lentiscus*.

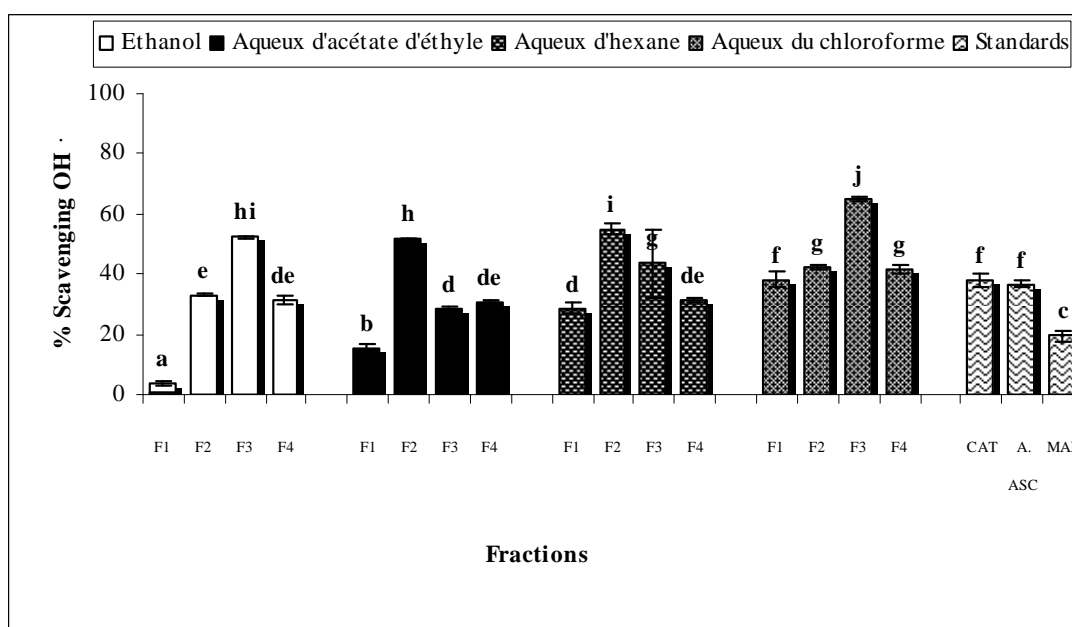


Figure N° 37 : Activité scavenging du radical $\text{OH}\cdot$ par les fractions chromatographiques des extraits actifs de feuilles de *Pistacia lentiscus* à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. CAT: catéchine, A.ASC : acide ascorbique, MAN : mannitol.

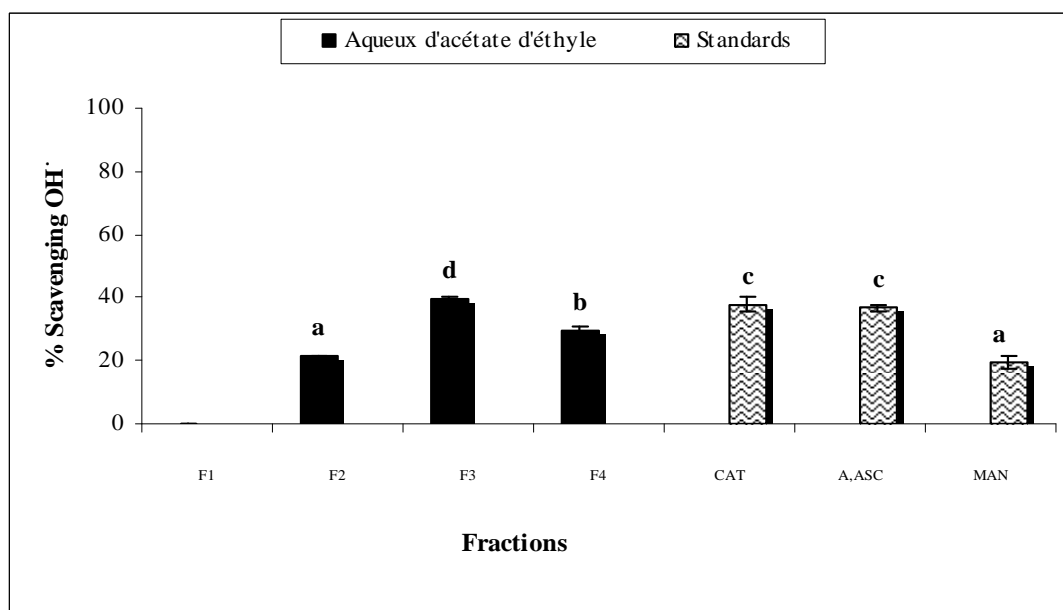


Figure 38 : Activité scavenging du radical OH[•] par les fractions chromatographiques des extraits actifs de graines de *Pistacia lentiscus* à 100 µg/ml. CAT: catéchine, A.ASC : acide ascorbique, MAN : mannitol.

D'après la figure 37, on remarque que toutes les fractions, à l'exception de la fraction F1 des extraits éthanol et aqueux d'acétate d'éthyle, présentent une capacité de capture du radical OH[•] nettement supérieure à celle exprimée par les molécules de références ($p < 0,05$). Les résultats obtenus montrent également que les antioxydants responsables de l'effet scavenging du radical OH[•] sont répartis entre les fractions F2 et F3 obtenues respectivement par les systèmes d'élution : (acétate d'éthyle-méthanol ; 50 : 50) et (méthanol- eau ; 80 : 20). La fraction F3 de l'extrait aqueux du chloroforme exhibe une capacité scavenging de 64,89%, similaire à celle obtenue par l'extrait ($p < 0,05$).

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* pourraient contenir plusieurs composés fonctionnels à activité anti-radicalaire, de ce fait le dosage des extraits de feuilles montre des teneurs élevées en composés phénoliques ($p < 0,05$) ayant un potentiel élevé de capture des radicaux libres. Les études menées par Kosar et ses collaborateurs (2007) sur l'effet scavenging des extraits de feuilles de *Rhus cirtaria* (Anacardiaceae) ont montré que l'extrait de méthanol a exhibé le pourcentage d'inhibition le plus élevé sur le radical OH[•], ceci est dû aux nombreuses substances, essentiellement les tannins (acide gallique et acide digalique), extraites par ce solvant. Il a été démontré que le Pistafolia A (gallotannin), composé isolé des extraits de feuilles de *Pistacia weinmannifolia*, exerce un effet scavenging puissant sur le radical OH[•] (Wei et al., 2002).

Le fractionnement de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle de graines a donné seulement trois fractions (figure 38), dont la F3 montre une capacité scavenging élevée (39,89%) contre le radical OH[•], supérieure à celles obtenues par les molécules de références (p< 0,05).

III.7. Caractérisation des fractions actives des extraits de *Pistacia lentiscus*

III.7.1. Activité anti-DPPH[•] des fractions actives des extraits de *Pistacia lentiscus* sur CCM

L'utilisation du système acétate d'éthyle-Acide formique-Acide acétique-Eau (100 : 11 : 11 : 26) sur les fractions issues des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* a donné les chromatogrammes suivants :

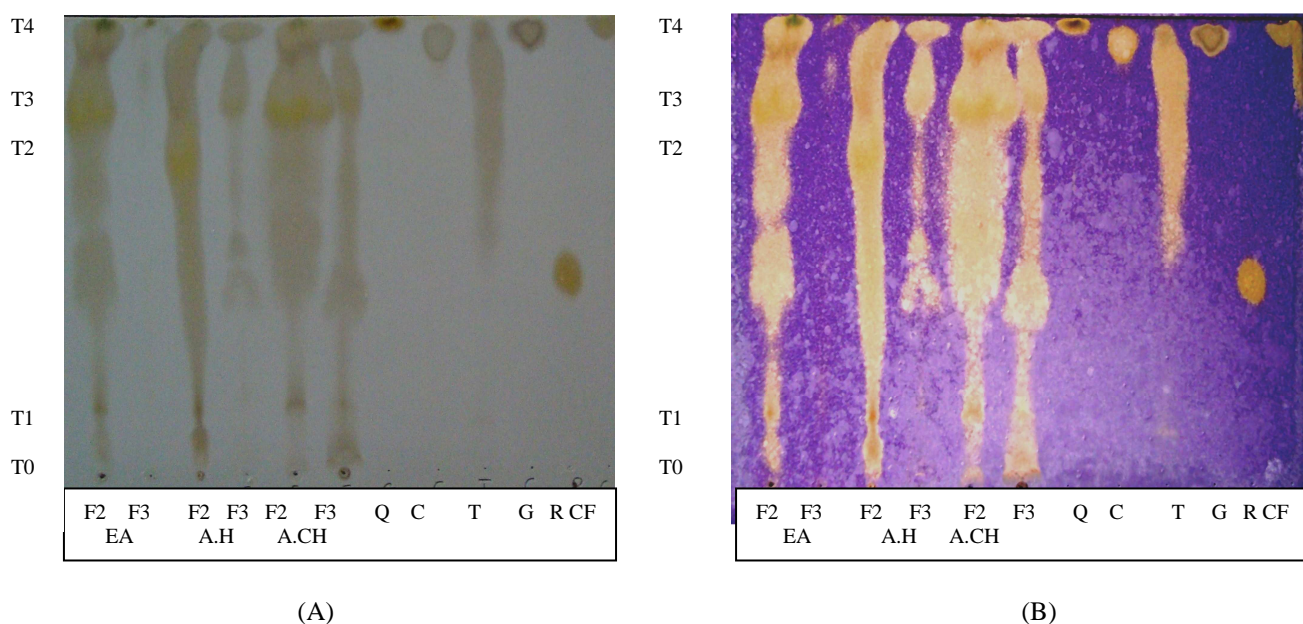


Figure 39 : Chromatogrammes des fractions actives des extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* avec le système (EA-AF-AAC-H₂O) : (100-11-11-26).

(A) : observation à la lumière du jour. (B) : pulvérisation avec la solution éthanolique de DPPH[•]. (F2-F3 – EA : fractions 2 et 3 de l'extrait d'acétate d'éthyle), (F2-F3 – A.H : fractions 2 et 3 de l'extrait aqueux d'hexane), (F2-F3 – A.CH : fractions 2 et 3 de l'extrait aqueux du chloroforme), Q : quercétine, C : catéchine, T : acide tannique, G : acide gallique, R : rutine, CF : acide caféique.

Les rapports frontaux des différentes fractions ont été calculés selon la relation suivante :

Distance parcourue par la substance

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

Le tableau IV présente les rapports frontaux obtenus pour les différentes fractions actives.

Tableau IV : Caractéristiques des chromatogrammes des fractions actives des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus*, pulvérisée par la solution de DPPH.

Taches (sous fractions)	Feuilles			Graines		
	Rf	Observation à la lumière du jour	Pulvérisation par la solution de DPPH	Rf	Observation à la lumière du jour	Pulvérisation par la solution de DPPH
T0	0	Grise claire	Jaune claire	0	Grise claire	Jaune claire
T1	0,10	Grise claire	Jaune claire	0,17	Grise claire	Jaune claire
T2	0,72	Grise foncée	Jaune foncée	0,75	Grise foncée	Jaune claire
T3	0,82	Grise foncée	Jaune foncée	0,92	Grise foncée	Jaune claire
T4	0,96	Grise foncée	Jaune foncée	/	/	/

La figure 39 montre clairement les différentes taches (sous fractions) obtenues par le système : EA : AF : AAc : H₂O (100 : 11 : 11 : 26) qui sont soumises à une pulvérisation par la solution de DPPH. La décoloration de cette solution (couleur violette) en jaune indique une activité anti-DPPH de la fraction considérée. Toutes les fractions, à l'exception de la fraction F3 issue de l'extrait acétate d'éthyle, ont présenté plusieurs tâches à différents Rf (tableau IV), à savoir 5 pour la fraction F2 de l'extrait aqueux d'hexane, 4 pour la fraction F2 de l'extrait acétate d'éthyle et aqueux du chloroforme et 3 taches pour la fraction F3 de l'extrait aqueux du chloroforme. Toutes les fractions, à l'exception de la fraction F3 de l'extrait acétate d'éthyle et aqueux d'hexane, révèlent des taches au niveau du dépôt de la même intensité de la catéchine, qui peuvent être des tannins à haut poids moléculaire, ce qui empêche leur migration. De plus, la présence des tâches communes entre ces fractions caractérisées par les mêmes Rf (T0, T1, T3 et T4) indique l'existence des mêmes composés au niveau de ces fractions.

La quercétine (Q) et l'acide gallique (G) migrent le plus loin au voisinage de la T4, suggérant que celle-ci présente les mêmes propriétés physico-chimiques que la quercétine et l'acide gallique, des composés identifiés par plusieurs auteurs au niveau des extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* (Romani et al., 2002 ; Longo et al., 2007 ; Benhamou et al., 2008).

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que l'activité anti-DPPH obtenue par les extraits bruts de feuilles de *Pistacia lentiscus* résulte de l'activité de plusieurs composés de différentes fractions isolées par chromatographie sur colonne de gel de silice.

La figure ci-dessous montre les chromatogrammes des fractions actives des extraits de graines de *Pistacia lentiscus*.

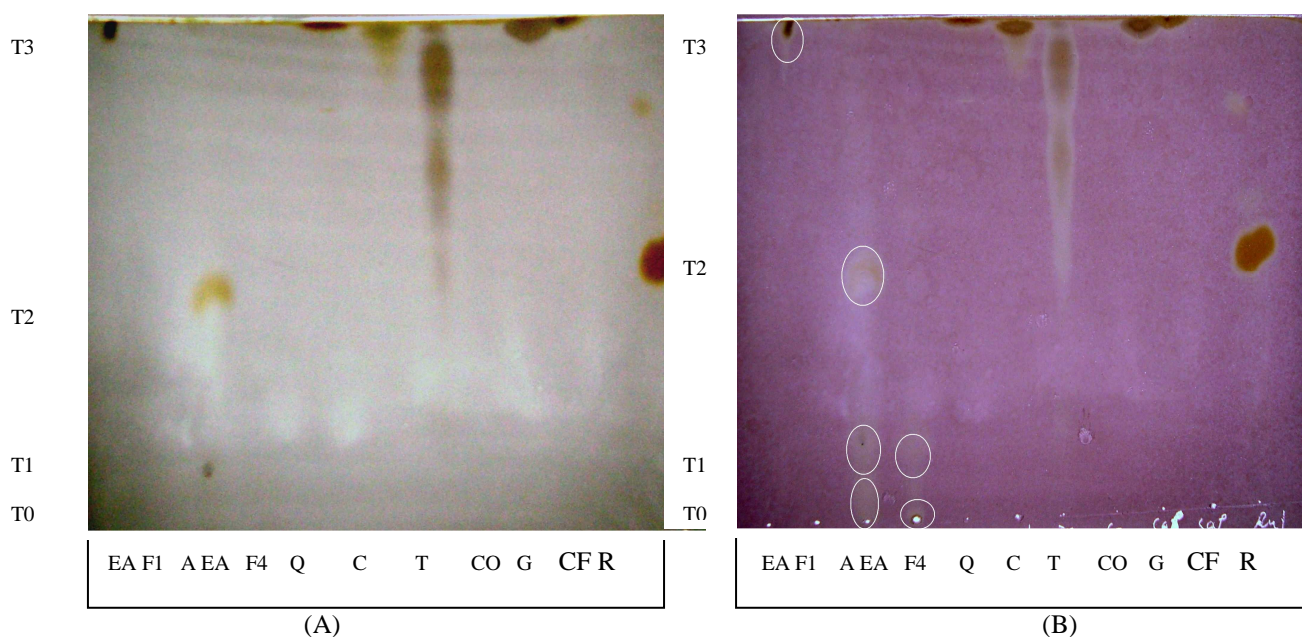


Figure 40 : Chromatogrammes des fractions actives des extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle de graines de *Pistacia lentiscus* avec le système (EA-AF-AAC-H₂O) :(100-11-11-26).

(A) : observation à la lumière du jour. (B) : pulvérisation avec la solution éthanolique de DPPH . (EA-F1 : l'extrait d'acétate d'éthyle et la fraction 1), (AEA-F4 : l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle et la fraction 4), Q : quercétine, C : catéchine, T : acide tannique, CO : acide coumarique, G : acide gallique, CF : acide caféique, R : rutine.

D'après la figure 40, la fraction F4 montre des tâches T0 et T1 de même Rf que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle duquel est issue cette fraction qui manifeste une légère activité anti-DPPH, illustrée par la faible décoloration. Une faible décoloration a été également observée au niveau de l'extrait d'acétate d'éthyle et pratiquement nulle pour la fraction F1 issue de cet extrait. Par ailleurs, les tests spectrophotométriques montrent des pourcentages scavenging élevés de l'extrait d'acétate d'éthyle et aqueux d'acétate d'éthyle par rapport aux fractions séparées de celui-ci, en exhibant des pourcentages scavenging de 50,03% et 51,09%, respectivement, tandis que les fractions F1 et F4 montrent des pourcentages scavenging de 17,01% et 18,38%, respectivement. Cet effet peut être expliqué par la richesse de ces extraits en composés variés et lors du fractionnement chacun exerce son effet à part, ce qui explique les pourcentages inférieurs à celui des extraits. La présence de fractions n'ayant pas migré (T0 et T1) au niveau de la fraction F4 issue de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, peut s'expliquer par la complexité des structures des composés phénoliques contenus dans ces fractions, qui peuvent se retrouver sous forme oligomériques ou polymériques avec des poids moléculaires élevés.

En effet, la présence des tannins hydrolysables au niveau des extraits de graines de *Pistacia lentiscus* a été confirmée par des travaux menés par Abdelwahed et ses collaborateurs (2007), qui ont isolé l'acide tannique (pentagalloyglucose) et l'acide gallique. D'autre part, une étude récente réalisée par Bhourri et ses collaborateurs (2009) a abouti à l'isolement de l'acide digallique à partir des extraits de graines de *Pistacia lentiscus*. L'activité faible ou même nulle de la fraction F1 de l'extrait acétate d'éthyle peut être due à la structure des polyphénols, contenus dans ces fractions ou à une concentration insuffisante de polyphénols, pour exercer un effets scavenging contre le radical DPPH.

D'après ces résultats, l'activité anti-DPPH exercée par les extraits de *Pistacia lentiscus* résulte de la réaction simultanée de différentes substances contenues dans ces extraits. Par ailleurs, l'additivité et la synergie de l'activité anti-DPPH des composés phénoliques ont été rapporté par Heo et ses collaborateurs (2007).

III.7.2. Caractérisation des fractions actives des extraits de *Pistacia lentiscus* par la vanilline sulfurique

La révélation par la vanilline sulfurique des chromatogrammes des fractions actives issues des extraits aqueux d'éthyle acétate, aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus*, fait apparaître différentes tâches d'intensité et de coloration variées comme le montre la figure 41 ; les rapports frontaux des constituants séparés ont été calculés et résumés dans le tableau V.

Tableau V : Caractéristiques des chromatogrammes des fractions actives des extraits de feuilles et de graines de *Pistacia lentiscus*, révélées par la vanilline sulfurique.

	Extraits de feuilles				Extraits de graines	
	Fractions des extraits organiques		Fractions des extraits aqueux			
	Rf	couleurs	Rf	couleurs	Rf	couleurs
T0	0	Rouge clair	0	Rouge foncé	0	Rouge clair
T1	0,14	Rouge clair	0,17	Rouge foncé	0,25	Rouge clair
T2	0,42	Violet	0,45	Violet clair	0,97	Gris
T3	0,50	Jaune orange	0,57	Violet/ jaune	/	/
T4	0,65	Jaune orange	0,67	Jaune/Violet	/	/
T5	0,75	Gris/ violet clair	0,71	Jaune orange	/	/
T6	0,96	Gris	0,85	Jaune orange	/	/
T7	/	/	0,96	Jaune clair	/	/

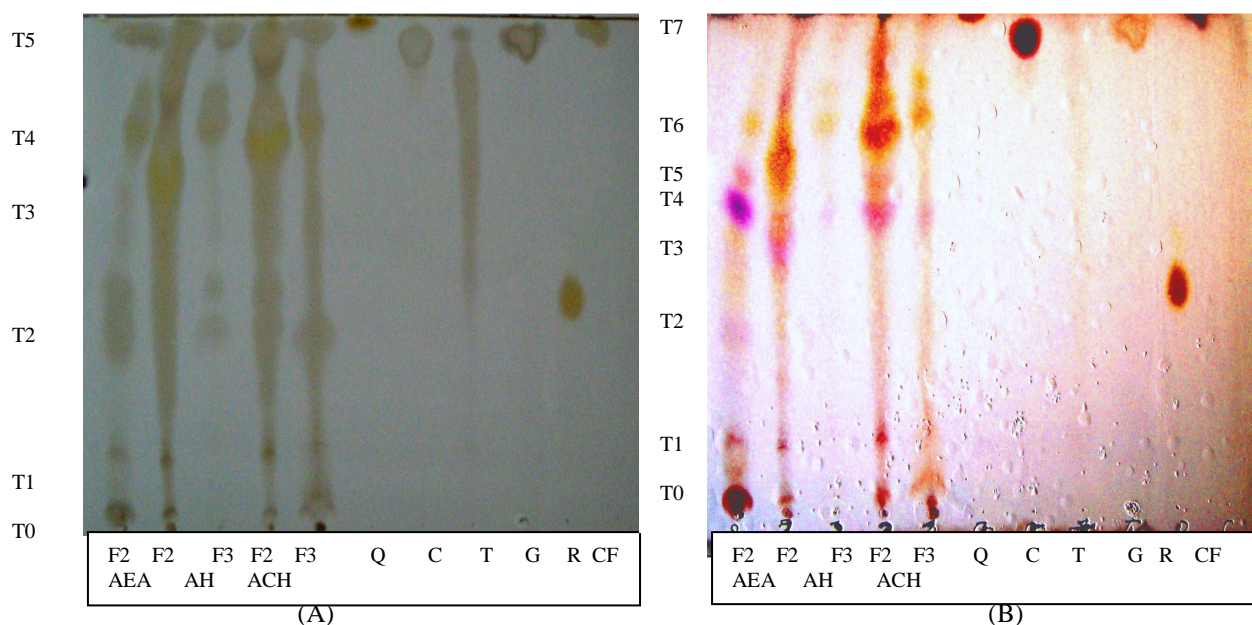


Figure 41 : Chromatogrammes des fractions actives des extraits aqueux de feuilles de *Pistacia lentiscus* avec le système (EA-AF-AAC-H₂O): (100-11-11-26).

(A): observation à la lumière du jour. (B): révélation avec la vanilline sulfurique. (F2 – AEA : fractions 2 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle), (F2 -F3 –AH: fractions 2 et 3 de l'extrait aqueux d'hexane), (F2 -F3 –ACH: fractions 2 et 3 de l'extrait aqueux du chloroforme), Q : quercétine, C : catéchine, T : acide tannique, G : acide gallique, R : rutine, CF : acide caféique.

Plusieurs tâches de coloration et de Rf variées ont été observées, aussi bien pour les fractions actives de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme de feuilles de *Pistacia lentiscus* ; néanmoins, des composés non élués par le système considéré comme T0 ont été également observés.

La vanilline sulfurique a révélé sur cette plaque sept tâches de couleurs et de Rf différents pour la fraction F2 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle, six tâches pour la fraction F2 de l'extrait aqueux d'hexane et cinq tâches pour les fractions F2 et F3 de l'extrait aqueux du chloroforme, tandis que la fraction F3 de l'extrait aqueux d'hexane montre seulement deux tâches (tableau N°V). Ceci est probablement dû à l'hydrolyse acide des composés polymériques de T0 et libérés de ce fait sous forme de composés moins complexes à savoir oligomériques ou monomériques (Andriambeloson et *al.*, 1998). La tâche T5 de couleur jaune observée à la lumière du jour est concentrée dans toutes les fractions testées, elle présente les mêmes couleurs et Rf que la quercétine, l'acide gallique et l'acide caféique. Ceci pourrait supposer que la tâche T5 correspond à ces molécules ou l'un de leur dérivés, vu que ces substances ont été rapportées dans différents extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* (Romani et *al.*, 2002 ; Longo et *al.*, 2007 ; Benhamou et *al.*, 2008).

De plus, toutes les fractions, à l'exception de la fraction F3 de l'extrait aqueux d'hexane, révèlent des tâches au niveau du dépôt de la même couleur que la catéchine et qui peuvent être des tannins condensés à haut poids moléculaire (Mueller-Harve, 2001). L'absence de cette tache dans la fraction F3 laisse supposer que l'hydrolyse a permis la migration des monomères résultants.

Les chromatogrammes des fractions actives des extraits de l'éthanol et de l'acétate d'éthyle de feuilles de *Pistacia lentiscus* comportent une série de tâches qui sont présentés dans la figure ci-après :

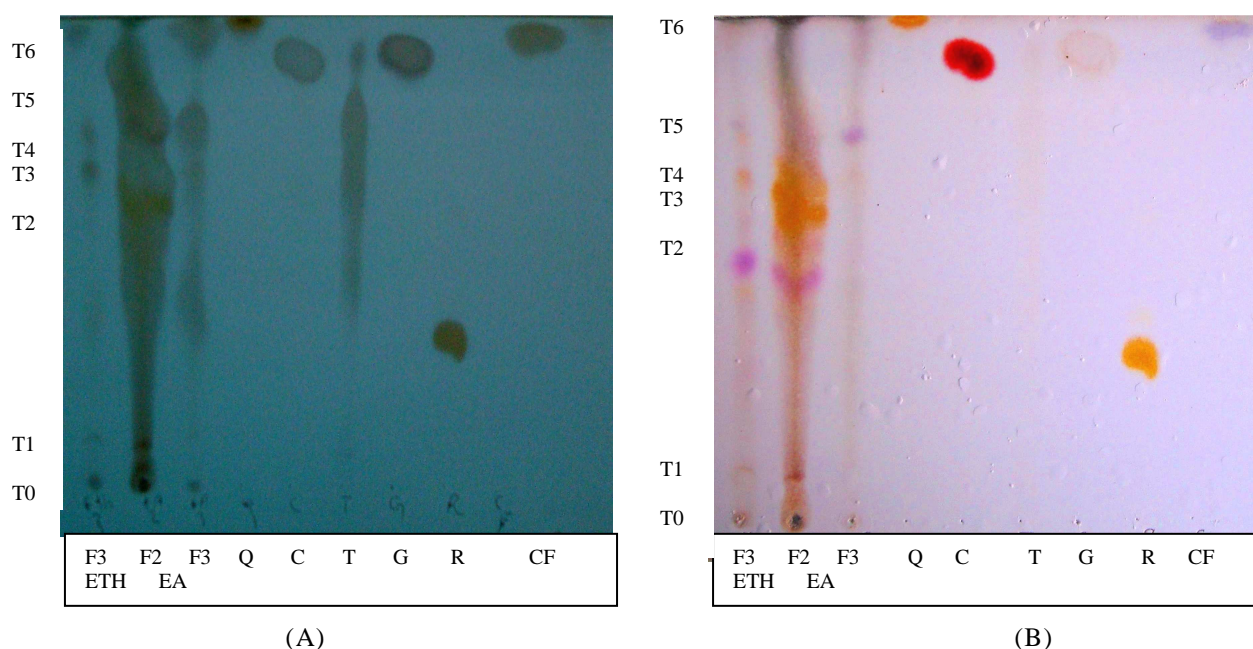


Figure 42 : Chromatogrammes des fractions actives des extraits organiques de feuilles de *Pistacia lentiscus* avec le système (EA-AF-AAC-H₂O) :(100-11-11-26).

(A): observation à la lumière du jour. (B): révélation avec la vanilline sulfurique. (F3 – ETH : fractions 3 de l'extrait éthanolique), (F2 -F3 – EA: fractions 2 et 3 de l'extrait d'acétate d'éthyle). Q : quercétine, C : catéchine, T : acide tannique, G : acide gallique, R : rutine, CF : acide caféique

La révélation par la vanilline sulfurique des chromatogrammes des fractions issues des extraits éthanolique et acétate d'éthyle de feuilles a permis de mettre en évidence d'autres composés qui ne sont pas visibles à la lumière du jour. Ces chromatogrammes montrent la diversité et la richesse de la fraction F2 issue de l'extrait d'acétate d'éthyle qui révèle six tâches de couleurs et de Rf différents.

D'autre part, la fraction F3 de l'extrait éthanolique montre cinq tâches, tandis que deux tâches seulement ont été observées au niveau de la fraction F3 de l'extrait acétate d'éthyle.

La présence des tâches communes (T0, T2, T4 et T6) entre ces fractions indique la présence des composés similaires. Mueller-Harve (2001) a démontré que la présence des tâches de couleur rouge sur CCM au niveau du point de dépôt (sans migration) avec l'utilisation de la vanilline comme révélateur, indique la présence des oligomères de tannins condensés, ce qui est en accord avec notre étude, où les deux fractions F3 et F2, issues respectivement des extraits éthanolique et acétate d'éthyle, ont exhibé des tâches rouges au niveau du dépôt, ce qui nous conduit à la même conclusion. Ainsi la quercétine présente le même Rf que la tâche T6 qui caractérise les trois fractions testées.

Par ailleurs la présence des tâches de différentes couleurs indique la richesse de ces fractions en différents composés ; de ce fait, la présence des flavonoïdes est révélée par la couleur jaune (T4), alors que la couleur violette (T3) correspond à des terpènes (Jork et *al.*, 2004).

Le nombre élevé de tâches et leurs colorations variées révélées par la vanilline sulfurique n'est qu'une confirmation de la richesse et la diversité des composés phénoliques contenus dans les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus*. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté la diversité des composés contenus dans la plante *Pistacia lentiscus*, appartenant à différents classes de composés phénoliques (Romani et *al.*, 2002 ; Longo et *al.*, 2007 ; Benhamou et *al.*, 2008).

Les chromatogrammes des fractions actives des extraits de graines sont illustrés dans la figure suivante :

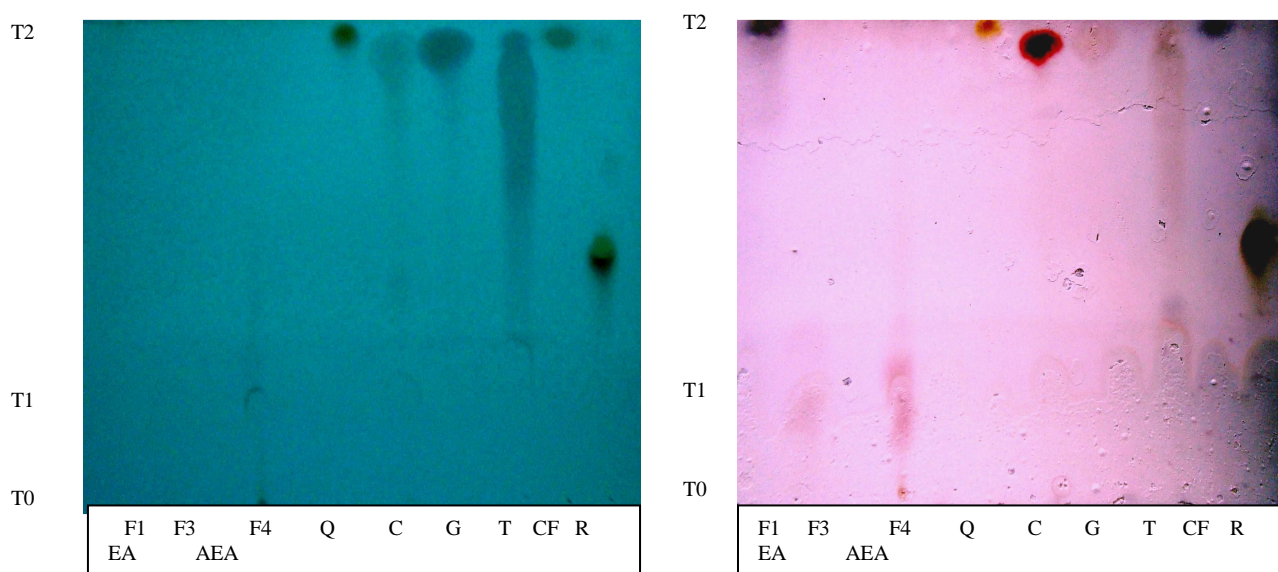


Figure 43 : Chromatogrammes des fractions actives des extraits, acétate d'éthyle, aqueux d'acétate d'éthyle de graines de *Pistacia lentiscus* avec le système (EA-AF-AAC-H₂O) : (100-11-11-26).

(A): observation à la lumière du jour. (B) : révélation avec la vanilline sulfurique (EA-F1) : la fractions 1 de l'extrait d'acétate d'éthyle), (AEA-F3-F4 : les fraction 3 et 4 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle), Q : quercétine, C : catéchine, G : acide gallique, T : acide tannique CF : acide caféique, R : rutine.

Les chromatogrammes de la figure 43 nous ont permis de distinguer deux tâches au niveau de la fraction F4 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle ; cependant, une seule tâche a été observée au niveau des fractions F1 et F3 des extraits organique et aqueux d'acétate d'éthyle, respectivement.

Les deux premières tâches (T0 et T1) de la fraction F4 et la tâche T1 de la fraction F3 de l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle présentent une couleur rouge claire après traitement avec la vanilline sulfurique. Ces composés séparés peuvent correspondre aux composés polymériques qui ont migré suivant leur poids moléculaires. La révélation des chromatogrammes des fractions actives des extraits de graines avec la vanilline sulfurique a permis de mettre en évidence d'autres fractions non visibles à la lumière du jour. Par ailleurs, la T2 de la fraction F1 de l'extrait acétate d'éthyle montre le même Rf que l'acide caféique, ce qui suggère la présence de ce composé au niveau de cette fraction.

Conclusion et perspectives

Pistacia lentiscus a été choisie en raison de son utilisation en médecine traditionnelle dans le sud de la méditerranée (Nord africain), notamment en kabylie.

L'extraction des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus* a été réalisée selon un protocole sélectif, basé sur l'utilisation des solvants de différentes polarités qui nous ont permis d'obtenir les différents extraits qui ont subi différents tests anti-radicalaires.

L'évaluation quantitative des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins indique la richesse des extraits de feuilles en ces molécules par rapport à ceux des graines. Cette différence peut être expliquée par la différence entre les parties végétales utilisées.

La mesure du pouvoir réducteur a montré que les extraits de feuilles possèdent une capacité réductrice très élevée; l'extrait aqueux du chloroforme exhibe une capacité réductrice similaire à celle de l'acide tannique. Les extraits de graines, quant à eux, ont exhibé un pouvoir réducteur faible.

Les tests de l'activité anti-radicalaire montrent que les extraits de feuilles ont un pouvoir scavenging important à 100 µg/ml contre le radical DPPH \cdot , le H₂O₂ et le radical OH \cdot . Le meilleur effet scavenging du radical DPPH \cdot a été obtenu par les extraits d'acétate d'éthyle, aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme en exprimant des IC₅₀ de 5,20µg/ml, 4,09µg/ml et 3,84µg/ml, respectivement, alors que la catéchine montre une IC₅₀ de 5,59 µg/ml. L'extrait d'acétate d'éthyle de graines exprime une IC₅₀ de 108,88 µg/ml, ce qui suggère un faible effet scavenging des extraits de graines contre le radical DPPH \cdot .

Les extraits de feuilles ont également montré un effet inhibiteur contre le peroxyde d'hydrogène, notamment les extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme ayant des IC₅₀ similaires à celle montrée par l'acide coumarique avec les valeurs de 51,82 µg/ml, 56,72 µg/ml et 51,7 µg/ml, respectivement. L'extrait d'acétate d'éthyle de graines montre une IC₅₀ de 91,8 µg/ml contre le H₂O₂.

En ce qui concerne l'activité anti-OH \cdot , les extraits de feuilles ont montré des pourcentages d'inhibition importants à 100µg/ml, notamment les extraits aqueux tels que l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle qui exhibe le meilleur effet scavenger contre le OH \cdot , avec une IC₅₀ de 20,64 µg/ml.

Le fractionnement des extraits actifs de feuilles de *Pistacia lentiscus* par chromatographie sur colonne de gel de silice nous a permis d'obtenir quatre fractions, dont la F2 et la F3 ayant montré un pouvoir anti-radicalaire important contre le DPPH[·], le H₂O₂ et le radical OH[·], par ailleurs ces fractions ont été éluées par un mélange de solvants (acétate d'éthyle-méthanol ; 50:50) et (méthanol-eau ; 80:20), respectivement. Un test qualitatif préliminaire de l'activité antiradicalaire en utilisant le radical DPPH[·] a été réalisée pour évaluer le pouvoir scavenger des différentes fractions obtenues sur CCM. Les fractions actives des feuilles ont exprimé cette activité par une décoloration de la solution du DPPH[·] contrairement aux graines qui manifestent une légère activité anti-DPPH[·] illustrée par la faible décoloration.

L'utilisation de la CCM nous a permis de visualiser plusieurs tâches de couleurs et de Rf différents dans chaque fraction par une pulvérisation avec la vanilline sulfurique. La comparaison des Rf et des couleurs des différentes tâches avec les standards utilisés comme références nous a permis de déceler la présence probable de l'acide gallique, l'acide caféique, la quercétine ainsi que les tannins catéchiques au niveau des fractions actives issues des extraits de feuilles. L'analyse chromatographique des fractions actives issues des extraits de graines à la lumière du jour et avec la vanilline sulfurique a révélé la présence modérée des tannins catéchique au niveau de ces fractions. Ces résultats ont été consolidés par le dosage des phénols totaux au niveau des extraits bruts, ce qui démontre la diversité et la richesse des fractions actives obtenus à partir des extraits de feuilles en composés phénoliques par rapport à ceux des graines.

Il serait intéressant d'exploiter ces fractions en utilisant d'autres tests anti-oxydant: O₂^{-·}, NO[·]... De plus, d'autres tests biologiques à savoir l'activité anti-inflammatoire, anti-diabétiques...etc seront d'un apport complémentaire certain quant à la validation expérimentale de *Pistacia lentiscus* comme plante médicinale.

*Références
bibliographiques*

- Abdeldjebbar, A. L. H.; Humam, M.; Amzazi, S.; Hostettman, K.; Bekouche, K.; Christen, P. and Bendjouad, A. (2006). Analyse chimique et propriétés anticancéreuses et antifongique de *Withania adpressa* coss. *Biochimie, Immunologie et Santé* : 201-203.
- Abdelwahed, A.; Bouhlel, I.; Skamdrani, I.; Valenti, K.; Kadri, M.; Guirand, P.; Steiman, R.; Mariotte, A. M.; Gherdia, K.; Laporte, F.; Dijoux- Franca, M.G. and Chekir-Ghedira, L. (2007). Study of antimutagenic and antioxidant activities 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions*, 165: 1–13.
- Abubakar, M.F.; Mohamed, M.; Rahmat, A. and Fry, J. (2008). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). *Food Chemistry*, 113: 479-483.
- Afonso, V.; Champy, R.; Mitrovic, D.; Collin, P.; and Lomry, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, 74: 636-643.
- Ahmad, N. S.; Farman, M.; Najmi, M. H.; Mian, K. B. and Hasan, A. (2008). Pharmacological basis for use of *Pistacia integerrima* leaves in hyperuricemia and gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 478-482.
- Ak, T. and Gulcin, I. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174: 27-37.
- Amarowicz, R.; Dykes, G. A. and Pegg, R. B. (2008). Antibacterial activity of tannin constituents from *Phaseolus vulgaris*, *Fagopyrum esculentum*, *Corylus avellana* and *Juglans nigra*. *Fitoterapia*, 79: 17–219
- Andriambelson, E.; Magnier, C.; Archipoff, G. H.; Lebostien, A.; Anton, R.; Bertz, A.; Stoclet, J. C.; and Andriansitohaina, R. (1998). Natural dietary polyphenolic compound cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *The journal of Nutrition*, 128: 2324-2333.
- Anila, L. and Vijayalakshmi, N.R. (2002). Flavonoides from *Embllica officinalis* and *Mangifera indica*- effectiveness for dyslipidemia. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 81-87.
- Arabshahi, D. S. and Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102: 1233-1240.
- Atmani, D.; Chafer, N.; Berboucha, M.; Ayouni, K.; Lounis, H.; Boudaoud, H.; Debbache, N. and Atmani, D. (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, 112: 303-309.
- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Science*, 22(3): 266-272.
- Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Médecine Thérapeutique Cardiologie*, 2 (1): 43-52
- Benhammou, N.; Bekkara, A.F.; and Panovska, T. K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of pharmacy and Pharmacology*, 2(2): 022-028.

- Berger, M. M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20: 48-53.
- Berthod, A.; Billardello, B and Geoffroy, S. (1999). Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. *Analysis*, 27: 750-757.
- Bhourri, W.; Derbel, S.; Skandrani, I.; Boubaker, J.; Bouhlel, I.; Sghaier, M. B.; Kilani, S.; Mariotte, A. M.; Dijoux-Franca, M.G.; Ghedira, K. and Chekir-Ghedira, L. (2009). Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicology in Vitro*. Article in press
- Bonnefont-Rousselot, D. (2007). Stress oxydant et vieillissement. *Spectra Biologie*, 157: 23-26.
- Bossé, Y.; Joannis, D. and Boulay, M. (2003). Modulations redox de la contraction musculaire. *Science et Motricité*, 50 (3): 7-31.
- Boughdad, A.; Gillon, Y. and Gagnepain, C. (1986). Influence des tanins condensés du tégument de fèves (*Vicia faba*) sur le développement. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 42: 125-132.
- Broisat, A.; Riou, L.; Fagret, D. and Ghezzi, C. (2005). Physiopathologie de la plaque d'athérome vulnérable. *Médecine Nucléaire - Imagerie Fonctionnelle et Métabolique*, 29(4) : 198-202.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. Technique et documentation. Edition, *Lavoisier*, 3: 286-347.
- Brusselemens, K.; Vrolix, R.; Verhoeven, G. and Swinnen, J. V. (2005). Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acids synthase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(7): 5636-5646.
- Cai, Y. Z.; Sun, M.; Xing, J.; Luo, Q. and Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 2872 – 2888.
- Cakir, A.; Mavi, A.; Yildirim, A.; Duru, M. E.; Harmandar, M. And Kazaz, C. (2003). Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology*, 87: 73–83.
- Çanakçi, C. F.; Çiçek, Y. and Çanakçi, V. (2005). Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Moscow)*, 70(6): 619-628.
- Capel, F. ; Demaison, L. ; Morio, B. ; Rimbart, V. ; Mirand, P. P. and Mosoni, L. (2006). Rôle des mitochondries dans le développement d'un stress oxydant dans le muscle squelettique au cours du vieillissement. *INRA Production Animale*, 19 (4): 305-318.
- Charef, M.; Yousfi, M.; Saidi, M. and Stocker, P. (2008). Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85: 921-924.
- Chiang, H. S.; Juilo, Y.; and Lu, F. J. (1994). Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Alsophila spinulosa* (hook) Tryon. *Journal of Enzyme Inhibition*, 8(1): 61-71.

- Chira, K. ; Suh, J.H. ; Saucier, C. and Teissèdre, P. L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6 : 75-82.
- Cillard, J. and Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(1) : 24-29.
- Contini, M. ; Baccelloni, S. ; Massantini, R. and Anelli, G. (2008). Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*, 110: 659-669.
- Cotelle, N. (2001). Role of Flavonoids in Oxidative Stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1: 569-590.
- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Van poel, B.; Pieters, I.; Vlietinck, A. J. and Berghe, D. V. (1998). Structure- activity relationship and classification of flavonoides as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61: 71-76.
- Cowan, M. (1994). Plant products as antimicrobial agent. *Clinical Microbiology Review*, 12: 565-571.
- Croteau, R.; Kutchan, M. T. and Lewis, G. N. (2000). Natural products (Secondary metabolites). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, *American Society of Plant Physiologists*, 1250-1318.
- Delemasure, S.; Vergely, C.; Zeller, M.; Cottin, M. and Rochette, L. (2006). Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines : approche fondamentale des mécanismes mis en jeu ; relations avec les données cliniques. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 55 : 104-112.
- Demoffarts, B.; Kirschvink, N.; Pincemail, J. and Lekeux, P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 149 : 1-9.
- Debandt, J. P. (2002). Régulation redox de l'expression des gènes et contrôle par les nutriments. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16: 240–247.
- Derbel, S. and Ghedira, K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 1: 28-34.
- Desmettre, T. and Lecerf, J. M. (2005). Nutrition et dégénérescences maculaires liées à l'âge. *EMC-Ophtalmologie*, 2: 202–217.
- Dessport, J.C. and Couratier, P. (2002). Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16: 253–259.
- Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P. and Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.
- Dutta, D.; Chaudhuri, U. R. and Chakraborty, R. (2005). Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Biotechnology*, 1(13): 1510-1520.
- Edeas, M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*, 5: 264-270.

- Erasto, P. ; Grierson, D. S. and Afolayan, A. J. (2007). Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of *Vernonia amygdalina* growing in South Africa. *Food Chemistry*, 104: 636-642.
- Falleh, H.; Ksouri, R.; Chaieb, K.; Karray-Bouraoui, N.; Trabelsi, N. ; Boulaaba, M. and Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 372–379.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108-115.
- Flourie, F.; Arab, K.; Rossary, A. and Steghens, J. P. (2006). Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation *in vitro* initiée par le radical OH. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, 21: 229–233.
- Fokou, E. ; Ponka, R. ; Tchegnimba, A. S. ; Ngu, B. and Tchouanguép, M. F. (2008). Alimentation et statut en deux micronutriments antioxydants (zinc et vitamine C) de quelques patients camerounais hypertendus. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 22 : 4-9.
- Fontaine, E.; Barnoud, D.; Schwebel, C. and Leverve, X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11 : 411-420.
- Gardeli, C.; Vassiliki, P.; Athanasios, M.; Kibouris, T. and Michael, K. (2008). Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry*, 107: 1120–1130.
- Gardès-Albert, M. (2006). Stress oxydant : Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Ann Pharm Fr*, 64: 365-372.
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
- Groussard, C. (2006). Stress oxydatif et exercice anaérobie. *Science et Sports*, 21: 62–67.
- Guignard, J. L. (1979). Abrégé de biochimie végétale .Masson 2^{ème} Edition : 161-209.
- Gülçin, İ.; Berashviliand, D. and Gepdiremen, A. (2005). Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis* decne. *Journal of Ethnopharmacology*, 101: 287-293.
- Hagerman, A. E.; and Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26: 809-812.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 107-112.
- Haslam, E. (2007). Vegetable tannins: Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, 68: 2713-272.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67– 202.

- Hayouni, E. ; Abedrabba, M.; Bouix, M. and Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105: 1126-1134.
- Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002). Flavonoids antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Heller, R. ; Esnault, R. and Lance, C. (1998). Photosynthèse : phase photochimique, production et détoxification des espèces réactives d'oxygène. In Physiologie végétale 1. Nutrition 6ième édition. Edition, *Dunod*, Paris : 209-212.
- Hennebelle, T. ; Sahpaz, S. and Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- Heo, H. J.; Kim, Y. J.; Chung, D. and Kim, D. O. (2007). Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in model system. *Food chemistry*, 92: 104:87.
- Hodek, P.; Trefil, P. and Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139: 1-21.
- Hu, C. C.; Lin, J. T.; Lu, F. J. ; Chou, F. P. and Yang, D.J. (2008). Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, 109: 439-446.
- Huet, O. and Duranteau, J. (2008). Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres. *Réanimation*, 17: 387-392.
- Jork, F. and Wimmer, F. (2004). Thin layer chromatography: Reagent and detection methods. Edition *VCH*, b1: 352-446.
- Jung, C. H.; Seog, H. M.; Choi, I. W.; Park, M. W. and Cho, H. Y. (2006). Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *LWT*, 39: 266–274.
- Jun, H.; Xiaoling, Y.; Wei, W.; Hao, W.; Lei, H. and Lijun, D. (2008). Antioxidant Activity *In Vitro* of Three Constituents from *Caesalpinia sappan* L. *Tsinghua. Science and Technology*, 13(4): 474-479.
- Kahkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha, J. P.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S. and Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- Karagözler, A. A.; Erdag, B.; Emek, Y. Ç. and Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111: 400-407.
- Karou, D.; Dicko, M. H.; Simpore, J. and Traore, A.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4 (8): 823-828.
- Kaur, R.; Arora, S. and Singh, B. (2008). Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis* A. Juss. *Bioresource Technology*, 99: 7692-7698.

- Keita, Y.; Koné, O.; Ly, A. K. and Häkkinen, V. (2004). Étude chimique et de l'activité antibactérienne des distillats de quelques variétés de mangue de Guinée. *Comptes Rendus. Chimie*, 7:1095-11.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 20: 165-177.
- Kordali, S.; Cakir, A.; Zengen, H. and Duru, M. E. (2003). Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74: 164-167.
- Kosar, M.; Bozan, B.; Temelli, F. and Baser, K. H. C. (2007). Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts. *Food Chemistry*, 103: 952-959.
- Knodler, M.; Conrad, J. R.; Wenzig, E. M.; Bauer, R.; Lacorn, M.; Beifuss, U.; Carle, R. and Schieber, A. (2008). Anti-inflammatory 5-(110 Z-heptadecenyl)- and 5-(80 Z, 110 Z-heptadecadienyl)-resorcinols from mango (*Mangifera indica* L.) peels. *Phytochemistry*, 69: 988-993.
- Krisa, S.; Teguo, W. P.; Decendit, A.; Deffieux, G.; Huguet, F.; Fauconneau, B. and Mérillon, J. M. (1997). Production, purification et activité biologique des piceïdes (stilbenes) extraits de cultures cellulaires de *Vitis vinifera*. *Société de Pharmacie*, 136: 7-18.
- Ksouri, R.; Megdiche, W.; Falleh, H.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Smaoui, A. and Abdelly, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 865-873.
- Ljubuncic, P.; Song, H.; Cogan, U.; Azaizeh, H. and Bomzon, A. (2005). The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 198-204.
- Lacopini, P.; Baldi, M.; Storchi, P. and Sebastian, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 589-598.
- Lahouel, M.; Boulkour, S.; Segueni, N. and Fillastre, J. P. (2004). Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*, 52 : 314-322.
- Laporte, F. (2000). Les récepteurs membranaires des LDL oxydées : leur rôle dans l'athérogenèse. *Néphrologie*, 21(7): 327-328.
- Lantto, T. A.; Damien Dorman, H. J.; Shikov, A. N.; Pozharitskaya, O. N.; Makarov, V. G.; Tikhonov, V. P.; Hiltunen, R. and Raasmaja, A. (2009). Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chemistry*, 112: 936-943.
- Lassoued, N.; Rekik, M.; Ben salem, H. and Darghouth, M. A. (2004). Effet des tannins de l'*Acacia cyanophylla* Lindl. sur la productivité et la reprise de l'activité sexuelle en post-partum de la chèvre de race locale en Tunisie. *Rencontre Recherches Ruminants*, 11 : 399.

- Léger, C. L. (2006). Anti-oxydants d'origine alimentaire: diversité, mode d'action anti-oxydante, interactions. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13: 2-3.
- Li, H. Y. Hao, Z. B.; Wang, X. L.; Huang, L. and Li, J. P. (2009). Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. *Bioresource Technology*, 100: 970-974.
- Liang, D.; Wang, J.; Wang, Y.; Wang, F. and Jiang, J. (2008). Behavior of tannins in germanium recovery by tannin process. *Hydrometallurgy*, 93: 140-142.
- Ling, L. T. ; Yap, S. A. ; Radhakrishnan, A. K. ; Subramaniamc, H. ; Cheng, H. M. and Palanisamy, U. D. (2009). Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. *Food Chemistry*, 113: 1154-1159.
- Liu, X.; Cui, C.; Zhao, M.; Wang, J.; Luo, W.; Yang, B. and Jiang, Y. (2008). Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 109: 909-915.
- Ljubuncic, P.; Azaizeh, H.; Portnaya, I.; Cogan, U.; Said, O.; Abu Saleh, K. and Bomzon, A. (2005). Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 99: 43-47.
- Lo, K. M. and Cheung, P. C. K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, 89: 533-539.
- Longo, L.; Scardino, A. and Vasapollo, G. (2007). Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrine* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 360-364.
- Lu, M. J. and Chen, C. (2008). Enzymatic modification by tannase increases the antioxidant activity of green tea. *Food Research International*, 41: 130-137.
- Maksimović, Z.; Malencić, N. D. and Kovacević, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96 (8): 873-877.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-47.
- Maneesh, M. and Jayalekshmi, H. (2006). Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21 (2): 80-89.
- Martinez-Cayuela, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77: 147-161.
- Martin, S. and Andriantristohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 51: 304-315.
- McKelvey, T. G.; Hollwarth, M. E.; Granger, D. N.; Engerson, T. D.; Landler, U. and Jones, H. P. (1988). Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney. *American Journal of Physiology*, 254: 753-760.

- Meterc, D.; Petermann, M. and Weidner, E. (2008). Drying of aqueous green tea extracts using a supercritical fluid spray process. *Journal of Supercritical Fluids*, 45: 253–259.
- Middleton, E.; Kandaswami, C. and Theoharides, T. C. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews*, 52: 673-751.
- Mohsen, S. M. and Ammar, A. S. M. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*, 112: 595-598.
- Morel, Y. and Barouki, R. (1998). Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Médecine/Sciences*, 14: 713-21.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of Hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 3-21.
- Naczki, M. and Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- Nawaz, H.; Shi, J.; Mittal, G. S. and Kakuda, Y. (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48: 176-181.
- Nay, B.; Arnaudinaud, V. and Vercauteren, J. (2002). Total synthesis of asymmetric flavonoids: the development and applications of ¹³C-labelling. *Comptes Rendus Chimie* 5: 577-590.
- Nijveldt, R. J.; Nood, E. V.; Hoorn, D.; Boelens, P. G.; Norren, K. V. and Leeuwen, P. A. M. (2001). flavonoides a review of probable mechanisms of action and potential application. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 418-425.
- Nouette-Gaulain, K. ; Quinart, A. ; Letellier, T. and Sztarka, F. (2007). La mitochondrie: rôles et implications en anesthésie-réanimation. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 26 : 319–333.
- Oktaya, M.; Gulcin, I. and Kufrevioglu, O. I. (2003). Determination of *in vitro* antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 36: 263-271.
- Oszmianski, J.; Wojdylo, A.; Lamer-Zarawska, E. and Swiader, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry*, 100: 579-583.
- Ozcelik, B.; Aslan, M.; Orhan, I. and Karaoglu, T. (2005). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophilic extracts of *Pistacia vera*, *Microbiological Research*, 160: 159-164.
- Ozsoy, N.; Can, A.; Yanardag, R. and Akev, N. (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 110: 571–583.
- Peluso, M. R. (2006). Flavonoids Attenuate Cardiovascular Disease, Inhibit Phosphodiesterase, and Modulate Lipid Homeostasis in Adipose Tissue and Liver. *Experimental Biology and Medicine*, 231: 1287-1299.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7): 1035-1042.

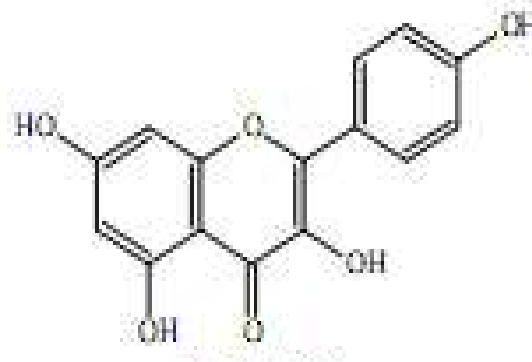
- Pincemail, J. ; Meurisse, M. ; Limet , R. and Defraigne, J. O (1998). Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *Medi-sphere*, 73.
- Pincemail, J. ; Meurisse, M. ; Limet, R. and Defraigne, J. O. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin, *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 4(5).
- Pincemail, J. ; Bonjean, K. ; Cayeux, K. and Defraigne, J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 16 : 233-239.
- Pincemail, J. ; Degruene, F. ; Voussure, S. ; Malherbe, C. ; Paquot, N. and Defraigne, J. O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 21: 66-75.
- Radyukina, N. L.; Shashukova, A. V.; Shevyakova, N. I. and Kuznetsov, V.V. (2008). Proline Involvement in the Common Sage Antioxidant System in the Presence of NaCl and Paraquat. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(5): 649-656.
- Rangkadilok, N.; Sitthimonchai, S.; Worasuttayangkurn, L.; Mahidol, C.; Ruchirawat, M. and Satayavivad, J. (2006). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 328-336.
- Rathee, J. S.; Hassarajani, S. A. and Chattopadhyay, S. (2006). Antioxidant activity of *Mammea longifolia* bud extracts. *Food Chemistry*, 99: 436-443.
- Razali, N.; Razab, R.; Junit, S. M. And Abdul Aziz, A. (2008). Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry*, 111: 38-44.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). Notions générales sur les composés phénoliques. In: Les composés phénoliques des végétaux. Édition *Dunod*, p : 1-27.
- Ricciarelli, R.; Zingg, J. M. and Azzì, A. (2001). Vitamin E: protective role of a Janus molecule. *The FASEB Journal*, 15: 2314-2325.
- Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 797-807.
- Roch, E. (2003). Stress Oxydant, Micronutriments et Santé. Université d'été de Nutrition 2003 – Clermont-Ferrand – 17-19 septembre 2003
- Rokia, S. ; Drissa, D.; Seydou, D.; Colette, E. and Flabou, B. (2006). Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Médical*, 1: 18-24.
- Romani, A. ; Pinelli, P. ; Galardi, C. ; Mulinacci, N. and Tattini, M. (2002). Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. *Phytochemical Analysis*, 13: 79-86.
- Salvayre, A. N. and Salvayre, R. (2005). Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif -Implication en physiopathologie vasculaire. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 12 (5) (6): 433-438.
- Scalbert, A. and Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130: 2073-2085.

- Schuldt, E. Z.; Farias, M. R.; Ribeiro-do-Valle R. M. and Ckless, K. (2004). Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. *Phytomedicine*, 11: 523-529.
- Sebei, K.; Boukhchina, S. and Kallel, H. (2007). Évolution des tocophérols en relation avec les acides gras insaturés au cours de la maturation des graines de colza de printemps (*Brassica napus* L.). *Comptes Rendus Biologies*, 330 : 55-61.
- Senevirathne, M. ; Kim, S. H. ; Siriwardhana, N. ; Ha, J. H. ; Lee, K. W. and Jeon, Y. J. (2006). Antioxidant Potential of *Ecklonia cava* on Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition. *Food Science and Technology International*, 12(1): 27-38.
- Singh, R.; Singh, S.; Kumar, S. and Arora, S. (2007). Studies on antioxidant potential of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Food Chemistry*.
- Samarth, R. M. and Krishna, V. (2007). Evaluation of radical scavenging activity of certain plant extracts using cell free assays. *Pharmacology online*, 1: 125-137.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327: 649-662.
- Sroka, Z. and Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 753-758.
- Su, M. S.; Shyu, Y. T. and Chien, P. J. (2008). Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chemistry*, 111: 892–896.
- Tachakittirungrod, S.; Okonogi, S. and Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103: 381-388.
- Topçu, G.; Ay, M.; Bilici, A.; Sarikurkcü, C.; Oztürk, M. and Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103: 816-822.
- Tourniaire, F. (2008). Les effets bénéfiques des polyphénols sont-ils dus à leurs propriétés antioxydantes ? Centre de Recherche en Nutrition Humaine de l'Université de Newcastle-upon-Tyne, Royaume-Uni. *Le mensuel de l'université* N° 2 juin 2008.
- Tratner, I. (2003). Chacun souhaite vivre longtemps, mais personne ne veut être vieux *Medecine/Science*, 12(19): 1291-1292.
- Triantafyllou, A.; Chaviaras, N.; Sergentanis, T. N.; Protopapa, E. and Tsaknis, J. (2007). Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 43–49.
- Turkmen, N.; Sari, F. and Velioglu, Y. S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99: 835-841.
- Ushio-Fukai, M. and Alexander, R. W. (2004). Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signalling Role of NAD(P)H oxidase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 264: 85–97.

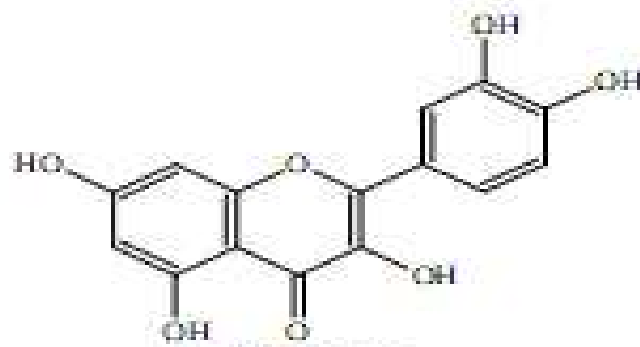
- Vamecq, J. ; Vallée, L. ; Storme, L. G. and Bordet, R. (2004). Les acteurs immédiats du stress oxydatif. *La Lettre du Pharmacologue*, 18 (1): 16-23.
- Veličkovič, D. T. ; Nikolova, M. T. ; Ivancheva, S. V. ; Stojanovi, J. B. and Veljkovi, V. B. (2007). Extraction of flavonoids from garden (L.) and glutinous (L.) sage by ultrasonic and classical maceration. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72: (1) 73-80.
- Vergely, C. and Rochette, L. (2002). Le point sur les NO synthases au niveau cardiovasculaire périphérique. *Annales de Cardiologie et d'Angéologie*, 5 : 109-116.
- Verhoeven, M. E.; Bovy, A.; Collins, G.; Muir, S.; Robinson, S. ; Vos, C. H. R. and Colliver, S. (2002). Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 53(377): 2099-2106.
- Vermerris, W. and Nicholson, R. (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer, The Netherlands. P: 1-190.
- Wakabayashi, I. and Yasui, K. (2000). Wogonin inhibits inducible prostaglandin E production in macrophages 2. *European Journal of Pharmacology*, 406: 477-481.
- Wang, J.; Yuan, X.; Jin, Z.; Tian, Y. and Song, H. (2007). Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chemistry*, 104: 242–250.
- Wang, H.; Gao, X. D.; Zhou, G. C. ; Cai, L. and Yao, W.B. (2008). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extracts from *Cherospondias axillaries* fruit. *Food Chemistry*, 106: 888-895.
- Wei, T.; Sunb, H.; Zhaoa, X.; Houa, J.; Houb, A.; Zhaob, Q. and Xin, W. (2002). Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallotannin, Pistafolia A. *Life Sciences*, 70: 1889–1899.
- Zhang, Z.; Liao, L.; Moore, J.; Wu, T. and Wang, T. (2009). antioxidant phenolic compounds from Walnut Kernels (*Juglans regia* L.), *Food chemistry*, 113: 160-165.
- Zhao, X.; Sun, H.; Hou, A.; Zhao Q.; Wei, T. and Xin, W. (2005). Antioxidant properties of two gallotannins isolated from the leaves of *Pistacia weinmannifolia*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725: 103-110.
- Ziggoneau, I. G.; Williams, L.; Xu, Z. and Sabliov, C. (2007). Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. *Bioresource Technology*, 99 : 4910-4918.

Annexes

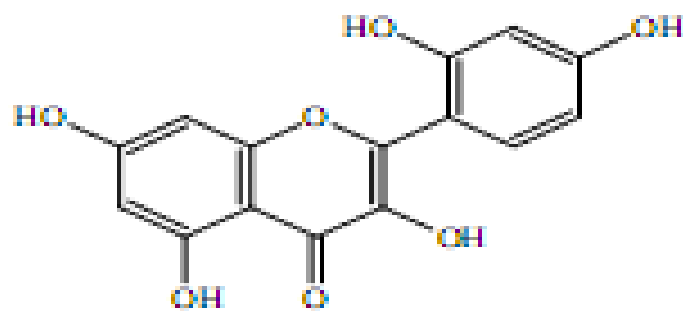
Annexe 1 : Structure chimique de quelques flavonoïdes.



Le kaempférol

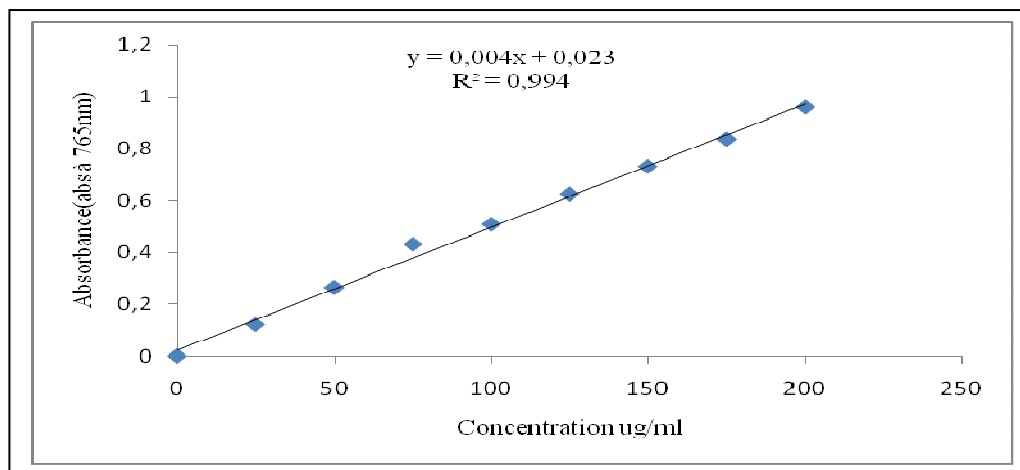


La quercétine

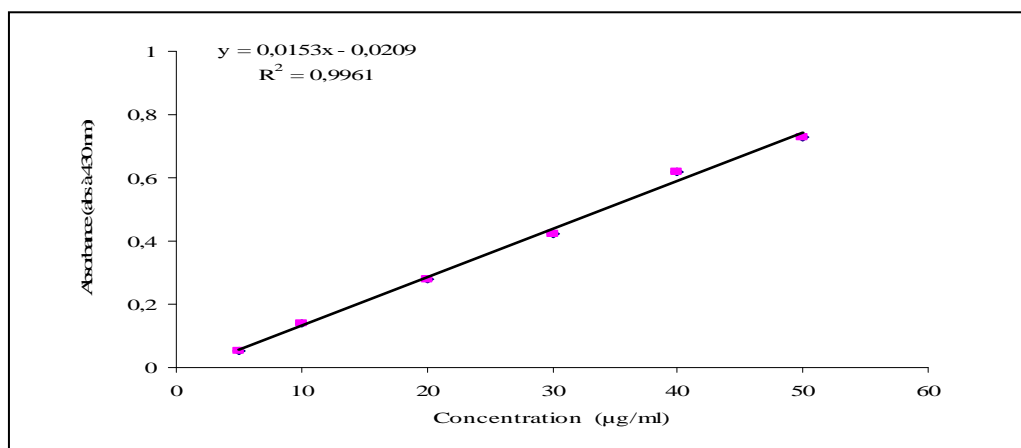


La morine

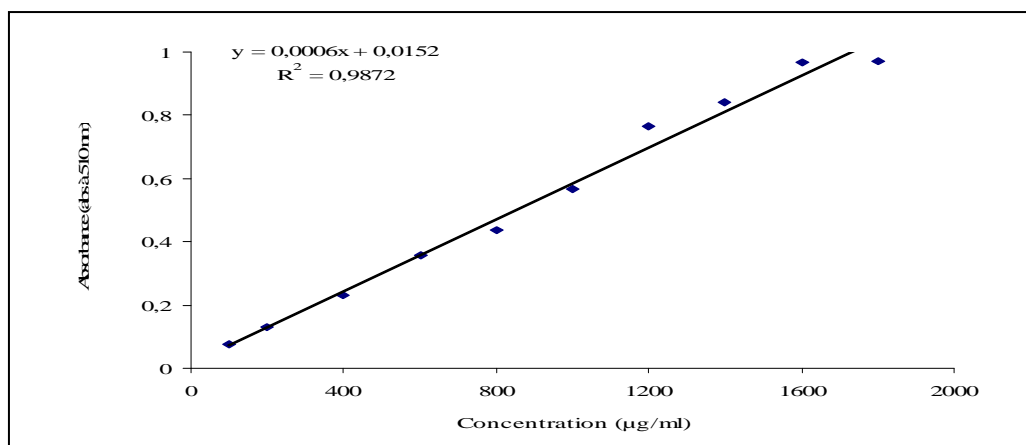
Annexe 2 : Courbes d'étalonnages utilisés pour la détermination des taux de phénols totaux, flavonoïdes et tannins dans les extraits de *Pistacia lentiscus*.



1. Courbe d'étalonnage réalisée avec la catéchine pour le dosage des phénols totaux.



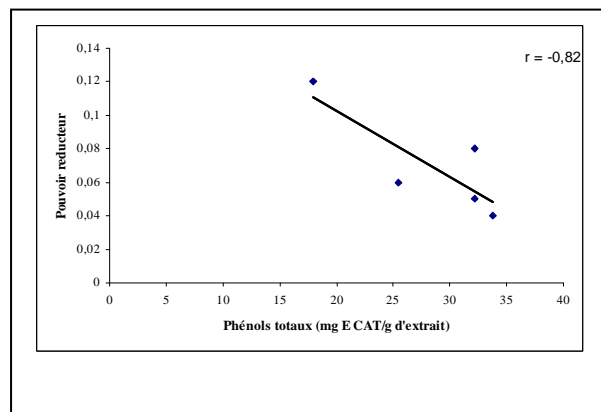
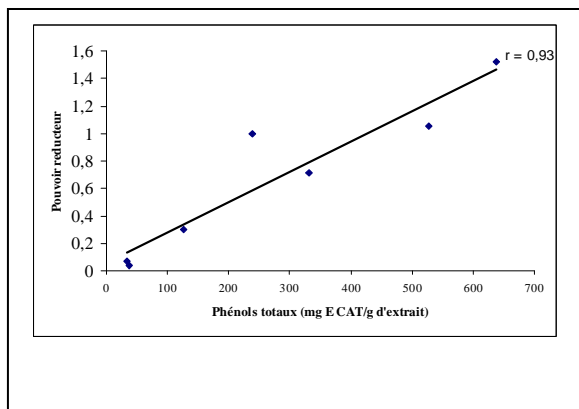
2. Courbe d'étalonnage réalisée avec la rutine pour le dosage des flavonoïdes



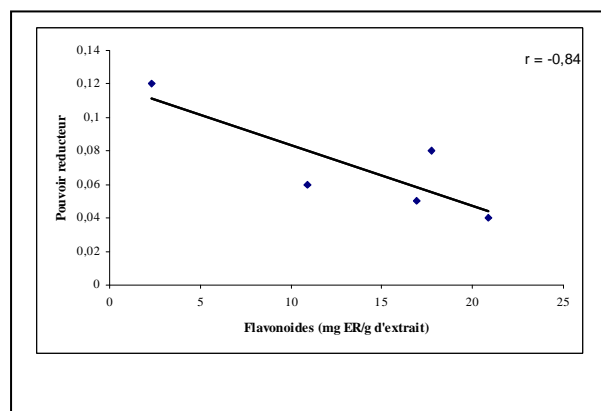
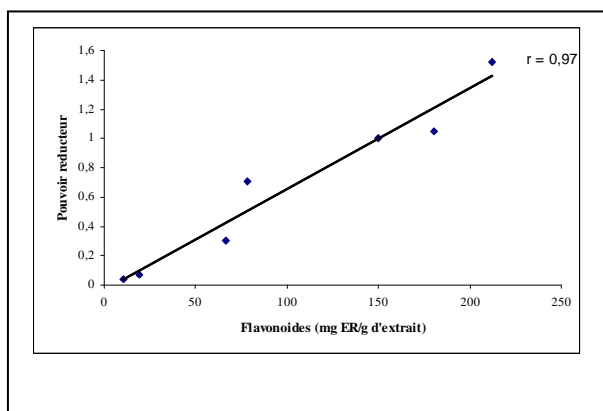
3. Courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique pour le dosage des tannins

Annexe 3 : Courbes de corrélation.

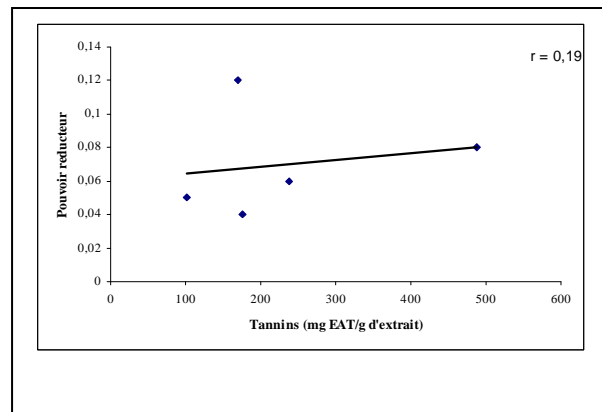
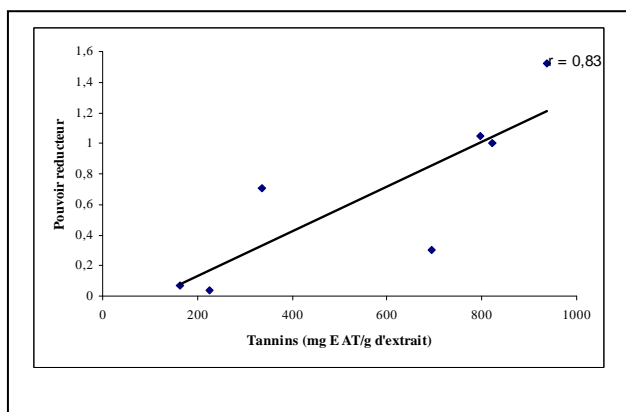
Corrélation entre la teneur en polyphénols et le pouvoir réducteur :



- Courbes de corrélation entre le taux en phénols totaux et le pouvoir réducteur extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

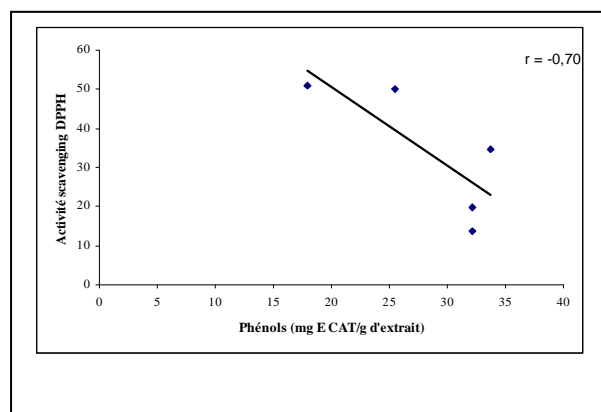
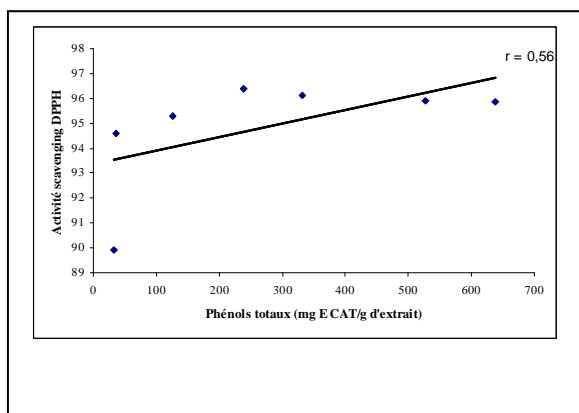


- Courbes de corrélation entre le taux en flavonoïdes et le pouvoir réducteur des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

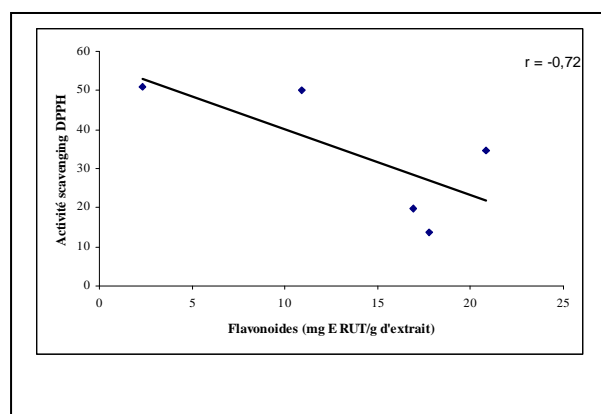
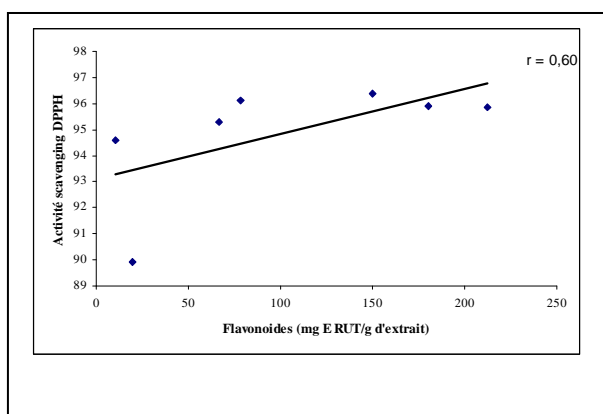


- Courbes de corrélation entre le taux en tannins et le pouvoir réducteur des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

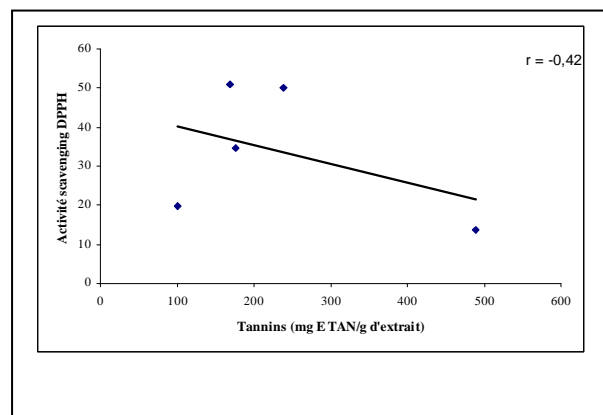
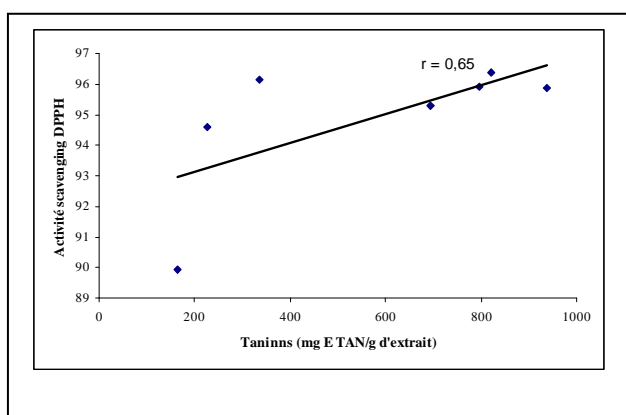
Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-DPPH :



- Courbes de corrélation entre le taux en phénols totaux et l'activité anti-DPPH des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

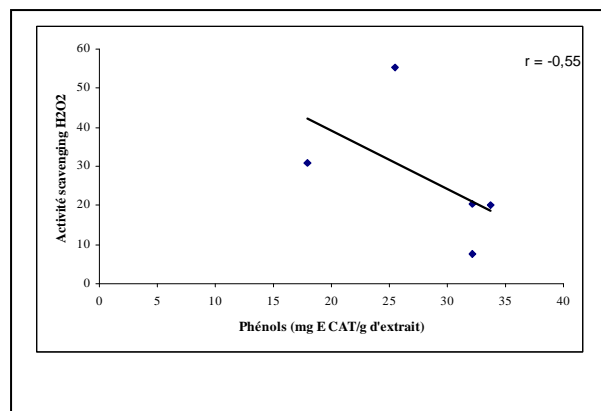
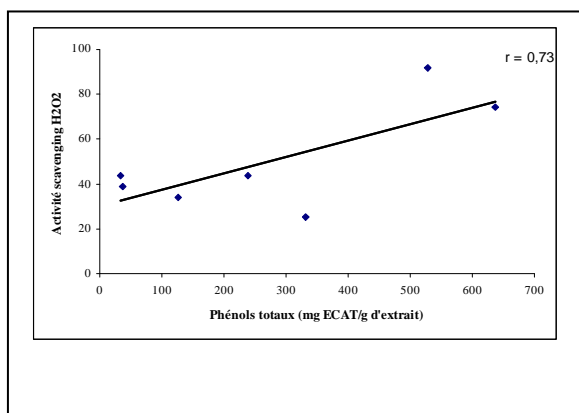


- Courbes de corrélation entre le taux flavonoïdes et l'activité anti-DPPH des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

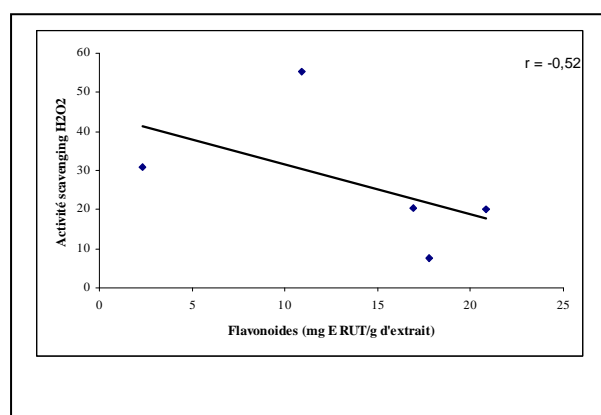
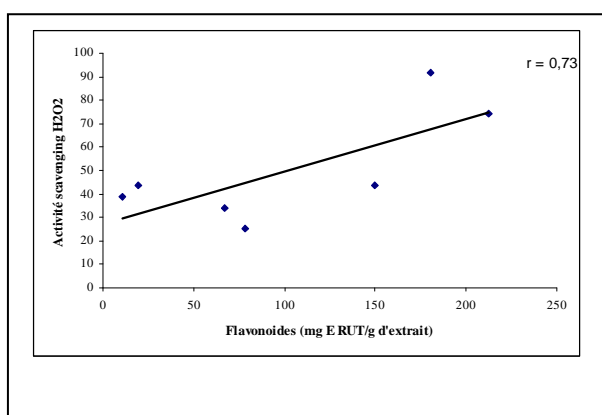


- Courbes de corrélation entre le taux en tannins et l'activité anti-DPPH des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

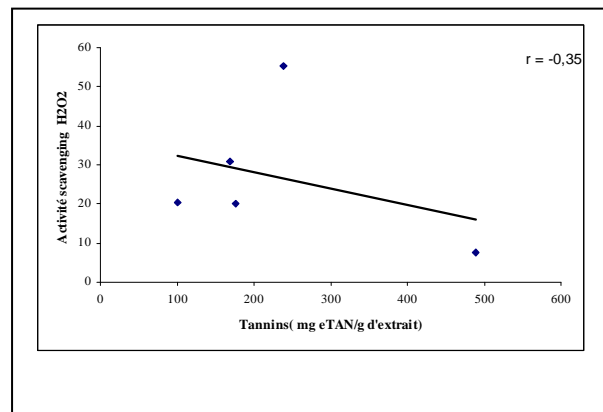
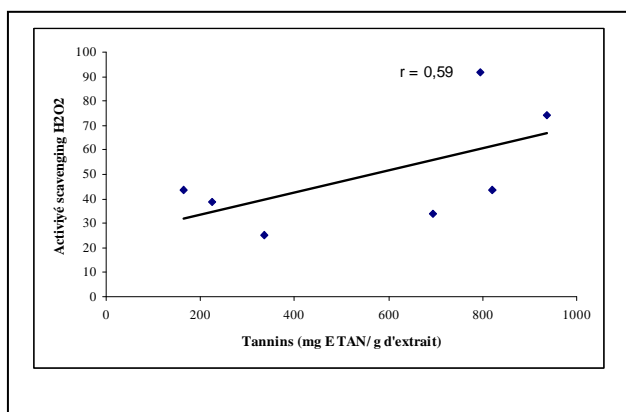
Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-H₂O₂.



- Courbes de corrélation entre le taux en phénols totaux et l'activité anti-H₂O₂ des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

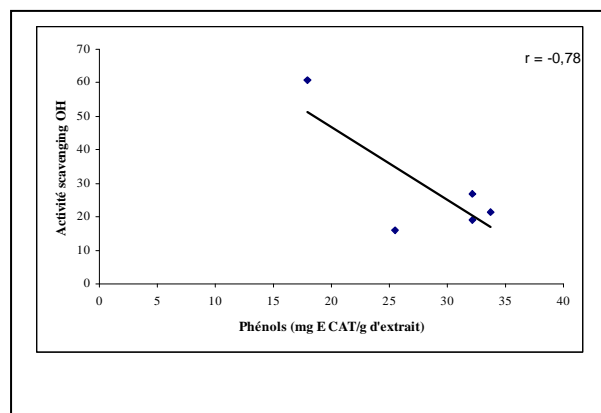
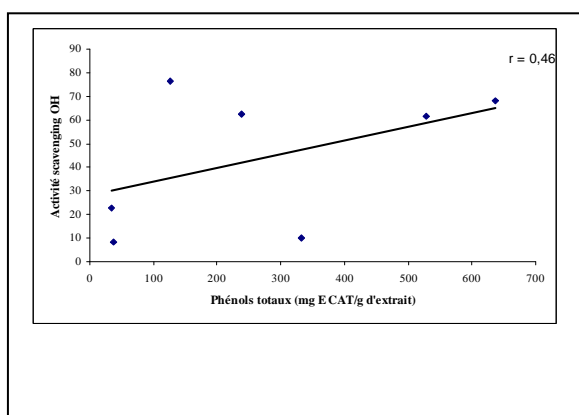


- Courbes de corrélation entre le taux en flavonoïdes et l'activité anti-H₂O₂ des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

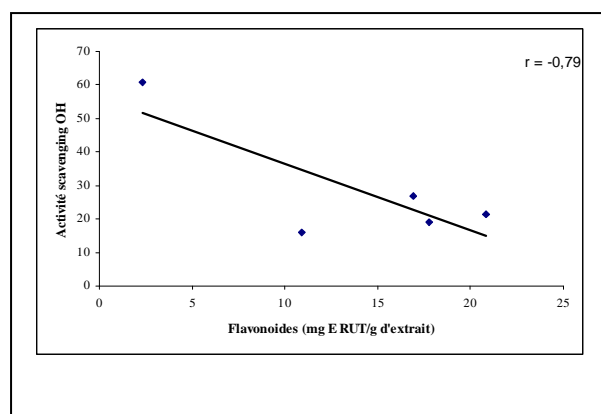
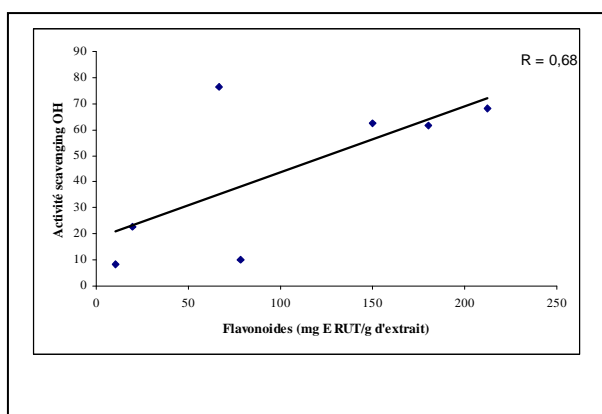


- Courbes de corrélation entre le taux en tannins et l'activité anti-H₂O₂ des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

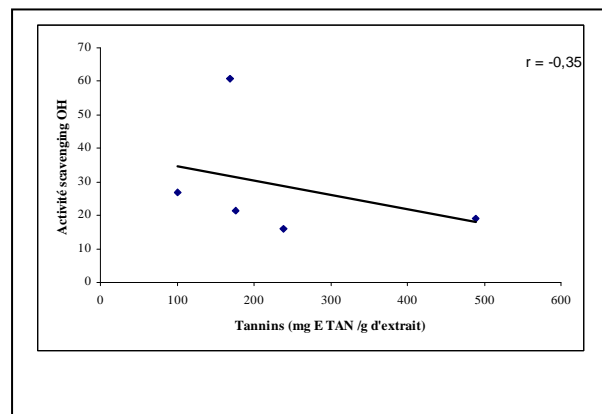
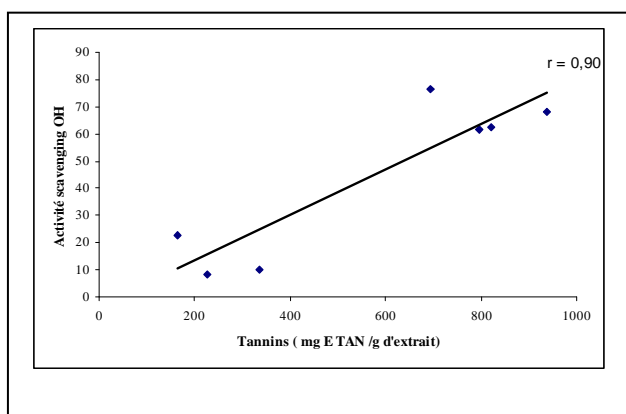
Corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité anti-OH :



- Courbes de corrélation entre le taux en phénols totaux et l'activité anti-OH des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.



- Courbes de corrélation entre le taux en flavonoïdes et l'activité anti-OH des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.



- Courbes de corrélation entre le taux en tannins et l'activité anti-OH des extraits de feuilles (A) et des graines (B) de *Pistacia lentiscus*.

Résumé

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits et des fractions chromatographiques de *Pistacia lentiscus*, une plante locale utilisée dans le traitement de différentes maladies (ulcères d'estomac, brûlures, ...etc) a été entreprise. Les résultats indiquent que les extraits de feuilles ont un pouvoir réducteur élevé et une capacité scavenging importante contre le radical DPPH \cdot , le H₂O₂ et le radical OH \cdot . Le meilleur effet contre le DPPH \cdot a été obtenu par l'extrait aqueux du chloroforme avec une IC₅₀ de 3,84 μ g/ml, alors que l'extrait aqueux d'hexane montre une IC₅₀ de 51,82 μ g/ml contre le H₂O₂ et l'extrait aqueux d'acétate d'éthyle exprime une IC₅₀ de 20,64 μ g/ml contre le OH \cdot .

Le fractionnement des extraits actifs de feuilles de *Pistacia. lentiscus* par chromatographie sur colonne de gel de silice a révélé la présence de quatre fractions dont deux (F2 et F3) ayant montré un pouvoir anti-radicalaire important contre le DPPH \cdot , le OH \cdot et le H₂O₂. L'analyse des couleurs et des Rf des tâches obtenues par CCM indique que la F3 de l'extrait éthanolique et la F2 de l'extrait d'acétate d'éthyle présentent les mêmes caractéristiques que la quercétine, tandis que la F2 des extraits aqueux d'hexane et aqueux du chloroforme montre des tâches de couleur rouge similaire à celles de la catéchine.

Mots clés : *Pistacia lentiscus*, composés phénoliques, pouvoir réducteur, activité anti- radicalaire, fractions.

Abstract

The evaluation of antiradical activity of extracts and their chromatographic fractions of *Pistacia lentiscus*, a local plant used in the treatment of various diseases (stomach ulcers, burns, etc ...) has been carried out. The results indicate that leaf extracts possess a high reducing capacity and an important scavenging activity against the DPPH \cdot radical, H₂O₂ and OH \cdot radical. The highest activity against the DPPH \cdot was obtained by the aqueous extract of chloroform with an IC₅₀ of 3.84 μ g/ml, while the aqueous extract of hexane showed an IC₅₀ of 51.82 μ g/ml against H₂O₂ and the aqueous extract of ethyl acetate expressed an IC₅₀ of 20.64 μ g/ml against the OH \cdot .

The fractionation of active extracts of leaves of *Pistacia. lentiscus* by column chromatography on silica gel revealed the presence of four fractions among which two (F2 and F3) showing an important antiradical activity against DPPH \cdot , OH \cdot and H₂O₂. Analysis of colour and Rf of spots obtained by thin layer chromatography (TLC) indicates that F3 of the ethanol extract and F2 of ethyl acetate extract present the same characteristics as quercetin while F2 of aqueous extracts of hexane and aqueous chloroform shows a red colour, similar to that of catechin.

Keywords: *Pistacia lentiscus*, phenolic compounds, reducing power, anti-radical activity, fractions.

ملخص

في هذه الدراسة تم تقييم النشاطات المضادة للجذور الحرة للمستخلصات والأجزاء الكروماتوغرافيا لنبتة طبية تستعمل في علاج الأمراض المختلفة (قرحة المعدة، الحروق... الخ) و هي الضرر. نتائج هذه الدراسة اظهرت أن مستخلصات الأوراق تملك قدرة ارجاعية عالية و نشاطا فعالا ضد الجذور الحرة DPPH \cdot ، OH و H₂O₂. بحيث المستخلص المائي للكلوروفورم عبر عن IC₅₀ ب 3.84 ميكغ/مل والمستخلص المائي للاكزان أظهر أيضا نشاطا عالي ضد H₂O₂ بحيث قدرت ال IC₅₀ ب 51.82 ميكغ/مل في حين أن مستخلص الاسيتات اثيل المائي برهن أنه يملك نشاطا معتبرا ضد ال OH \cdot قدرت ال IC₅₀ ب 20.64 ميكغ/مل.

فصل المستخلصات الفعالة للأوراق بالكروماتوغرافيا على هلام السيليس سمح لنا بالحصول على أربعة أجزاء متميزة بحيث الجزئين (ج₂ و ج₃) برهننا نشاطا فعالا ضد هذه الجذور .

استعمال الكروماتوغرافيا على قطع ملساء و تحليل الألوان و Rf بين أن ال (ج₃) لمستخلص الايثانول و ال (ج₂) لمستخلص الاسيتات اثيل اظهرا خصائص مشتركة مع الكرسيتين في حين ال ج₂ للمستخلص المائي للاكزان و للمستخلص المائي للكلوروفورم اظهرا خصائص مماثلة للكتيشين .

كلمات مفتاح: الضرر، المركبات الفينولية، القدرة الارجاعية، النشاطات المضادة للجذور الحرة، أجزاء الكروماتوغرافيا.

