

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Béjaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires

MEMOIRE

Pour l'Obtention du Diplôme de Magister
En Sciences Alimentaires
Option : Sciences Alimentaires
Laboratoire 3BS

Thème

**Etude du pouvoir antioxydant des extraits
polyphénoliques des plantes médicinales de la région
de la basse Kabylie**

Présenté par : M^{lle} AMESSIS Nadia

Devant le jury :

Président : Mr MOALI A. (Professeur, Université de Béjaïa)
Promoteur : Mr CHIBANE M. (Professeur, Université de Béjaïa)
Co-promoteur : Mr MADANI K. (M.A.C.C., Université de Béjaïa)

Examineurs :

Mr YOUYOU A. (Professeur, Université de Tizi-Ouzou)
Mr IGHEROUADA M. (Maître de conférences, Université de Béjaïa)

Invitée M^{me} BENABDESSELAM F. (M.A.C.C., Université de Béjaïa)

2006 - 2007

Remerciements

Au terme de ce modeste travail, je tiens à remercier :

- *Avant tout, Dieu qui m'a aidé à réaliser ce modeste travail.*
- *Mon promoteur Mr. M. Chibane et mon co-promoteur Mr. K. Madani d'avoir accepté de m'encadrer et d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour mener à terme ce mémoire. Je les remercie aussi pour leurs conseils, leurs respects et leurs excellentes relations humaines.*
- *Mr. M. Mouali de m'avoir consacré son temps à lire ce travail et pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury.*
- *Les membres de jury pour l'honneur qu'ils me font, d'examiner ce travail, citons ainsi : M^{me} F. BENABDESSELAM, Mrs A. YOUYOU et M. IGHEROUADA.*
- *Mr. S. Ouchemoukhi de m'avoir guidé durant la réalisation de ce mémoire, pour ses conseils fréquents et avisés. Son esprit de synthèse et son érudition restent pour moi un exemple à suivre. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.*
- *M^{lle}. H. Louailèche, Mr. F. Zaidi, M^{me} Idress, M^{me} Oukil, Mr. N. Ramdani et Mr. D. Belhadi de m'avoir permis de travailler dans les laboratoires sur lesquels ils sont responsables.*
- *M^{lle} M. Ourari, Mr. Sahnoun, Mr. S. Bouadam et Mr S. Ait Ouarab de m'avoir aidé à identifier les espèces de plantes. Sans oublier les technicien(ne)s des laboratoires : Mr. Y. Derrahi, M^{lle} N. Akil, Mr. D. Mankou, M^{me} Kherbachi et les secrétaires du département des Sciences Alimentaires et du département de Biologie et physico-chimique.*
- *Tous les étudiants de la Post Graduation « Sciences Alimentaires ».*
- *Tous les enseignants, étudiants, agents de sécurité des blocs 3 et 12 et tous ceux qui m'ont soutenu et aidé à réaliser ce travail.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- *A la mémoire de mon très cher père, que Dieu le tout puissant l'accueille en son vaste paradis.*
- *A ma très chère mère qui m'a aidé et prié Dieu pour moi chaque jour, pour me guider dans la bonne voie.*
- *A mes très chers frères : Nonor, Djamel et Rametane.*
- *A mon très cher fiancé Salim*
- *A toute ma famille et ma belle famille.*
- *A tous mes ami(e)s.*

Liste des abréviations

ABTS	Acide 2,2'-azobis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acide Gras Polyinsaturé
AH	Antioxydant
ATP	Adénosine Triphosphate
BHA	Butylhydroxyanisole
BHT	Butylhydroxytoluène
BSA	Bovine Serum Albumin
DO	Densité Optique
DPPH	Radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
GC-MS	Gaz Chromatography Mass Spectrophotométry
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GSH	Glutathion
HAS	Human Serum Albumin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
L	Linné
LDL	Low Density Lipoprotein
LSD	Least Significant Differences
NADPH	Nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate
PLA₂	Phospholipase A ₂
ROS	Reactive Oxygen Species
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDS	Dodecyl Sulfate de Sodium
SOD	Superoxide Dismutase
TEA	Triéthanolamine
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

Liste des figures

Figure 1 : Photographie de <i>Globularia alypum</i> L.....	3
Figure 2 : Photographie de <i>Myrtus communis</i> L.....	5
Figure 3 : Photographie de <i>Pistacia lentiscus</i> L.	7
Figure 4 : Photographie de <i>Retama sphaerocarpa</i> L. Boiss..	9
Figure 5 : Photographie de <i>Rhamnus alaternus</i> L.	11
Figure 6 : Structure chimique globale des tocophérols.....	26
Figure 7 : Structure de l'acide ascorbique	27
Figure 8 : Différentes structures des caroténoïdes.....	28
Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes	32
Figure 10 : Structures chimiques des tanins	33
Figure 11 : Mode d'inhibition de la formation des complexes tanins-protéines par les glycosides.....	56
Figure 12 : Pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par les extraits de plantes	58
Figure 13 : Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par les extraits de plantes au troisième jour d'incubation	60
Figure 14 : Corrélation entre le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique et les teneurs en composés phénoliques totaux.....	61
Figure 15 : Mécanisme de réduction du radical DPPH par un antioxydant	63
Figure 16 : Corrélation entre le pouvoir antiradicalaire et les teneurs en composés phénoliques totaux	65
Figure 17 : Relation entre l'activité antioxydante et la structure des flavonoïdes.....	65
Figure 18 : Structure de la quercétine	66
Figure 19 : Mode d'action antiradicalaire d'un flavonol	66
Figure 20 : Pouvoir antiradicalaire des extraits de plantes exprimé en quantité d'antioxydants.....	67
Figure 21 : Pouvoir antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits de plantes..	68
Figure 22 : Pouvoir réducteur en fonction de la concentration des extraits de plantes	70
Figure 23 : Corrélation entre le pouvoir réducteur et les teneurs en composés phénoliques totaux	72

Figure 24 : Pouvoir réducteur des extraits de plantes exprimé en mg d'antioxydants	73
Figure 25 : Corrélation entre le pouvoir réducteur et le pouvoir antiradicalaire.....	75
Figure 26 : Variation de la densité optique en fonction des concentrations des extraits de plantes	76
Figure 27 : Variation de la densité optique en fonction de la force ionique.....	80

Liste des tableaux

Tableau I : Classification botanique de <i>Globularia alypum</i> L	4
Tableau II : Classification botanique de <i>Myrtus communis</i> L.....	6
Tableau III : Classification botanique de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	8
Tableau IV : Classification botanique de <i>Retama sphaerocarpa</i> L. Boiss.....	10
Tableau V : Classification botanique de <i>Rhamnus alaternus</i> L	12
Tableau VI : Différentes classes des composés phénoliques	30
Tableau VII : Dates et lieu de récolte des plantes médicinales	35
Tableau VIII : Résultats du test d'humidité des feuilles de plantes.....	47
Tableau IX : Rendements d'extraction et concentrations des solutions mères	49
Tableau X : Résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits de plantes	50
Tableau XI : Résultats du dosage des polyphénols polaires et apolaires.....	51
Tableau XII : Résultats du dosage des flavonoïdes totaux des extraits de plantes	52
Tableau XIII : Résultats du dosage des tanins des extraits de plantes.....	54
Tableau XIV : Pouvoir antiradicalaire des extraits de plantes utilisés	63

Liste des annexes

Annexe 1 : Matériels et réactifs utilisés	103
Annexe 2 : Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des poly phénols	104
Annexe 3 : Courbes d'étalonnages utilisées pour la détermination des équivalents d'antioxydants	105
Annexe 4 : Résultats du dosage des composés phénoliques	106

Sommaire

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales étudiées.....	3
1. <i>Globularia alypum</i> L.....	3
1.1. Description botanique et répartition géographique.....	3
1.2. Classification.....	4
1.3. Vertus thérapeutiques.....	4
2. <i>Myrtus communis</i> L.....	5
2.1. Description botanique et répartition géographique.....	5
2.2. Classification.....	6
2.3. Vertus thérapeutiques.....	6
3. <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	7
3.1. Description botanique et répartition géographique.....	7
3.2. Classification.....	8
3.3. Vertus Thérapeutiques.....	8
4. <i>Retama sphaerocarpa</i> (L.) Boissier.....	9
4.1. Description botanique et répartition géographique.....	9
4.2. Classification.....	10
4.3. Vertus Thérapeutiques.....	10
5. <i>Rhamnus alaternus</i> L.....	11
5.1. Description botanique et répartition géographique.....	11
5.2. Classification.....	12
5.3. Vertus Thérapeutiques.....	12
Chapitre II : Radicaux libres.....	13
1. Radicaux libres.....	13
1.1. Définition.....	13
2. Espèces réactives de l'oxygène.....	13
3. Production des radicaux libres.....	13
3.1. Origine endogène.....	14
3.1.1. Mitochondries.....	14
3.1.2. Cellules phagocytaires.....	14
3.1.3. Réactions de détoxication.....	14
3.1.4. Xanthine oxydase.....	15
3.1.5. Ions métalliques.....	15
3.1.6. Autres sources.....	15
3.2. Origine exogène.....	16
4. Stress oxydant.....	16
5. Avantages et inconvénients des radicaux libres.....	17
5.1. Effets indésirables.....	17
5.1.1. Effets sur les lipides.....	18
5.1.2. Effets sur les protéines.....	18

5.1.3. Effets sur l'acide désoxyribonucléique	19
5.1.4. Effets sur les glucides	20
5.1.5. Maladies engendrées par le stress oxydant	20
5.2. Avantages des radicaux libres.....	21
Chapitre III : Systèmes antioxydants.....	22
1. Définition d'un antioxydant	22
2. Mécanismes de défense.....	22
2.1. Systèmes enzymatiques antioxydants	22
2.1.1. Superoxydes dismutases	23
2.1.2. Catalase	23
2.1.3. Glutathion peroxydase	24
2.1.4. Glutathion réductase.....	24
2.2. Molécules piègeuses de métaux	25
2.3. Antioxydants d'origine alimentaire	25
2.3.1. Tocophérol (Vitamine E)	25
2.3.2. Vitamine C (Acide ascorbique).....	27
2.3.3. Caroténoïdes.....	27
2.3.4. Composés phénoliques.....	29
2.3.4.1. Flavonoïdes	31
2.3.4.2. Tanins	33
2.3.5. Antioxydants de synthèse.....	34

Partie expérimentale

Matériel et méthodes.....	35
1. Echantillonnage.....	35
2. Traitement des échantillons	35
2.1. Séchage et test d'humidité	36
2.2. Broyage et tamisage	36
2.3 Extraction	36
3. Dosages des polyphénols.....	37
3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	37
3.2. Dosage des polyphénols polaires	38
3.3. Polyphénols apolaires	39
3.4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	39
3.5. Dosage des tanins.....	40
4. Détermination de l'activité antioxydante.....	40
4.1. Pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique	41
4.2. Pouvoir antiradicalaire	42
4.3. Pouvoir réducteur	43

5. Activités biologiques	44
5.1. Etude des interactions polyphénols / protéines	44
5.1.1. Effet de la concentration des extraits	44
5.1.2. Effet de la force ionique	45
6. Etude statistique	46
Résultats et discussion	47
1. Traitement des échantillons	47
1.1. Humidité et séchage des feuilles	47
1.2. Extraction	48
2. Dosages des polyphénols.....	50
2.1. Composés phénoliques totaux.....	50
2.2. Polyphénols polaires et apolaires.....	51
2.3. Flavonoïdes totaux	52
2.4. Tanins.....	53
3. Détermination de l'activité antioxydante	57
3.1. Pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique	57
3.2. Pouvoir antiradicalaire	62
3.2.1. Pouvoir antiradicalaire exprimé en pourcentage.....	63
3.2.2. Pouvoir antiradicalaire exprimé en équivalents d'antioxydants	67
3.2.3. Effet de la concentration de l'extrait sur le pouvoir antiradicalaire.....	68
3.3. Pouvoir réducteur	70
3.4. Relation entre le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir réducteur	74
4. Activités biologiques	75
4.1. Interactions polyphénols – protéines.....	75
4.1.1. Effet de la concentration des extraits	75
4.1.2. Effet de la force ionique sur les interactions polyphénols/protéines	79
Conclusion	82
Références bibliographiques.....	85
Références électroniques	102
Annexes	103

Introduction

Introduction

L'origine de nos médicaments actuels se confond avec l'origine de la phytothérapie. L'utilisation des plantes est basée, encore actuellement, sur la connaissance empirique, ancestrale et sur l'usage traditionnel transmis oralement au cours des siècles et des millénaires. Une plante médicinale est définie comme toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (Schauenberg et Paris, 2005). En Algérie, il existe plus de trois mille cinq cents espèces de plantes médicinales (Hlimi, 2004).

Les phytothérapeutes soutiennent depuis longtemps que la plante et ses principes actifs sont riches de perspectives pour la qualité de la vie (Sallé, 1991). Aujourd'hui, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. Ces derniers sont à l'origine de plusieurs pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Favier, 2003).

A la lumière du rôle potentiellement délétère que peut induire une production excessive des espèces réactives de l'oxygène, le stress oxydant a suscité, en une grande partie, l'intérêt des recherches actuelles qui portent sur l'étude des molécules antioxydantes à base de plantes telles que les polyphénols, les vitamines et les caroténoïdes. Ainsi, l'objectif de ce travail consiste notamment en l'étude du pouvoir antioxydant de cinq plantes médicinales à savoir : *Globularia alypum*, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*, *Rhamnus alaternus* et *Retama sphaerocarpa*.

Le travail réalisé au cours de cette étude est réparti en deux parties. La première est consacrée à une synthèse bibliographique comportant la description botanique et les vertus thérapeutiques des plantes médicinales qui ont fait l'objet et le matériel de cette

étude, mais aussi, un aperçu général sur les oxydants et les systèmes de défenses antioxydants.

La deuxième partie concerne l'approche expérimentale ayant premièrement comme objectif l'extraction des composés phénoliques à partir des plantes et leur évaluation quantitative à travers les différents dosages. Deuxièmement, la détermination de l'activité antioxydante des extraits de plantes en testant l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique, le pouvoir antiradicalaire utilisant comme radical le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) et le pouvoir réducteur. Enfin, la détermination de l'activité biologique des polyphénols par l'étude du pouvoir interactionnel des composés phénoliques avec la protéine BSA (Bovine Serum Albumin) sous l'effet de la concentration de l'extrait et de la force ionique.

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les plantes
médicinales étudiées

Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales étudiées

1. *Globularia alypum* L.

1.1. Description botanique et répartition géographique

Globularia alypum L. (Linné, 1707-1778) est un sous arbrisseau vivace très rameux, appartenant à la famille des globulariaceae (Jouad *et al.*, 2002). Le nom français « globulaire » de cet arbuste d'environ 60 cm de haut est donné suite à la forme globuleuse que prennent ses petites fleurs bleues poussant en inflorescence le long et au sommet des tiges (Elbetieha *et al.*, 2000 ; Djerroumi et Nacef, 2004). Les feuilles sont lancéolées, coriaces, glauques, sessiles et se terminent en pointe (figure 1). La floraison se fait au mois de février. Les fleurs odorantes, ayant des corolles bleues claires, sont groupées en capitules globuleux solitaires (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1980).

La globulaire pousse dans les lieux arides, sur les terrains calcaires secs et ensoleillés, sur les coteaux buissonneux et les terrains rocailloux. Elle est très répandue dans la région méditerranéenne, l'Europe centrale et méridionale et le Nord Est Africain. En Algérie, elle est commune dans tout le Tell et même au-delà du Sahara (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1986 ; Elbetieha *et al.*, 2000 ; Hlimi, 2004 ; Schauenberg et Paris, 2005).



Nom vernaculaire français : Globulaire
Nom vernaculaire anglais : Alypoglobe daisy
Nom vernaculaire kabyle : Taselgha
Nom vernaculaire arabe : Taselgha

Figure 1 : Photographie de *Globularia alypum* L. (Anonyme 1, 2006).

1.2. Classification

La classification décrite dans le tableau I est établie par Guignard (2001).

Tableau I : Classification botanique de *Globularia alypum* L. (Guignard, 2001).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Euasteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Globulariaceae
Genre	<i>Globularia</i>
Espèce	<i>Globularia alypum</i> L.

1.3. Vertus thérapeutiques

La globulaire est couramment utilisée dans la médecine traditionnelle du Nord Africain (Algérie, Maroc, Tunisie et Libye). Elle est dotée d'un pouvoir purgatif et désobstruant. De ce fait, elle est utilisée pour le traitement des affections gastriques telles que les lourdeurs, les ballonnements et la constipation. La globulaire est aussi utilisée dans le traitement de l'oligurie, la goutte et les rhumatismes (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1986 ; Leclerc, 1999 ; Çalis *et al.*, 2002 ; Jouad *et al.*, 2002). Certains auteurs lui attribuent aussi les propriétés antimicrobiennes, antitumorales, antileucémiques et vermifuges. Cette plante contient la globularine (substance résineuse) qui est un dépuratif (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1980 ; Elbetieha *et al.*, 2000 ; Djerroumi et Nacef, 2004).

Il a été rapporté par Elbetieha *et al.* (2000) qu'une décoction des feuilles et de branches de la globulaire avec des figes sèches donne des solutions à effet laxatif et diurétique et qui servent aussi pour le traitement des furoncles et la fièvre intermittente. Dans leurs études sur l'effet des extraits de plantes sur la glycémie, plusieurs auteurs ont démontré que l'administration par voie orale des extraits aqueux de *G. alypum* aux rats rendus diabétiques, réduit considérablement le taux de glucose dans le sang (Skim *et al.*, 1999 ; Jouad *et al.*, 2002).

2. *Myrtus communis* L.

2.1. Description botanique et répartition géographique

Myrtus communis L., appelé communément le myrte, appartient à la famille des myrtaceae. C'est un arbuste vivace ornemental qui peut atteindre jusqu'à 3 m de haut. Il est reconnaissable à ses rameaux anguleux et ses tiges recouvertes d'une écorce rousse, à ses feuilles persistantes coriaces, ovales et alternes avec un limbe lancéolé (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1980 ; Cakir, 2004 ; Djerroumi et Nacef, 2004 ; Hayder *et al.*, 2004). A l'aisselle des feuilles poussent des baies rouges au début puis noir bleuâtre à maturité (figure 2). Ces fruits sont charnues et ont plusieurs noyaux et sont recouverts d'une fine poussière blanche. Les fleurs sont de couleur blanche, odorantes avec cinq pétales (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1980 ; Hlimi, 2004 ; Ciccarelli *et al.*, 2005 ; Montoro *et al.*, 2006).

Le myrte pousse en colonies sur les sols siliceux, riches en résidus organiques. Cet arbuste de montagne est très répandu sur tout le littoral (Afrique du Nord), dans les bois et sur les coteaux (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1980 ; Mendes *et al.*, 2001).



Nom vernaculaire français : Myrte
Nom vernaculaire anglais : Myrte common
Nom vernaculaire kabyle : Chilmoune
Nom vernaculaire arabe : Asse

Figure 2 : Photographie de *Myrtus communis* L. (Anonyme 2, 2006).

2.2. Classification

La classification du myrte est décrite par Judd *et al.* (2002).

Tableau II : Classification botanique de *Myrtus communis* L. (Judd *et al.*, 2002).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Myrtus</i>
Espèce	<i>Myrtus communis</i> L.

2.3. Vertus thérapeutiques

Le myrte était traditionnellement utilisé par les aborigènes de la méditerranée pour le traitement symptomatique de l'asthme, des bronchites, des catarrhes et des hémorroïdes. Les feuilles ont un pouvoir tonique, diurétique, hémostatique, antibactérien, antiseptique et astringent. Son action astringente est due à sa richesse en tanins et son action antiseptique est due à une huile essentielle, s'éliminant par les branches et les voies urinaires dont les constituants les plus actifs sont l'eucalyptol et le myrtol (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1980 ; Leclerc, 1999 ; Fintelmann et Weiss, 2004). Elles sont particulièrement indiquées contre les diarrhées, la paresse intestinale, le mauvais fonctionnement de la vessie et pour le traitement du diabète dans la mesure où elles font baisser le taux de sucre dans le sang (Flamini *et al.*, 2004 ; Hlimi, 2004 ; Mehneche, 2004). Les feuilles de myrte sont utilisées sous forme de bain de bouche pour le traitement des candidoses et en décoction pour le traitement des contusions et les hémorroïdes. Dans la médecine turque, les fruits et les feuilles ont été utilisés comme étant un antiputride (Cakir, 2004 ; Hayder *et al.*, 2004 ; Bremness, 2005).

3. *Pistacia lentiscus* L.

3.1. Description botanique et répartition géographique

Pistacia lentiscus L., nommé le « lentisque », est un arbuste touffu toujours vert à tronc crevassé, ne dépassant généralement pas trois mètres de hauteur bien qu'il puisse parfois atteindre cinq à six mètres de haut. Une résine (Mastic de Chio) d'odeur forte, en larmes jaunes pâles est obtenue par incision du tronc (Castola *et al.*, 2000 ; Kordali *et al.*, 2003 ; Djerroumi et Nacef, 2004). Ces feuilles persistantes paripennées, de quatre à dix paires de folioles oblongues lancéolées ou elliptique, obtuses, glabres, de couleur verte foncée, luisantes au dessus et prennent une teinte pourpre en hiver. Le pétiole et la nervure principale sont bordés d'une aile verte et étroite. Les fleurs sont apétales en petits racèmes à l'aisselle des feuilles, à calice penta lobé à cinq étamines de couleur rougeâtre (figure 3). La floraison se fait entre avril et juin. Le fruit globuleux de couleur rouge puis noir à maturité (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1986 ; Beloued, 2001). Le lentisque est un térébinthacée des régions tropicales et méditerranéennes (Correia et Diaz Barradas, 2000), pousse en Algérie dans les zones arides et se trouve en abondance le long du Tell (Hlimi, 2004 ; Green *et al.*, 2005).



Nom vernaculaire français : Lentisque ou arbre au mastic

Nom vernaculaire anglais : Mastic tree

Nom vernaculaire kabyle : Amadagh

Nom vernaculaire arabe : Darw

Figure 3 : Photographie de *Pistacia lentiscus* L. (Anonyme 3, 2006).

3.2. Classification

La classification décrite ci-dessous est établie par Guignard (2001).

Tableau III : Classification botanique de *Pistacia lentiscus* L. (Guignard, 2001).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i> L.

3.3. Vertus thérapeutiques

Les vertus thérapeutiques de *Pistacia lentiscus* sont dues à ces propriétés astringentes, expectorantes et cicatrisantes. Ces feuilles sont indiquées dans le traitement d'eczéma, diarrhée, infection de la gorge, calcul rénal et la jaunisse (Janakat et Al-Merie, 2002 ; Kordali *et al.*, 2003 ; Kivçak et Akay, 2005).

La population espagnole utilisait les écorces de *Pistacia lentiscus* pour le traitement de l'hypertension. L'épilupeol et l'acétate d'épilupeol sont des composés retrouvés dans la résine du lentisque, ces derniers ont une activité antivirale, antibactérienne et antifongique (Kordali *et al.*, 2003 ; Kivçak et Akay, 2005). D'après Hlimi (2004), les huiles extraites des fruits du lentisque ont un effet antibactérien. En plus de ces vertus thérapeutiques, les huiles essentielles du lentisque sont utilisées dans l'industrie alimentaire, dans la fabrication du savon et des produits cosmétiques et les branches sont utilisées dans la fabrication des couffins. L'écorce est incisée pour sa résine, le mastic est utilisé en méditerranée orientale comme du Chewing-gum pour rafraîchir l'haleine. Il est aussi utilisé comme expectorant dans les amalgames dentaires provisoires, les colles et les vernis (Tassou et Nychas, 1995 ; Duru *et al.*, 2003 ; Kordali *et al.*, 2003 ; Bremness, 2005).

4. *Retama sphaerocarpa* L. Boissier

4.1. Description botanique et répartition géographique

Retama sphaerocarpa, appelé communément « retama », est un arbuste vivace qui appartient à la famille des Fabaceae. Cette dernière comprend dix milles espèces et représente la plus grande partie des légumineuses. Cet arbuste est très ramifié et peut atteindre jusqu'à deux mètres de haut (López Lázaro *et al.*, 1998 ; Martín-Cordero *et al.*, 1999 ; Fungairiño *et al.*, 2005). Cette plante est très reconnaissable à l'aspect de ses feuilles effilés comme des aiguilles, coriaces et persistante ; et à celui de ses fleurs jaunes, bisexuées et à corolles dites en « papillon » (figure 4). La floraison se fait entre avril et juillet. *R. sphaerocarpa* possède un système racinaire profond qui peut aller jusqu'à 25 m et qui est capable de résister à la sécheresse dans les zones arides et semi-arides. Cette espèce, extrêmement importante, est capable de fixer l'azote grâce à ses nodules racinaires contenant des bactéries symbiotiques (*Rhizobium*) fixant l'azote atmosphérique (Guignard, 2001 ; Spichiger *et al.*, 2002 ; Caravaca *et al.*, 2003). Certains Fabaceae sont cosmopolites, d'autres couvrent à elles seules de vastes étendus. Retama est très commune dans la méditerranée, domine dans les régions centrales ayant un climat semi-aride (Espigares *et al.*, 2004).



Nom vernaculaire français : Retama
Nom vernaculaire anglais : Retama
Nom vernaculaire kabyle : Tiluguit
Nom vernaculaire arabe : Rtam

Figure 4 : Photographie de *Retama sphaerocarpa* L. Boiss. (Anonyme 4, 2006).

4.2. Classification

La classification de *Retama sphaerocarpa* est déterminée par Guignard (2001).

Tableau IV : Classification botanique de *Retama sphaerocarpa* L. Boiss.

(Guignard, 2001)

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Eurosidées
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	<i>Retama</i>
Espèce	<i>Retama sphaerocarpa</i> L. Boiss.

4.3. Vertus thérapeutiques

Peu d'études sont réalisées sur *Retama sphaerocarpa*. Néanmoins, elle est citée comme étant une plante à effet diurétique, tonique et laxatif. Elle est employée comme abortif et hypoglycémiant (Mulet, 1997).

En Algérie, les études sur cette plante manquent énormément pour ne pas dire absentes. Cependant, les témoignages recueillis auprès des vieilles femmes du village Taghzouit (Seddouk) stipulent que la plante *Retama Sphaerocarpa* est utilisée comme un désinfectant efficace qui purifie le milieu urinaire. C'est aussi un diurétique à effet aussi rapide que puissant et un sédatif dans les mictions difficiles. Elle est aussi utilisée comme un cicatrisant et antidiarrhéique.

5. *Rhamnus alaternus* L.

5.1. Description botanique et répartition géographique

Rhamnus alaternus L., appelée alaterne, est un arbuste vivace, ressemblant à la bourdaine, peut atteindre jusqu'à quatre mètres de haut (Hlimi, 2004 ; Bas *et al.*, 2005). Ces feuilles pérennes, ovales, alternes et lisses ressemblent à celles du myrte. Ces petites fleurs jaunes unisexuées et apétales dégagent une odeur agréable rappelant celle du miel. La floraison se fait entre février et avril (Hlimi, 2004 ; Mehneche, 2004).

L'alaterne donne des baies qui poussent en grappe, rouges au début et noires à maturité (figure 5). Chaque baie possède deux à cinq noyaux qui sont enveloppés dans des endocarpes, leur stade de maturation est entre les mois d'avril et mi-août (Bas *et al.*, 2005).

Avec ses rameaux anguleux, cet arbrisseau pousse abondamment dans les pays méditerranéens et se trouve abondant à l'ombre des forêts de conifères. En Algérie, cette espèce croît sur les coteaux ensoleillés du Tell (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1980 ; Djerroumi et Nacef, 2004).



Nom vernaculaire français : Nerprun alaterne

Nom vernaculaire anglais : Barren privet

Nom vernaculaire kabyle : Imlilasse

Nom vernaculaire arabe : Malilasse

Figure 5 : Photographie de *Rhamnus alaternus* L. (Anonyme 5, 2006)

5.2. Classification

La classification ci-dessous est décrite par Gausсен *et al.* (1982)

Tableau V : Classification botanique de *Rhamnus alaternus* L. (Gausсен *et al.*, 1982)

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Eurosidées
Ordre	Rhamnales
Famille	Rhamnaceae
Genre	<i>Rhamnus</i>
Espèce	<i>Rhamnus alaternus</i> L.

5.3. Vertus Thérapeutiques

L'alaterne est très utilisée dans le traitement de la jaunisse. Elle est connue pour ces propriétés laxatives et purgatives. Les indiens de la côte Nord Ouest du pacifique ont utilisé cette plante pendant des siècles comme remède traditionnel contre la constipation, mais également pour soulager d'autres troubles digestifs et dans le traitement des hémorroïdes (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1986 ; Small et Catling, 2000). Une décoction de tiges feuillées d'alaterne est employée comme une eau de cuisson de lentilles et de viandes bovines (Djerroumi et Nacef, 2004).

Chapitre II

Radicaux libres

Chapitre II : Radicaux libres

1. Radicaux libres

1.1. Définition

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un ou plusieurs électrons non appariés sur leurs couches externes (Clarkson et Thompson, 2000 ; Gilgun-Sherki *et al.*, 2001 ; Wilson et Salamantian, 2003). La tendance naturelle de ces électrons non appariés à interagir avec les électrons de molécules ou d'atomes voisins, pour reformer des liaisons chimiques covalentes, confère aux radicaux libres une très grande instabilité et une extrême réactivité chimique (Kiokia et Oreopoulon, 2006).

2. Espèces réactives de l'oxygène

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie, ce sont les radicaux primaires. Ces derniers dérivent de l'oxygène par des réactions de réduction et les composés les plus courants sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires se forment par réaction de ces radicaux primaires avec les composés biochimiques de la cellule. D'autres espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), sont réactives et peuvent être des précurseurs des radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est appelé ROS (Reactive Oxygen Species) (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001 ; Gülçin *et al.*, 2003 ; Jung *et al.*, 2005 ; Ré *et al.*, 2005).

3. Production des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits en permanence dans l'organisme dans des conditions physiologiques ou pathologiques (Benzie et Strain, 1996). Cette production peut être d'origine endogène ou exogène. Ces radicaux libres, étant très réactifs, ont une durée de vie extrêmement courte (Machlin et Bendich, 1987 ; Pietta, 2000 ; Castronovo, 2003 ; Gülçin *et al.*, 2003).

3.1. Origine endogène

L'essentiel de la production radicalaire est associé au métabolisme cellulaire de l'oxygène et aux réactions d'oxydo-réduction (Droy-Lefaix, 1993).

3.1.1. Mitochondries

Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la respiration mitochondriale. Toutefois, la réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires cellulaires s'accompagne d'une formation parallèle d'environ 2 à 3 % d'ions superoxyde, d'eau oxygénée et éventuellement de radicaux OH^\cdot . Le radical superoxyde est peu réactif, il ne traverse pas les membranes cellulaires et il est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Favier, 2003 ; Gülçin *et al.*, 2003 ; De Moffarts *et al.*, 2005).

3.1.2. Cellules phagocytaires

L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement via les cellules immunitaires comme les monocytes, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles pour détruire les microorganismes et les macromolécules étrangères. La stimulation de ces cellules immunitaires s'accompagne d'une accélération de leur consommation d'oxygène avec activation d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase qui catalyse la réduction de cet oxygène en anion superoxyde O_2^\cdot . Ce dernier donne le H_2O_2 par dismutation. Le O_2^\cdot et H_2O_2 participent à la libération d'hypochlorite et de chloramines sous l'influence d'une enzyme leucocytaire, la myéloperoxydase (Droy-Lefaix, 1993 ; Rajendran *et al.*, 2004 ; De Moffarts *et al.*, 2005).

3.1.3. Réactions de détoxication

Les réactions oxydatives de détoxication sont aussi à l'origine des radicaux libres. Les oxydases contenues dans les peroxysomes transforment l'oxygène moléculaire en anion superoxyde et en peroxyde d'hydrogène. Les cytochromes p450 sont aussi incriminés dans la production radicalaire lors de l'oxydation de certains composés tels que les médicaments et les résidus de la fumée de cigarette à leur niveau (Droy-Lefaix, 1993).

3.1.4. Xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une métallo-enzyme à molybdène retrouvée dans les cellules sous la forme de xanthine deshydrogénase. Cette dernière est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Au cours des phénomènes d'ischémie-réperfusion, la xanthine deshydrogénase est convertie en xanthine-oxydase (XO). Cette dernière agit sur l'hypoxanthine et la xanthine en présence d'oxygène moléculaire pour produire les radicaux libres et essentiellement les radicaux superoxydes (González *et al.*, 1995 ; Owen et Johns, 1999 ; Vivot *et al.*, 2001 ; Servais, 2004).



3.1.5. Ions métalliques

Le cuivre et le fer libres, existant lors d'une surcharge générale et les métaux toxiques tels que le chrome et le vanadium, sont des promoteurs importants qui génèrent des radicaux hydroxyles à partir du peroxyde d'hydrogène, par la réaction de Fenton (1) (Aurousseau, 2002 ; Ré *et al.*, 2005).



Le radical superoxyde peut réduire le Fe^{+3} et former le Fe^{+2} selon la réaction ci-dessous :



Le bilan des réactions (1) et (2) est appelé réaction d'Haber-Weiss :



3.1.6. Autres sources

Les espèces réactives oxygénées peuvent être également produites par l'autooxydation des catécholamines ou suite à leur catabolisme par la monoamine oxydase. En outre, la synthèse des prostaglandines conduit à la formation des radicaux hydroxyle (OH^\cdot) durant la phase de transformation de l'acide arachidonique en endopéroxydes sous l'effet de la cyclooxygénase.

Certaines cellules peuvent aussi produire le radical NO[•] lors de l'oxydation de l'arginine en citruline. Cette réaction est catalysée par le NO synthétase en présence de NADPH et d'oxygène (Ré *et al.*, 2005).

3.2. Origine exogène

Lors d'une irradiation ou d'une exposition à une source d'énergie lumineuse d'intensité suffisante, les rayonnements électromagnétiques sont capables de générer des radicaux libres, soit par radiolyse des molécules d'eau (rayons ionisants X ou γ) ou par activation des molécules photosensibilisantes (rayons UV), générant ainsi des anions superoxydes et de l'oxygène singulet (Bermond, 1991 ; Lee *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004).

Les rayonnements ne sont pas les seuls agents incriminés, plusieurs facteurs externes sont aussi mis en cause. Les fumées de combustion (de cigarettes, de bois, etc.), les produits chimiques tels que les antiseptiques, les pesticides tel que le Dichlorodiphényl-trichloroéthane (DDT), les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens, les métaux de transition et les poussières d'amiante et de silice contribuent d'une façon ou d'une autre à la production des radicaux libres. La consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter (Pincemail *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2004 ; Pincemail et Defraigne, 2004).

4. Stress oxydant

Dans les circonstances quotidiennes normales, les cellules de l'organisme, en état d'oxydoréduction, produisent en permanence et en faibles quantités des espèces réactives de l'oxygène. Le contrôle rigoureux de la formation et de l'élimination de ces ROS est parfaitement maîtrisé par les systèmes de défense. Quand cet équilibre est rompu en faveur des radicaux libres, il survient un stress oxydant (Lee *et al.*, 2004).

Ce dernier résulte donc d'une augmentation de radicaux libres suite à un déséquilibre de la balance antioxydants/prooxydants, c'est-à-dire, un déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense antioxydants au profit des premiers (Pincemail *et al.*, 2002 ; Amić *et al.*, 2003 ; De Moffarts *et al.*, 2005 ; Katalinic *et al.*, 2006).

Plusieurs phénomènes semblent être impliqués dans l'apparition de ce stress (Pincemail *et al.*, 2002) :

- 1- un déficit en antioxydants tels que les vitamines ou les oligoéléments (Cu, Zn, Se, etc.) apportés par la nutrition ;
- 2- anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine soit enzymatiquement antioxydante, soit synthétisant un antioxydant (comme la gamma-glutamyl synthétase produisant le glutathion) ou régénérant un antioxydant ;
- 3- une activation des enzymes (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase) ;
- 4- une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices de métaux ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines).

5. Avantages et inconvénients des radicaux libres :

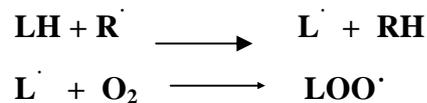
Les radicaux libres sont instables et réagissent avec les premières molécules qu'ils rencontrent. Ils protègent l'organisme contre les agressions causées par les microorganismes et les cellules tumorales. Cependant, ils sont à l'origine de l'altération et de l'usure des tissus. Leur production excessive provoque des lésions au niveau des molécules biologiques et entraîne plusieurs maladies (Lako *et al.*, 2007).

5.1. Effets indésirables

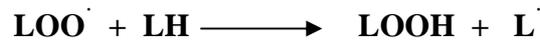
Les espèces réactives de l'oxygène dont la production est un phénomène physiologique naturel, lié à l'oxydation ou à la réduction, peuvent s'attaquer à plusieurs composés vitaux des cellules (lipides, protéines, ADN, glucides) et entraîner plusieurs effets délétères (Clarkson et Thompson, 2000 ; Pincemail et Defraigne, 2004 ; Gülçin *et al.*, 2005).

5.1.1. Effets sur les lipides

Les lipides et principalement les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les radicaux libres. Suite à leur contact, les molécules lipidiques subissent un ensemble de réactions appelées la peroxydation. La peroxydation des lipides est généralement initiée par un radical (R[•]) particulièrement réactif. Ce dernier déclenche une cascade de réactions en extrayant un atome d'hydrogène à un groupement méthylène d'un acide gras insaturé (LH) pour former un radical diène conjugué qui, en présence d'oxygène, s'oxyde en un radical peroxyde.



Cette réaction de peroxydation va pouvoir se propager de proche en proche car le radical peroxyde formé se transforme en hydroperoxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Lee *et al.*, 2004 ; Ré *et al.*, 2005).



Les acides gras ainsi modifiés altèrent la fluidité membranaire des cellules et donc le dysfonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et peuvent aller jusqu'à leur désintégration (Yen et Hsieh, 1998). Les hydroperoxydes après leur dégradation peuvent soit libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonalaldéhyde ou l'hydroxynonanal (Clarkson et Thompson, 2000) ou reformer de nouveaux radicaux lipidiques en présence de métaux de transition (Ré *et al.*, 2005). Les radicaux libres ne se contentent pas uniquement des phospholipides membranaires mais leur attaque peut aller jusqu'aux lipoprotéines circulantes formant des LDL (Low Density Lipoprotein) oxydées (De Moffarts *et al.*, 2005 ; Ré *et al.*, 2005).

5.1.2. Effets sur les protéines

Les effets des ROS sur les protéines sont complexes, allant du clivage des chaînes latérales des différents acides aminés jusqu'aux squelettes protéiques. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées.

Les protéines peuvent alors soit subir des réticulations par formation notamment de pont bi-tyrosine, soit subir des coupures en cas d'agression forte et soit des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérées (Favier, 2003).

Les acides aminés des protéines peuvent subir des phénomènes de carbonylation ($=C=O$), rendant les protéines ainsi modifiées plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (Wilson et Salamantian, 2003). Les protéines oxydées peuvent aussi devenir très hydrophobes soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation des zones hydrophobes centrales, ce qui conduit à la formation des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas associés aux lipides forment les dépôts de lipofuschines, caractéristiques des tissus des personnes âgées (Favier, 2003).

5.1.3. Effets sur l'acide désoxyribonucléique

Les ROS peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. L'acide désoxyribonucléique (ADN), macromolécule aussi importante, n'échappe pas aux lésions causées par les espèces réactives oxygénées. Cinq classes principales de dommages oxydatifs causés par le radical hydroxyle peuvent être générées (Lampe, 1999 ; Favier, 2003) :

- 1- l'oxydation des bases de l'ADN et particulièrement la guanine conduisant à leurs modifications ;
- 2- Coupure des liaisons entre les bases et le désoxyribose formant ainsi des sites abasiques ;
- 3- le désoxyribose peut lui-même subir une attaque radicalaire, créant une coupure de chaîne simple brin ;
- 4- la peroxydation des lipides génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN ;
- 5- les protéines qui rentrent en contact avec l'ADN (histones, enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription) peuvent être la cible des radicaux libres, entraînant des pontages des protéines sur des bases de type lysinoguanine.

Dans ce cas, les lésions non réparées vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner soit des erreurs de lecture et de synthèse par des ADN polymérase, soit une impossibilité de copie de l'ADN qui aboutira en apoptose.

5.1.4. Effets sur les glucides

Les espèces réactives de l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycane du cartilage (Favier, 2003). Ces derniers sont aussi responsables de la diminution de la viscosité du fluide synoviale par polymérisation de l'acide hyaluronique dans les maladies inflammatoires (Saari, 1991). Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiopathologiques, en présence d'ions, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH^\cdot qui entraîneront la coupure des protéines (Favier, 2003).

5.1.5. Maladies engendrées par le stress oxydant

Les désordres biochimiques causés par le stress oxydant impliquent celui-ci dans de très nombreuses maladies, soit comme un des facteurs déclenchant, soit comme une des causes de complication dans leur évolution (Huang *et al.*, 2004).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux. Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, oedèmes pulmonaires et vieillissement accéléré. Il est aussi l'un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, les rhumatismes, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Bermond, 1991 ; Mantle *et al.*, 1998 ; Prieto *et al.*, 1999 ; Poitouti *et al.*, 2000 ; Pincemail *et al.*, 2001 ; Auddy *et al.*, 2003).

Les acides gras polyinsaturés des LDL peuvent être oxydés par les radicaux libres, donnant ainsi des LDL oxydés capables d'être acceptés par les macrophages. Ces cellules accumulent le cholestérol et se transforment en cellules spumeuses, caractéristiques de la plaque d'athérome (Lecerf, 1999).

Le stress oxydant joue également un rôle dans l'apparition d'autres facteurs athérogènes telles que l'augmentation de la résistance à l'insuline et activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs prooxydants (cytokines, facteurs de fibrinolyse et monoxyde d'azote) (Geletii *et al.*, 2002).

5.2. Avantages des radicaux libres

Les espèces réactives de l'oxygène, générées par les cellules, ont longtemps été considérées comme des produits toxiques. Cependant, il est apparu que ces espèces, lorsqu'elles sont formées en faibles concentrations, elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions utiles. Elles participent aux fonctionnements de certaines enzymes, à la régulation des voies de signalisation et de l'expression des gènes au niveau des cellules vasculaires et jouent ainsi un rôle important dans les processus physiologiques et pathologiques de ces cellules. En intervenant comme seconds messagers, les ROS jouent un rôle dans le contrôle des processus cellulaires physiologiques tels que la croissance, la sénescence, l'apoptose ou la survie des cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. En cas de pathologie, ils interviennent dans la destruction par apoptose des cellules tumorales (Poitouti *et al.*, 2000 ; Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2002).

L'avènement de la biologie moléculaire montre qu'ils permettent aussi d'induire la réponse cellulaire à de nombreux stress (ultraviolets, xénobiotiques) permettant ainsi l'expression des gènes de défense (Pietta, 2000 ; Servais, 2004). Les radicaux libres de l'oxygène tels que les radicaux hydroxyles (OH[•]) et les radicaux peroxydes (LOO[•]) ou de l'azote, même réactifs, ne sont pas uniquement toxiques mais ils sont produits par l'organisme afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires telles que les macrophages et les polynucléaires (Favier, 2003 ; De-Moffart *et al.*, 2005).

Chapitre III

Systemes antioxydants

Chapitre III : Systèmes antioxydants

1. Définition d'un antioxydant

Les systèmes de défense contre les ROS visent surtout à limiter les réactions radicalaires qui sont pour la plupart irréversibles. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants (Servais, 2004 ; Ré *et al.*, 2005). Par définition, un antioxydant est toute substance capable d'inhiber ou de retarder l'oxydation d'un substrat tout en étant présente à une faible concentration par rapport à la concentration du substrat oxydable. Ces antioxydants peuvent avoir plusieurs origines, ils peuvent être produits dans l'organisme ou apportés par l'alimentation ou bien sont issus d'une synthèse chimique (Salah *et al.*, 1995 ; Benzie et Strain, 1996 ; Al-Mamary *et al.*, 2002 ; Antolovich *et al.*, 2002 ; Javanmardi *et al.*, 2003 ; Karou *et al.*, 2005 ; Berger, 2006).

2. Mécanismes de défense

Afin de contrer à l'action oxydante des radicaux libres, l'organisme dispose de plusieurs systèmes de défense spécifiques qui contribuent d'une manière coopérative à la survie cellulaire en détruisant les espèces réactives oxygénées, protégeant ainsi les milieux biologiques de leurs effets toxiques. Ces mécanismes de défense peuvent être soit (Droy-Lefaix. *et al.*, 1993 ; Jadot, 1998 ; Milane, 2004) :

- des systèmes enzymatiques antioxydants spécifiques ;
- des molécules piègeuses des métaux de transition libres;
- des antioxydants d'origine alimentaire ou synthétique.

2.1. Systèmes enzymatiques antioxydants

Les cellules possèdent des systèmes enzymatiques qui leurs permettent de se protéger contre toutes agressions radicalaires (Mantle *et al.*, 1998). Trois types d'enzymes forment la clé de voute de ces systèmes antioxydants.

Il s'agit des superoxydes dismutases (SOD), la catalase qui joue un rôle de protection et les glutathions peroxydases et réductases qui ont une fonction de détoxification (Geletii *et al.*, 2002 ; Wilson et Salamantian, 2003 ; Milane, 2004).

2.1.1. Superoxyde dismutases

La superoxyde-dismutase catalyse la dismutation de deux anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et une molécule d'oxygène à pH neutre, la réaction étant la suivante :



La transformation du radical superoxyde en H_2O_2 peut s'effectuer spontanément mais la SOD l'accélère environ dix milles fois. La superoxyde dismutase est inductible, sa biosynthèse est augmentée par l'hyperoxygénation et par la présence de certains toxiques comme le paraquat. Trois formes de SOD sont identifiées dans la cellule (Pincemail *et al.*, 1998a ; Dodet, 1991 ; Wilson et Salamantian, 2003 ; Servais, 2004 ; Endo *et al.*, 2005):

- 1- une SOD à cuivre et à zinc (SOD Zn, Cu), elle est présente dans le cytoplasme de toutes les cellules des eucaryotes et elle produite continuellement même en anaérobie ;
- 2- une SOD à fer et à manganèse (SOD Mn, Fe) qui se trouve dans les mitochondries (elle n'est pas produite en permanence mais sa concentration augmente en réponse à une attaque oxydative) ;
- 3- une SOD sécrétée au niveau des liquides extracellulaires, appelée EC-SOD, a aussi comme cofacteur le cuivre et le zinc. Elle est présente dans les liquides biologiques (plasma, lymphe, liquide synovial) mais se trouve surtout en abondance dans les tissus.

2.1.2. Catalase

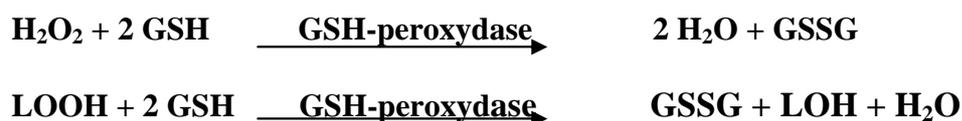
La catalase, enzyme confinée dans le cytosol et dans les peroxysomes, a pour rôle d'accélérer la réaction spontanée qui transforme l'eau oxygénée en eau et en oxygène. En outre, elle prévient la formation de radicaux OH^{\cdot} et empêche le peroxyde d'hydrogène de participer à la réaction de Fenton (Droy-Lefaix *et al.*, 1993).

La catalase se trouve dans la plupart des cellules et elle est concentrée dans le foie et les globules rouges (Cheeseman et Slater, 1993 ; Droy-Lefaix *et al.*, 1993 ; Albrecht, 1994 ; Wilson et Salamantian, 2003 ; Milane, 2004).



2.1.3. Glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GSH-peroxydase) est une enzyme séléno-dépendante (Clarkson et Thompson, 2000), présente à la fois dans le cytosol et dans la mitochondrie. Elle joue un rôle de détoxification par la réduction de deux substrats, le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques (Tessier et Marconnet, 1995 ; Wilson et Salamantian, 2003 ; Ducros et Favier, 2004 ; Milane, 2004).



La glutathion peroxydase assure en synergie avec des enzymes (SOD, catalase) ou certaines molécules (tocophérol, acide ascorbique, caroténoïde) l'équilibre intra et extra cellulaire de la balance antioxydant/prooxydant. Elle est aussi impliquée dans la détoxification d'agents cancérigènes (Wilson et Salamantian, 2003 ; Ducros et Favier, 2004).

L'activité de détoxification des GSH-peroxydase face aux hydroperoxydes nécessite une autre enzyme, la phospholipase A₂ (PLA₂). Cette dernière libère des acides gras en hydrolysant les fonctions esters des phospholipides membranaires. Les peroxydes produits dans le cytosol sont transformés par la GSH-peroxydase tandis que les acides gras membranaires manquants sont resynthétisés (Milane, 2004 ; Servais, 2004).

2.1.4. Glutathion réductase

La glutathion réductase (GSH-réductase) est une flavoprotéine très répandue dans le cytosol et dans les mitochondries, c'est-à-dire au même niveau que la GSH-peroxydase. Ces deux enzymes constituent le second grand système enzymatique antioxydant des cellules (Wilson et Salamantian, 2003).

Le maintien de l'activité de la GSH-péroxydase nécessite la régénération du glutathion oxydé GSSG par la GSH-réductase en présence d'un cofacteur qui est le NADPH, empêchant ainsi son accumulation or l'accumulation provoque diverses perturbations métaboliques dont l'inhibition de la synthèse protéique. Cette réaction produit du NADP⁺ qui donne le NADPH par le glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (Albrecht *et al.*, 1994 ; Wilson et Salamantian, 2003).



2.2. Molécules piégeuses de métaux

Les métaux sont rarement retrouvés à l'état libre dans l'organisme, ils perdent partiellement ou totalement leurs activités de stimulation des réactions radicalaires lorsqu'ils sont liés à différentes métalloprotéines (Helm *et al.*, 1999 ; Wilson et Salamantian, 2003). Le fer sous sa forme libre joue, en tant qu'élément catalyseur, un rôle prépondérant dans l'activation des réactions radicalaires. De nombreuses métalloprotéines telles que la ferritine, la lactoferrine, la transferrine, la céruloplasmine et l'albumine permettent de chélater les métaux (Fe, Cu, etc.) impliqués dans la formation des radicaux hydroxyles lors des réactions concomitantes de Fenton et d'Haber-Weiss (De Moffarts *et al.*, 2005).

2.3. Antioxydants d'origine alimentaire

En plus de la prévention par les enzymes ou les protéines chélatrices de métaux, l'apport d'antioxydants d'origine alimentaire est utile pour éviter les effets néfastes issus de l'attaque radicalaire. L'alimentation contient un grand nombre d'antioxydants non seulement les vitamines, les caroténoïdes et les oligoéléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse...), mais aussi les polyphénols, les alcaloïdes et les acides organiques. Toutefois, il faudra se méfier des effets paradoxaux de fortes doses d'antioxydants (Favier, 2003 ; Judde, 2004 ; Roland, 2004 ; Blomhoff, 2005).

2.3.1. Tocophérol (Vitamine E)

La vitamine E est un terme générique qui désigne un ensemble de composés phénoliques appelés tocophérols (α , β , γ , δ) ou tocols. Ils diffèrent les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique (figure 6) (Pincemail *et al.*, 1998c).

Ils sont constitués d'un résidu hydroquinone substitué par un ou plusieurs groupes méthyles et d'une chaîne polyisoprénique plus ou moins saturée (Pincemail *et al.*, 1998c ; Helm *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2004). L' α -tocophérol est la seule forme retenue par l'organisme car elle est biologiquement plus active et plus efficace (Hensley *et al.*, 2004).

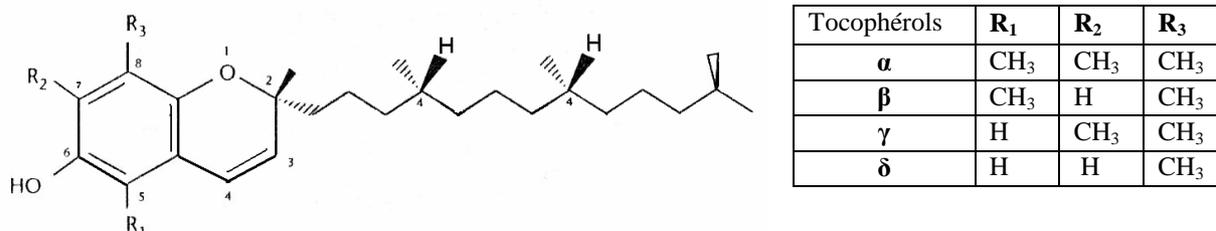
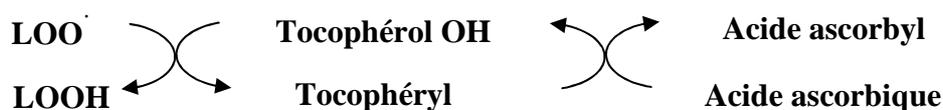


Figure 6 : Structure chimique globale des tocophérols (Pincemail *et al.*, 1998c).

Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein de la membrane biologique qui est riche en acides gras polyinsaturés (AGPI), où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les espèces réactives de l'oxygène (Pincemail *et al.*, 1998c). Elle réagit avec les radicaux peroxydes (LOO \cdot) qui sont formés dans les membranes pour donner des radicaux tocophéryls plus stables (Hensley *et al.*, 2004 ; Milane *et al.*, 2004 ; Servais, 2004).

La vitamine E est un puissant inhibiteur de la formation des nitrosamides en captant l'acide nitreux, mais aussi un protecteur efficace de l'oxydation des LDL. De plus, l'effet bénéfique de la vitamine E se trouve renforcé par une consommation optimale de la vitamine C. Cette dernière réduit la vitamine E oxydée et la régénère sous sa forme antioxydante active (Rice-Evans *et al.*, 1997 ; Pincemail *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2004 ; Milane, 2004). En l'absence des systèmes de régénération appropriés, la vitamine E peut avoir des effets prooxydants (Servais, 2004).



2.3.2. Acide ascorbique (Vitamine C)

L'acide ascorbique ou la vitamine C est une molécule hydrosoluble, très répandue dans la nature (figure 7) (Louisot, 1980). Elle a, à la fois, un rôle prooxydant et antioxydant. Son activité antioxydante est comparable à celle de la vitamine E au niveau des compartiments hydrophiles de la cellule (Clarkson et Thompson, 2000 ; Tamimi *et al.*, 2002).

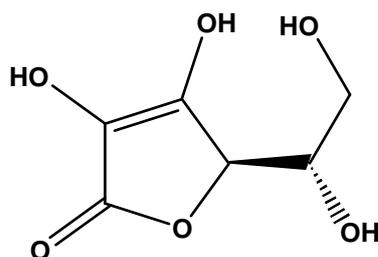
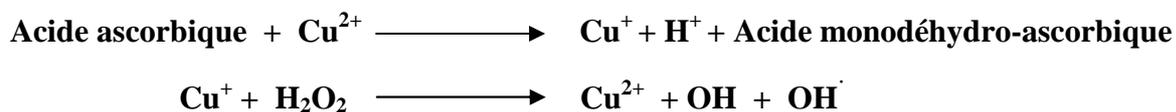


Figure 7 : Structure de l'acide ascorbique (Louisot, 1980).

L'acide ascorbique est un piègeur efficace des ROS tels que les radicaux peroxydes, hydroxydes, superoxydes et le peroxinitrite. Elle peut protéger divers substrats biologiques de l'oxydation (protéines, acides gras et ADN) (Servais, 2004) mais aussi, elle est capable de réagir avec le radical tocophéryl en régénérant la vitamine E (Reuben, 1995 ; Pincemail *et al.*, 1998b ; Wang et Jiao, 2000 ; Huang *et al.*, 2002).

La vitamine C, à une concentration élevée, a une activité pro-oxydante en favorisant la formation de radicaux hydroxydes en présence de fer et de cuivre (Servais, 2004) :



2.3.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments lipophiles synthétisés dans les chloroplastes et sont responsables de la coloration rouge, jaune et orange des végétaux (plantes, champignons, algues) (Nève, 2002 ; Josse, 2003).

Ils appartiennent à la famille des tétraterpènes (C_{40}), formés de huit unités isoprènes qui sont liées par le modèle tête-à-queue et contiennent une chaîne centrale hautement poly-insaturée. Ils sont divisés en deux groupes, les carotènes et les xanthophylles (Allen *et al.*, 1994 ; Liu, 2004).

La figure 8 montre les principaux composés retrouvés dans l'alimentation et dans le plasma humain (Faulks et Southon, 2000 ; Pokorny *et al.*, 2001 ; Giovannucci, 2002).

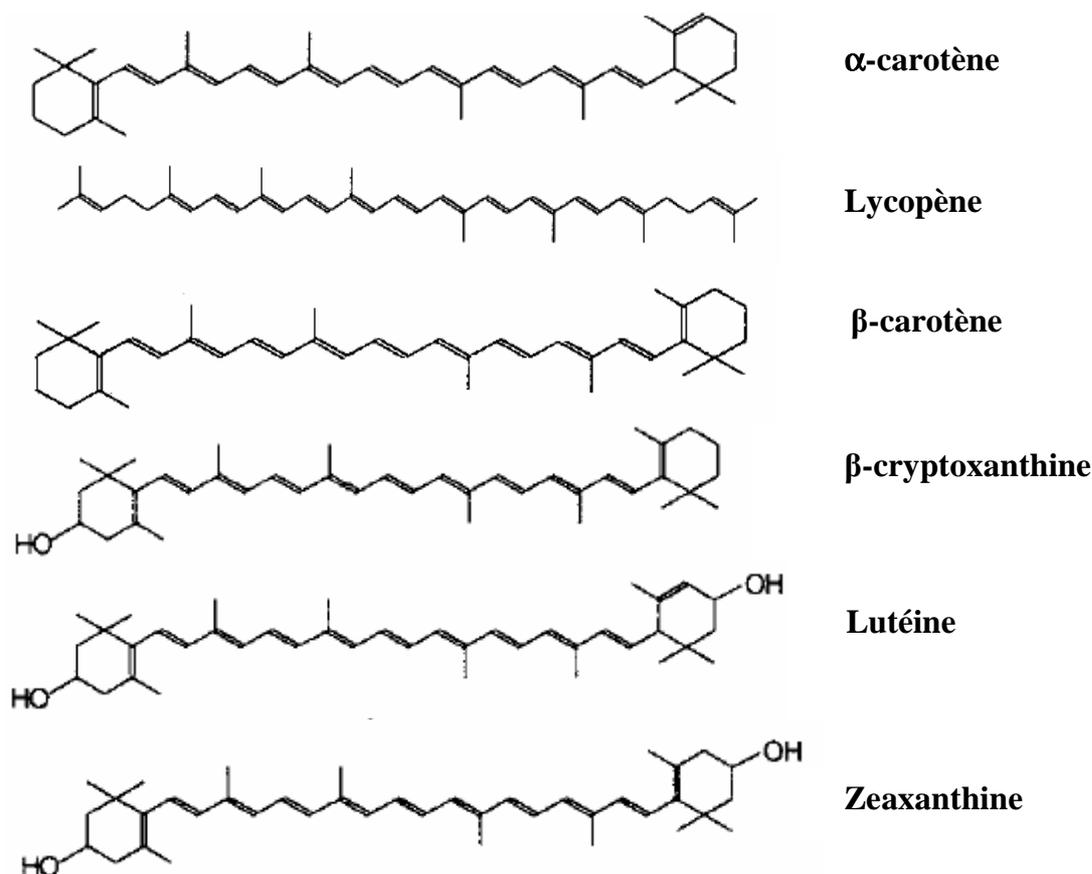
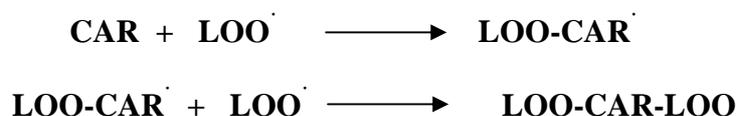


Figure 8 : Différentes structures des caroténoïdes (Pokorny *et al.*, 2001).

Les caroténoïdes (CAR) jouent un rôle antioxydant très important. Le lycopène, dont la principale source est la tomate, a la capacité de piéger l'oxygène singulet (Agarwal et Rao, 2000) et de protéger contre les radiations UV. Ce composé subi l'oxydation en absorbant l'énergie des radiations solaires et protège ainsi la peau des dommages oxydatifs (Ma *et al.*, 2003 ; Stahl et Sies, 2004 ; Dutta *et al.*, 2005).

La lutéine empêche la peroxydation lipidique, le mécanisme d'action est illustré ci-dessous :



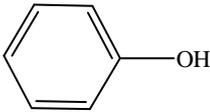
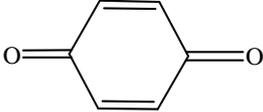
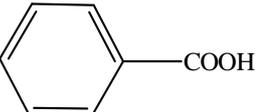
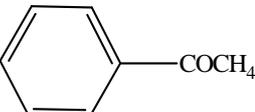
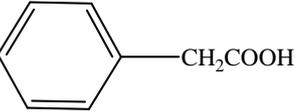
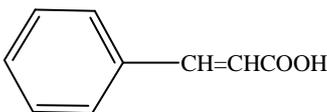
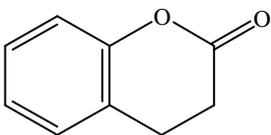
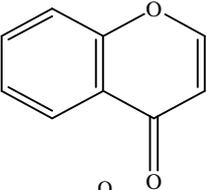
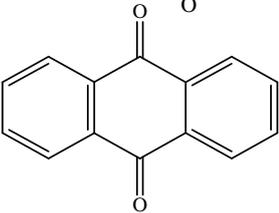
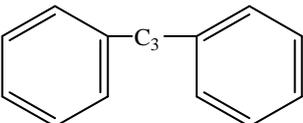
L'association des caroténoïdes entre eux ou à d'autres antioxydants augmente nettement leur action antioxydante par un phénomène de synergie (Sá et Rodriguez-Amaya, 2003). Certains caroténoïdes sont des précurseurs de la vitamine A d'où jouent un rôle nutritionnel important et interviennent dans la perception visuelle (Pincemail *et al.*, 1998d ; Englberger *et al.*, 2002).

2.3.4. Composés phénoliques

Les composés phénoliques, également dénommés polyphénols, sont des métabolites secondaires spécifiques du règne végétal (Kähkönen *et al.*, 1999). L'élément structurale de base de ces métabolites est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyles, libres ou engagés dans d'autres fonctions chimiques telles que l'éther méthylique et l'ester (Richter, 1993 ; Mompon *et al.*, 1996 ; Lecerf, 1999 ; Robbins, 2003).

Les composés phénoliques sont synthétisés par plusieurs voies réactionnelles, les plus importantes sont les voies du shikimate, acétate-malonate et acétate-mévalonate. Plus de 8000 structures sont identifiées et réparties en différentes classes selon leurs structures chimiques de base. Le tableau VI représente les principales classes (Castelluccio *et al.*, 1995 ; Monpon, 1996 ; Robbins, 2003 ; Lee *et al.*, 2004 ; Soobrattee *et al.*, 2005 ; Balasundram *et al.*, 2006).

Tableau VI : Différentes classes des composés phénoliques (Lee *et al.*, 2004).

Classe	Squelette de base	Structure
Phénols simples	C_6	
Benzoquinones	C_6	
Acides phénoliques	C_6-C_1	
Acétophénonnes	C_6-C_2	
Acides phénylacétiques	C_6-C_2	
Acides hydroxycinnamiques	C_6-C_3	
Coumarines	C_6-C_3	
Chromones	C_6-C_3	
Anthraquinones	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoïdes	$C_6-C_3-C_6$	

Plusieurs études ont démontré les propriétés antioxydantes des polyphénols. Ces molécules biologiques ont la capacité de piéger les radicaux libres et d'empêcher la génération de radicaux hydroxyles hautement réactives (Rice-Evans *et al.*, 1997 ; Kähkönen *et al.*, 2001 ; Pilarski *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2006). En outre, ils ont l'aptitude de chélater les métaux tels que le fer et le cuivre, entravant ainsi leur participation dans la réaction de Fenton (Kähkönen *et al.*, 1999). Ils inhibent aussi la xanthine oxydase et par conséquent, ils empêchent la formation des radicaux libres (Salah *et al.*, 1995 ; Fang *et al.*, 2002).

Les composés phénoliques interrompent la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique en cédant leurs atomes d'hydrogène aux radicaux peroxydes (LOO[·]). Ces derniers sont formés durant l'étape d'initiation de cette réaction de peroxydation pour former des radicaux plus stables (Kähkönen *et al.*, 1999 ; Scalbert et Mazur, 2003 ; Carrasco-Pancorban *et al.*, 2005).



La structure chimique des composés phénoliques est en relation directe avec l'activité antioxydante, cette dernière dépend essentiellement du nombre de radicaux hydroxyles et de leurs positions à l'intérieur de ces structures chimiques (Furusawa *et al.*, 2005). Selon Rice-Evans *et al.* (1997), les composés phénoliques ayant la structure o-dihydroxy sur leurs noyaux sont les composés les plus antioxydants.

2.3.4.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent l'une des classes des polyphénols. Ce sont des substances naturelles issues des plantes et comme le laisse supposer sa dénomination historique (du latin *flavus* : jaune), ces substances sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans les cuticules foliaires et dans les cellules épidermiques des feuilles (Richter, 1993 ; Di Carlo *et al.*, 1999 ; Milane, 2004).

La structure d'un flavonoïde est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C), comme le montre la figure 9.

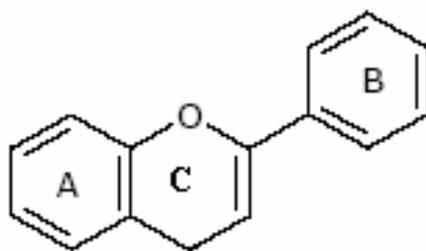
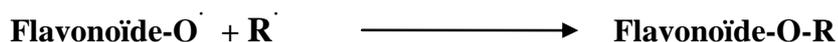
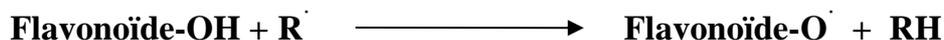


Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes (Ribéreau-Gayon, 1968).

Il existe un intermédiaire commun dans la biosynthèse des flavonoïdes, une tétra-hydroxychalcone, à partir de laquelle se différencient : les 4-oxo-flavonoïdes, les anthocyanidines et les flavanes ou tanins (Vinson *et al.*, 1995 ; Hollman *et al.*, 1996 ; Robards et Antolovich, 1997 ; Amić *et al.*, 2003 ; Milane, 2004).

Les flavonoïdes ont la capacité de réagir avec les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\cdot), l'anion superoxyde (O_2^\cdot) et les radicaux peroxylipidiques pour former des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives (Amić *et al.*, 2003 ; Wilox *et al.*, 2003 ; Rajendran *et al.*, 2004 ; Ghedira, 2005 ; Montoro *et al.*, 2005).



De plus, les flavonoïdes peuvent agir en chélatant les métaux de transition tels que le fer et le cuivre et inhibent ainsi les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss (Remesy *et al.*, 1996 ; Rice-Evans *et al.*, 1997 ; Sánchez-Moreno *et al.*, 1999 ; Lugasi *et al.*, 2003).

La quercétine, la catéchine, la lutéoline, la myricétine, l'épigallo-catéchine gallate et l'apigénine sont les flavonoïdes les plus antioxydants (Remesy *et al.*, 1996). Le LDL oxydé est l'un des principaux facteurs de risque coronarien, certains flavonoïdes se comportent comme de puissants antioxydants vis-à-vis des LDL et surtout comme des protecteurs des bases d'ADN face aux attaques radicalaires (Kähkönen *et al.*, 1999 ; Mojžišová et Kuchta, 2001 ; Montoro *et al.*, 2005).

2.3.4.2. Tanins

Les tanins sont des composés phénoliques ayant une masse moléculaire élevée allant de 500 à 3000 Da. Ils possèdent un grand nombre de groupements hydroxyles qui leur permettent des combinaisons stables avec les protéines, les polysaccharides, les acides nucléiques, les stéroïdes mais aussi à d'autres polymères tels que les alcaloïdes et les gélatines (Monties *et al.*, 1980 ; Chung *et al.*, 1998 ; Simon, 2003 ; Hedqvist, 2004). Ce groupe de composés phénoliques est généralement amorphe, soluble dans l'eau et dans l'alcool, insoluble dans les solvants organiques apolaires (Hurabielle, 1981). Du point de vue chimique, les tanins résultent de la polymérisation de molécules élémentaires à fonction phénol. D'après leurs natures, les tanins sont répartis en tanins hydrolysables ou pyrogalliques et en tanins condensés ou pyrocatéchiques (figure 10) (Ribereau-Gayon *et al.*, 1982 ; Yan et Bennick, 1995 ; Bennick, 2002).

Les tanins hydrolysables sont des molécules constituées de glucides et d'acides phénols (acide gallique ou un de ces dérivés) et font intervenir des liaisons de type ester qui sont facilement scindées par voie chimique ou enzymatique (Ribereau-Gayon, 1968 ; Chung *et al.*, 1998 ; Wróblewski *et al.*, 2001). Les tanins condensés résultent de la polymérisation des molécules élémentaires de flavanes telles que les catéchines et les leucoanthocyanidines. Ces molécules résistent à l'hydrolyse (Hagerman et Butler, 1981 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

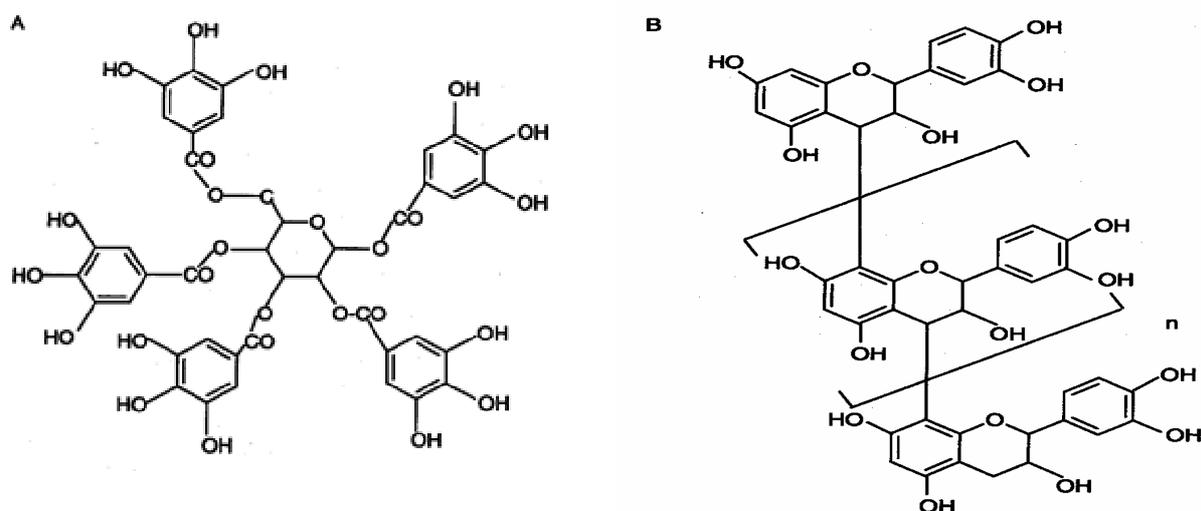


Figure 10 : Structures chimiques des tanins (Bennick, 2002)
(A : Tanins hydrolysables ; B : Tanins condensés)

Les principales propriétés des tanins sont liées à leurs aptitudes à se combiner aux protéines et à d'autres polymères tels que la cellulose ou la pectine. Cette propriété explique aussi bien leurs capacités à transformer les peaux fraîches en cuirs imputrescibles et peu perméables résultant des combinaisons tanins-collagènes. Les liaisons non covalentes, hydrogène et hydrophobes participent à la formation des complexes tanins-protéines. Ceci est valable également pour les autres propriétés des tanins comme l'inhibition des enzymes par suite de la combinaison à leurs fractions protéiques (Naurato *et al.*, 1999 ; Simon, 2003). Egalement, l'astringence des produits végétaux est due à la précipitation des tanins avec les protéines et/ou des glycoprotéines de la salive qui perdent ainsi leurs propriétés lubrifiantes (Naurato *et al.*, 1999 ; Horne *et al.*, 2002 ; Frietas *et al.*, 2003).

Les tanins possèdent différentes propriétés chimiques, ils interviennent comme oxydants intermédiaires dans les phénomènes d'oxydoréduction et piègeurs des radicaux libres. En plus, par leur groupement *ortho*-dihydroxylé, ils donnent des combinaisons avec le fer et empêchent ainsi sa participation dans la production radicalaire (Riberau-Gayon, 1968 ; Ho *et al.*, 1999).

2.3.5. Antioxydants de synthèse

Les antioxydants de synthèse peuvent être soit des produits imitant les enzymes telles que les « SOD like » basées sur des complexes de cuivre, de fer ou de manganèse ; soit des dérivés de sélénium comme l'Ebselen. Les antioxydants peuvent aussi être des molécules maintenant le fer dans un état inactif (Desferal, Hydroxypyridines) ou des molécules inhibitrices d'enzymes responsables de la formation des ROS (Allopurinol). Ces composés présentent des propriétés peroxydasiques et peuvent appartenir à de nombreuses familles : les dérivés phénoliques (butylhydroxytoluène et le butyldroxyanisole, esters d'acide gallique), les dérivés stéroïdiens (lazaroides), les dérivés soufrés (N-acétylcystéine), les dérivés de la méthyl xanthine (caféine, allopurinol) et les dérivés hydroxylés (mannitol, dipyrimadol) (Pincemail *et al.*, 1998a ; Odabasoghlu *et al.*, 2004). Le butyl hydroxyanisole (BHA) et le butyl hydroxytoluène (BHT) sont très utilisés comme additifs dans l'industrie alimentaire (Fujisawa *et al.*, 2004). Le BHT est doté d'un caractère hydrophobe, il est plus efficace que le BHA et l'association de ces antioxydants phénoliques est synergique (Helm *et al.*, 1999).

Partie pratique

Matériel
et
méthodes

Matériel et méthodes

1. Echantillonnage

Cinq plantes sont choisies après avoir enquêté auprès des personnes âgées qui connaissent par tradition orale les plantes et leurs actions, les noms vernaculaires, les organes utilisés et leurs modes de préparation. Les plantes ainsi sélectionnées sont : *Globularia alypum*, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*, *Retama sphaerocarpa* et *Rhamnus alaternus*. La collecte des plantes est faite entre les mois de février et avril (2006) dans la région de Souk El Batel (Daïra de Seddouk, Wilaya de Béjaïa), dans des endroits propres et loin de tout impact de pollution (Tableau VII). Le choix des plantes à l'intérieur du site de récolte est effectué en supervision générale, chaque feuille a fait l'objet d'un prélèvement au hasard sur plusieurs arbustes. Les plantes sont identifiées par les membres des laboratoires de Physiologie Végétale et d'Ecologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université A. MIRA de Béjaïa.

Tableau VII : Dates et lieu de récolte des plantes médicinales.

Plantes	Dates de récolte	Lieu de récolte
<i>Globularia alypum</i>	02 /02/2006	Village de Souk El Batel Commune de Seddouk
<i>Myrtus communis</i>	11/02/2006	
<i>Pistacia lentiscus</i>	27/01/2006	
<i>Retama sphaerocarpa</i>	01/04/2006	
<i>Rhamnus alaternus</i>	23/04/2006	

2. Traitement des échantillons

Une fois récoltés et identifiés, les échantillons ont subi une série de traitements pour obtenir des poudres de plantes et ce sont les feuilles qui ont fait l'objet et le matériel de cette étude.

2.1. Séchage et test d'humidité

Les feuilles de plantes sont débarrassées des branches et des particules solides puis sont nettoyées de poussières et autres impuretés pour être séchées dans une étuve ventilée (MEMMERT) à une température de 40 °C (Bhandari et Kawabata, 2004). Pour déterminer la teneur en eau des feuilles, un test d'humidité est effectué. Pour chaque plante, dix échantillons de 1 g sont séchés à 105 ± 1 °C pendant 4 heures (Nergiz et Engez, 2000). En même temps, trois échantillons de 10 g sont séchés dans les mêmes conditions, dans le but de voir s'il y a des variations importantes des teneurs en eau entre les feuilles.

La teneur en eau est déterminée comme suite :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{M_f - M_s}{M_f} * 100$$

Mf : Matière fraîche.

Ms : Matière sèche.

2.2. Broyage et tamisage

Une fois séchées, les feuilles sont réduites en poudre à l'aide d'un broyeur électrique (A11 Basic), puis sont soumises à un tamisage à l'aide d'un tamiseur électrique (RHEINISCHE Str 36) muni d'un ensemble de tamis avec des pores ayant des diamètres allant de 50 à 500 µm. Seules les poudres ayant un diamètre inférieur à 50 µm sont retenues et conservées dans des récipients en verre, fermés hermétiquement et stockés à l'abri de la lumière pour des utilisations ultérieures.

2.3. Extraction

La méthode d'extraction utilisée dans cette étude est celle décrite par Owen et Johns (1999) avec modification. La procédure consiste en une macération des poudres de

plantes dans le méthanol (99 %). La modification dans cette méthode réside dans les rapports poudre/méthanol, 200 mg/500 ml au lieu de 100 mg/700 ml.

Pour chaque plante, 200 mg de poudre sont mis dans une fiole puis sont ajustés avec du méthanol (99 %) jusqu'à 500 ml. Le mélange est porté à l'agitation pendant une semaine à l'aide d'un agitateur magnétique (Raypa AG5), à une température ambiante et à l'abri de la lumière, afin d'éviter les phénomènes d'oxydation. Après 168 heures, les solutions sont filtrées avec du papier filtre puis concentrées sous vide (337 mbar) à l'aide d'un rotavapor (BÜCHI R-200), à une température de 40 °C jusqu'à avoir des volumes d'extraits d'environ 2 ml. Ces derniers sont récupérés dans des cristallisoirs. Le séchage des extraits est complété dans une étuve réglée à 40 °C, jusqu'à l'obtention des poids constants des résidus secs.

Ces extraits sont dissous dans 15 ml de méthanol (99 %) pour donner des solutions mères à des concentrations connues et qui sont ensuite conservées à 4 °C.

Les taux d'extraits obtenus sont quantifiés par la formule ci-dessous :

$$\text{Taux d'extraits (\%)} = \frac{P_1 - P_0}{E} * 100$$

P₀ : Poids du cristallisoir vide (g).

P₁ : Poids du cristallisoir après séchage (g).

E : Poids de la poudre de plante (g).

3. Dosages des polyphénols

3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui se réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). Cette réaction développe une coloration bleue qui est proportionnelle aux taux des composés phénoliques et qui peut être dosée par spectrophotométrie UV – VIS (UV mini 1240, SHIMADZU) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982).

L'estimation de la teneur en composés phénoliques des extraits de plantes est réalisée selon la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965). Pour chaque tube contenant 100 μ l d'extrait méthanolique à une concentration de 1 mg/ml, une quantité de 6 ml d'eau distillée est rajoutée, suivie de 500 μ l du réactif Folin-Ciocalteu (1N). Cinq min après, 1,5 ml de carbonate de sodium à 20 % et 1,9 ml d'eau distillée sont additionnés. Une fois mélangés, les tubes sont mis pendant 2 heures à l'obscurité.

Après balayage spectral, les absorbances sont lues à 760 nm. Les concentrations en composés phénoliques des extraits de plantes sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage, obtenue avec l'acide gallique (annexe 2). Les résultats sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique (EAG) par g d'extrait sec (ES).

3.2. Dosage des polyphénols polaires

La méthode utilisée pour la détermination des polyphénols polaires est celle rapportée par Owen et Johns (1999) avec une légère modification. Un volume de 3 ml d'extrait méthanolique de chaque plante à une concentration de 0,05 mg/ml est soumis à une centrifugation à 3500 tours/min pendant 15 min, puis incubé pendant 24 heures à température ambiante (25 °C). Après incubation, les extraits méthanoliques sont filtrés avec du papier filtre. Un volume de 2,5 ml de chaque extrait est additionné successivement de 1,5 ml de carbonate de sodium (20 %) et de 0,5 ml du réactif Folin-Ciocalteu (2N) avec un intervalle de temps de 3 min. Le mélange est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 90 min. Les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 750 nm après avoir effectué un balayage spectral, entre 400 et 800 nm.

Les teneurs en composés phénoliques polaires sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (annexe 2). Les résultats sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique par g d'extrait sec. La modification dans cette méthode réside dans la centrifugation à 3500 tours/min pendant 15 min avant la lecture pour éviter la turbidité.

3.3. Polyphénols apolaires

La détermination des taux des polyphénols apolaires contenus dans les extraits de plantes se fait par une soustraction des taux de polyphénols polaires de celui des polyphénols totaux.

$$T_{pa} = T_t - T_p$$

T_{pa} : Taux des polyphénols apolaires.

T_t : Taux des polyphénols totaux.

T_p : Taux des polyphénols polaires.

3.4. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes se trouvent dans le matériel végétal sous diverses formes structurales. Ils ont la capacité de chélater les métaux tels que le fer et l'aluminium (Vinson *et al.*, 1995 ; Rice-Evans *et al.*, 1997). Les flavonoïdes ayant des groupements orthodihydroxyles sur les noyaux A ou B ou possédant un groupement hydroxyle libre en position C-3 ou C-5, ou un groupement cétonique C-4 sont capables de donner des complexes, de couleur jaunâtre, en présence de chlorure d'aluminium. Ces derniers peuvent être dosés par spectrophotométrie UV-VIS (Bahorun *et al.*, 1996).

La détermination des taux de flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de plantes est effectuée selon la méthode décrite par Huang *et al.* (2004). Pour 1,5 ml d'une solution d'extrait de plante (0,1 mg/ml), un volume équivalent du trichlorure d'aluminium à 2 %, préparée dans du méthanol, est ajouté. Après 10 minutes, la lecture est effectuée à

430 nm. Les concentrations en flavonoïdes totaux sont déterminées en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine (annexe 2). Les résultats sont exprimés en mg équivalents quercétine (EQ) par g d'extrait sec.

5. Dosage des tanins

Le principe de la méthode repose sur la précipitation des tanins avec la protéine BSA. Les complexes tanins-protéines BSA réagissent avec le chlorure ferrique (FeCl_3), en milieu alcalin et en présence du Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) et du triéthanolamine (TEA), pour former des chélates de couleur violette, dont la formule générale est $\text{Fe}(\text{OR}^{3-})$, où le OR^- représente le polyphénol ionisé (Hagerman et Butler, 1978 ; Pilarski *et al.*, 2006).

La détermination des taux de tanins dans les extraits des feuilles est effectuée selon le protocole décrit par Hagerman et Butler (1978). Dans des tubes à essai, 1 ml d'extrait méthanolique (1 mg/ml) est ajouté à 2 ml d'une solution de BSA (1 mg/ml), préparée dans un tampon acétate (pH 4,9 ; 0,20 M). Le mélange est agité immédiatement et incubé à 4 °C pendant 24 heures. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3000 tours/min pendant 15 min pour obtenir une meilleure précipitation des complexes tanins-BSA. Le précipité est dissout dans 4 ml d'une solution contenant le SDS et le triéthanolamine. La solution obtenue est additionnée de 1 ml de FeCl_3 et est mélangée vigoureusement. Après 15 min d'incubation, l'absorbance est mesurée à 510 nm. Les tanins contenus dans les extraits sont déterminés en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique (annexe 2). Les résultats sont exprimés en mg équivalents d'acide tannique (EAT) par g d'extrait sec.

4. Détermination de l'activité antioxydante

Plusieurs tests évaluant l'activité antioxydante sont rapportés par la littérature. Les tests mesurant l'aptitude à inhiber l'oxydation d'un substrat sous des conditions accélérées et les tests mesurant l'effet « scavenger » sur les radicaux libres sont la base de plusieurs méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante. Les tests utilisés sont le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique, le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir réducteur (Javanmardi *et al.*, 2003 ; Roginsky et Lissi, 2005).

4.1. Pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique

La formation des radicaux libres et l'apparition des produits primaires ou secondaires de l'oxydation sont les marqueurs les plus appropriés pour suivre les phénomènes d'oxydation. L'inhibition de l'oxydation des substrats lipidiques est à la base de plusieurs méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante. Ces méthodes se basent sur la quantification des produits primaires ou secondaires de l'oxydation des lipides. Le test utilisé mesure le taux de peroxydes formés lors de l'oxydation accélérée de l'acide linoléique sous l'effet de la température (Pyo *et al.*, 2004).

Les peroxydes réagissent avec le chlorure ferreux (FeCl_2) pour former des ions ferriques qui développent une coloration rouge suite à l'addition de thiocyanate d'ammonium et la formation des ferrothiocyanates. L'absorbance est mesurée à 500 nm (Duan *et al.*, 2007).

Le test évaluant le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique utilisé est celui décrit par Yen et Hsieh (1998). Dans des tubes à essai, 0,5 ml d'extrait de plante sont mélangés avec 2,5 ml d'acide linoléique (2,51 %) préparé dans l'éthanol (99,5 %) et 2 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 7), ensuite, les tubes sont incubés à l'obscurité à 37 °C. Les solutions du standard BHA et du contrôle sont préparées de la même manière que les échantillons de plantes, en remplaçant les volumes des extraits par le méthanol (99 %) dans le contrôle et par une solution de BHA dans le standard.

Chaque 24 heures, un volume de 100 μl est transféré dans un tube à essai. Un volume de 4,7 ml d'éthanol (75 %) et 100 μl de thiocyanate d'ammonium (30 %) sont ajoutés au tube successivement. Une solution de chlorure ferreux (0,02 M) est préparée à part dans l'acide chlorhydrique à 3,5 %. Trois minutes après l'ajout de 100 μl du chlorure ferreux (FeCl_2), l'absorbance est mesurée à 500 nm. Cette procédure est répétée jusqu'à ce que l'absorbance du contrôle atteigne la valeur maximale. La modification dans cette méthode réside dans la préparation de la solution de l'acide linoléique avec l'éthanol au lieu du tampon phosphate contenant un émulsifiant (Tween 20).

Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique (% $I_{A.linoléique}$) est calculé comme suit :

$$\%I_{A.linoléique} = \left[1 - \left(Abs_{éch} / Abs_{contr} \right) \right] \times 100$$

où : **Abs_{éch}** : Absorbance de l'échantillon.

Abs_{contr} : Absorbance du contrôle.

4.2. Pouvoir antiradicalaire

Le pouvoir antiradicalaire ou l'effet « scavenger » sur le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est une méthode indirecte qui est initialement utilisée pour déterminer les donneurs de protons dans les composés naturels. Plus tard, cette méthode est utilisée pour la détermination du potentiel antioxydant des composés phénoliques (Prakash, 2001).

La molécule DPPH est un radical stable grâce à la délocalisation de son électron célibataire autour de la molécule empêchant ainsi sa polymérisation, ce qui est le cas de la plupart des radicaux. La délocalisation de l'électron est responsable d'un développement d'une couleur violette foncée. La présence d'un antioxydant dans le milieu engendre la libération d'un proton réduisant ainsi le radical DPPH'. Suite à cette réaction, la couleur violette se dissipe laissant apparaître une couleur jaune pâle du groupe picryl. Le suivi de la décoloration est réalisé par spectrophotométrie à 517 nm (Gülcín *et al.*, 2003 ; Molyneux, 2004 ; Roginsky et Lissi, 2005).

Le pouvoir antiradicalaire est mesuré selon la méthode décrite par Katalinic *et al.* (2006). Pour 1 ml d'extrait méthanolique de plante, un volume de 2 ml d'une solution de DPPH ($6 \cdot 10^{-5}$ M), qui doit être fraîchement préparée dans le méthanol, est ajouté. En parallèle, un contrôle contenant les mêmes volumes d'une solution de DPPH et de méthanol remplaçant l'extrait est préparé. La lecture des absorbances à 517 nm est réalisée après 30 min d'incubation. La modification dans cette méthode réside dans la durée d'incubation des échantillons, 30 min au lieu de 16 min.

Les pourcentages de réduction des radicaux DPPH[·] sont calculés par la formule ci-dessous. De même, différentes concentrations d'extraits de plantes sont préparées afin de voir leurs effets sur le pouvoir antiradicalaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du radical DPPH[·].

$$\% \text{ DPPH}^{\cdot} \text{ réduit} = \left[(Abs_{\text{contr}} - Abs_{\text{éch}}) / Abs_{\text{contr}} \right] \times 100$$

où : **Abs_{contr}** : Absorbance du contrôle.

Abs_{éch} : Absorbance de l'échantillon.

Pour pouvoir évaluer les antioxydants contenus dans les plantes, des courbes d'étalonnages sont réalisées avec l'acide gallique et la vitamine C (annexe 3). Les quantités d'antioxydants contenues dans les extraits de plantes sont exprimées en mg, en équivalents d'acide gallique (Ax EAG) et de vitamine C (Ax E vitC) par g d'extrait sec.

4.3. Pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur repose sur la réduction du chlorure ferrique (FeCl₃) en chlorure ferreux (FeCl₂) en présence d'un agent chromogène, le ferricyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] et en milieu acidifié par l'acide trichloroacétique. L'absorbance, lue à 700 nm, est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique testé (Odabasoglu *et al.*, 2004 ; Gülçin *et al.*, 2005) .

Le pouvoir réducteur des extraits de plantes est déterminé selon la méthode décrite par Gülçin *et al.* (2003). Un volume de 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) est ajouté à 1 ml d'extrait de plante, suivi de 2,5 ml de ferricyanure de potassium (1 %) et après agitation, le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 min. Un volume de 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10 % sont additionnés au mélange avant d'être centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 min. A partir de ces tubes, 2,5 ml sont prélevés, puis sont rajoutés de 2,5 ml d'eau distillée et de 0.5 ml de chlorure ferrique (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

Des courbes d'étalonnages sont réalisées avec l'acide gallique et la quercétine (annexe 3) afin d'évaluer les quantités d'antioxydants ayant un pouvoir réducteur. Les quantités d'antioxydants contenues dans les extraits de plantes sont exprimées en mg, en équivalents d'acide gallique (Ax EAG) et de quercétine (Ax EQ) par g d'extrait sec.

5. Activités biologiques

5.1. Etude des interactions polyphénols / protéines

Les principales propriétés des tanins sont liées à leurs aptitudes à se combiner aux protéines, ce qui explique aussi bien leur capacité à inhiber les enzymes en se combinant à leur fraction protéique et leur pouvoir de faire précipiter les glycoprotéines salivaires (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Naurato *et al.*, 1999 ; Wroblewski *et al.*, 2001). Pour une meilleure compréhension de cette propriété, une étude interactionnelle entre les polyphénols et la protéine BSA se basant sur l'effet de la concentration des extraits et de la force ionique est faite. Comme cité précédemment, la protéine utilisée est la BSA, c'est une protéine de référence dont la masse moléculaire est de 66 kDa. Elle est présente naturellement dans le sérum bovin et contient 583 acides aminés. Sa séquence présente une similitude à 80 % avec la protéine HSA (Human Serum Albumin) (Freidli, 1996 ; Gieseler, 2004).

5.1.1. Effet de la concentration des extraits

L'effet de la concentration des extraits sur la formation des complexes polyphénols/protéines BSA est déterminé par l'intensité du trouble formé suite à l'interaction des polyphénols avec la BSA. Le protocole expérimental est inspiré de la méthode décrite par Kawamoto et Nakatsubu (1997). L'évolution de la turbidité en fonction de la concentration des extraits est suivie par spectrophotométrie, en mesurant la densité optique de la solution à une longueur d'onde maximale (Kawamoto et Nakatsubu, 1997 ; Freitas *et al.*, 2003).

Des concentrations allant de 0,5 à 2,5 mg/ml sont préparées pour chaque extrait de plante. D'autre part, une solution de BSA est préparée dans un tampon phosphate (pH 6,9 ; 0,64 mM) à une concentration de 1 mg/ml. Pour chaque solution d'extrait (à une concentration connue), un volume équivalent d'une solution de BSA est ajouté. Le mélange est incubé à 37 °C pendant une heure. L'absorbance maximale des complexes formés est déterminée à la longueur d'onde fixée $\lambda_{420 \text{ nm}}$, suite aux résultats du balayage spectral effectué entre 400 et 900 nm.

5.1.2. Effet de la force ionique

La formation des complexes polyphénols-protéines dépend de nombreux facteurs qui sont liés soit au complexe, soit au milieu réactionnel. La force ionique est l'un des paramètres externes impliqués dans cette interaction (Freitas *et al.*, 2003 ; Carvalho *et al.*, 2004). Pour étudier ce phénomène, la force ionique est augmentée dans le milieu par l'ajout d'une solution de NaCl de telle sorte qu'elle n'influe pas sur la solubilité du complexe tanin-protéine. Le protocole expérimental est extrait de la méthode décrite par Freitas *et al.* (2003). Le suivi analytique de la turbidité formée est réalisé par la mesure de la densité optique à une longueur d'onde maximale.

Dans des tubes à essai, 1 ml d'extrait méthanolique de chaque plante, à une concentration de 0,5 mg/ml, est ajouté à 1 ml d'une solution de BSA. Cette dernière est préparée dans un tampon phosphate (0,64 mM, pH 6,9) à une concentration de 1mg/ml. Des solutions de NaCl à des concentrations allant de 0,0125 à 0,1 M sont préparées en parallèle.

Pour chaque concentration de NaCl, un volume de 1 ml est ajouté à un tube contenant un mélange d'extrait méthanolique et de solution de BSA préparée au préalable. Une fois agités, les tubes sont incubés à 37 °C pendant une heure. La densité optique du trouble formé est mesurée à 420 nm.

6. Etude statistique

Pour pouvoir comparer la significativité statistique entre les résultats des échantillons de plantes, l'analyse de la variance (ANOVA), le test LSD (Least Significant Differences) et le test t sont effectués à l'aide d'un logiciel STATISTICA 5.5. Les moyennes et les écarts types sont calculés à partir de trois essais avec Excel de Microsoft Office.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Traitement des échantillons

1.1. Humidité et séchage des feuilles

Les résultats du test d'humidité pour les différents échantillons sont représentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Résultats du test d'humidité des feuilles de plantes.

	Teneurs en eau des échantillons (%)*	
	1 g	10 g
<i>Globularia alypum</i>	50,54 ± 2,93 ^b	49,36 ± 0,74 ^b
<i>Myrtus communis</i>	51,17 ± 4,05 ^{ab}	51,49 ± 2 ^{ab}
<i>Pistacia lentiscus</i>	52,87 ± 9,14 ^{ab}	53,36 ± 5,85 ^{ab}
<i>Retama sphaerocarpa</i>	49,47 ± 0,94 ^b	48,34 ± 1,71 ^b
<i>Rhamnus alaternus</i>	55,08 ± 1,45 ^a	54,72 ± 0,82 ^a

* les valeurs portant les mêmes lettres dans chaque colonne ne présentent aucune différence significative ($p < 0.05$)

Selon les résultats obtenus, la teneur en eau varie en moyenne de 49 à 55 %, ce qui indique la richesse hydrique des plantes étudiées. *Rhamnus alaternus* possède la teneur la plus élevée en eau avec 55,08 ± 1,45 % et diffère significativement de *Globularia alypum* et de *Retama sphaerocarpa* qui sont moins riches en eau. La variation de l'humidité entre les échantillons de 1 g et 10 g ne présente aucune différence significative ($p < 0.05$).

Les feuilles de plantes sont séchées à une température moyenne de 40 °C afin d'assurer une meilleure élimination d'eau, tout en préservant la composition des cellules en polyphénols et sans provoquer leur dégradation ni leur volatilisation.

Plusieurs raisons expliquent le recours à l'élimination d'eau. Selon Ribéreau-Gayon (1968), l'eau représente une source de dégradation des polyphénols par le phénomène d'oxydation. De ce fait, sa présence est un élément gênant pour le calcul du rendement d'extraction.

Par ailleurs, les cellules végétales sont dotées d'un équipement enzymatique varié, les polyphénols-oxydases et les glycosidases font parties des enzymes qui peuvent provoquer des modifications sur les composés phénoliques (Tomás-Barberán et Espín, 2001). Le séchage des feuilles semble entraîner l'inhibition de ces enzymes et permet aussi de conserver les poudres de plantes pendant longtemps sans modifications importantes (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Owen et Johns, 1999).

1.2. Extraction

Après avoir séché et broyé les feuilles de plantes, seules les poudres ayant un diamètre inférieur à 50 μm sont retenues et ceci a pour but d'optimiser l'extraction (Cacace et Mazza, 2002). Selon certains auteurs, plus les particules sont petites, plus la surface de contact avec le solvant augmente et plus le rendement d'extraction est élevé (Escribano-Bayon et Santos-Buelga, 2003 ; Mau *et al.*, 2005).

L'efficacité de l'extraction dépend non seulement de la méthode d'extraction utilisée mais aussi du solvant d'extraction (Choi *et al.*, 2002 ; Escribano-Bayon et Santos-Buelga, 2003 ; Lapornik *et al.*, 2005). La méthode d'extraction utilisée est une macération couplée à une agitation continue pendant une semaine en vue de maintenir les particules solides en suspension dans le solvant d'extraction et de faciliter la diffusion du soluté.

Plusieurs solvants sont utilisés pour l'extraction des composés phénoliques (méthanol, éthanol, acétone, etc.) (Cowan, 1999). Le solvant d'extraction utilisé est le méthanol. Ce dernier extrait le maximum de composés phénoliques et possède l'avantage d'être facilement éliminé sous vide. En outre, il a la capacité de dissoudre les composés liposolubles et la plupart des composés hydrophiles (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Liégeois *et al.*, 2000 ; Odabasoglu *et al.*, 2004). Huang *et al.* (2004) ont démontré que le méthanol est le solvant qui extrait le plus de composés phénoliques par rapport à l'eau et l'éthanol.

Les rendements d'extraction obtenus, après concentration des extraits méthanoliques de plantes sont donnés en pourcentage, et les solutions mères obtenues en mg/ml dans le tableau IX.

Tableau IX : Rendements d'extraction et concentrations des solutions mères.

	<i>P. lentiscus</i>	<i>G. alypum</i>	<i>R. alaternus</i>	<i>R. sphaerocarpa</i>	<i>M. communis</i>
Rendements (%)	52.61	75.66	70.90	89.68	52.68
Concentrations (mg/ml)	8.80	13.00	10.93	16.93	9.66

Les rendements d'extraction obtenus dépassent les 50 % pour toutes les plantes étudiées. Ces rendements élevés peuvent être dus à la solubilité de la plupart des composés dans le méthanol (Mau *et al.*, 2005). Les plantes peuvent être réparties en trois groupes : le premier groupe représente *Retama sphaerocarpa* qui se singularise par la teneur la plus élevée (89 %) ; le deuxième regroupe *Globularia alypum* (75%) et *Rhamnus alaternus* (70 %) et le troisième groupe comprend *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* avec un taux de 52 %.

Ces variations des rendements d'extraction peuvent être attribuées à la différence de solubilité des composés phénoliques dans le solvant d'extraction, à leur degré de polymérisation ou à leur implication dans d'autres structures moléculaires formant ainsi des complexes insolubles (Cacace et Mazza, 2002). En utilisant l'éthanol et/ou l'eau, comme solvant d'extraction, plusieurs chercheurs ont évalué les rendements d'extractions de *M. communis*, *P. lentiscus* et des plantes appartenant à la même famille de *R. sphaerocarpa*. Les rendements varient de 0,81 à 16,59 %, résultats très faibles comparés à ceux obtenus pour les cinq plantes étudiées. Ces différences de rendements peuvent être attribuées non seulement au solvant d'extraction mais aussi à la composition chimique qui diffère d'une plante à une autre et même au sein de la même espèce, aux variations des conditions climatiques, des facteurs génétiques des plantes, de la saison de la collecte et de l'âge des feuilles (Fioretto *et al.*, 2000 ; Vivot *et al.*, 2001 ; Kordali *et al.*, 2003 ; Kivçak et Akay, 2005).

2. Dosages des polyphénols

2.1. Composés phénoliques totaux

Les résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits de plantes sont mentionnés dans le tableau X.

Tableau X : Résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits de plantes.

Polyphénols totaux*	
Plantes	Teneurs en mg EAG/g d'extrait sec
<i>Pistacia lentiscus</i>	121,24 ± 3,03 ^d
<i>Globularia alypum</i>	248,23 ± 14,93 ^b
<i>Rhamnus alaternus</i>	165,08 ± 14,40 ^c
<i>Retama sphaerocarpa</i>	138,98 ± 7,21 ^d
<i>Myrtus communis</i>	325,45 ± 3,37 ^a

* les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0.001$)

Les teneurs en polyphénols totaux varient en moyenne de 121,24 ± 3,03 à 325,45 ± 3,37 mg d'EAG/ g d'extrait sec. Les feuilles de *Myrtus communis* sont très riches en composés phénoliques avec la teneur la plus élevée 325,45 ± 3,37 mg d'EAG/g d'extrait sec, suivies des feuilles de *Globularia alypum* avec un taux de 248,23 ± 14,93 mg d'EAG/g d'extrait sec. Ceci est en accord avec les résultats de Djeridane *et al.* (2006) qui ont démontré aussi que la globulaire est riche en composés phénoliques. *Pistacia lentiscus* et *Retama sphaerocarpa* ne présentent aucune différence significative en terme de teneur en polyphénols totaux mais présentent presque la moitié par rapport à *Myrtus communis* et *Globularia alypum*.

Cependant, Stocker *et al.* (2004), en utilisant la même méthode de dosage, ont démontré que *P. lentiscus* est plus riche en composés phénoliques par rapport à *M. communis* et *R. alaternus*. Pour les cinq plantes étudiées, les résultats obtenus sont très élevés comparés à ceux trouvés par Wong *et al.* (2006), en travaillant sur les plantes médicinales chinoises (1,39 ± 0,05 à 50,8 ± 1,38 mg EAG/g ES), bien qu'ils aient utilisé les mêmes méthodes d'extractions et de dosage.

La variation des teneurs en polyphénols peut être due au standard utilisé ou à la différence du matériel végétal qui diffère par la composition chimique. La diversité structurale des composés phénoliques conduit à la variabilité des propriétés physico-chimiques, ce qui rend impossible une représentation unique et générale d'une méthode qui permet le dosage de ces composés phénoliques (Rhodes, 1998).

Selon Katalinic *et al.* (2006), la composition des feuilles en polyphénols est très variable et ces composés ont des réponses différentes vis-à-vis de la méthode de dosage utilisée par Singleton et Rossi (1965).

2.2. Polyphénols polaires et apolaires

Les teneurs moyennes en polyphénols polaires et apolaires, mentionnées dans le tableau XI, varient de $20,35 \pm 1,99$ à $78,76 \pm 3,33$ et de $100,88 \pm 1,42$ à $246,69 \pm 1,63$, respectivement.

Tableau XI : Résultats du dosage des polyphénols polaires et apolaires

	Polyphénols polaires mg EAG/g d'extrait sec	Polyphénols apolaires mg EAG/g d'extrait sec
<i>P. lentiscus</i>	$20,35 \pm 1,99^d$	$100,88 \pm 1,42^d$
<i>G. alypum</i>	$26,94 \pm 1,88^c$	$221,29 \pm 14,41^b$
<i>R. alaternus</i>	$30,05 \pm 1,24^c$	$135,02 \pm 13,73^c$
<i>R. sphaerocarpa</i>	$36,23 \pm 1,74^b$	$102,74 \pm 6,44^d$
<i>M. communis</i>	$78,76 \pm 3,33^a$	$246,69 \pm 1,63^a$

*Dans chaque colonne, les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives ($p < 0.001$).

Les polyphénols apolaires représentent plus de 73 % par rapport aux polyphénols totaux pour les cinq plantes étudiées alors que les teneurs en polyphénols polaires sont très faibles. Ces résultats mènent à dire que la plupart des composés extraits des feuilles de plantes sont de nature hydrophobe. Plusieurs études ont démontré la richesse des feuilles de *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* en composés apolaires et en huiles essentielles (Mendes *et al.*, 2001 ; Cakir, 2004 ; Ciccarelli *et al.*, 2005).

Dans leur étude sur l'inhibition de l'activité de la xanthine oxydase, Owen et Johns (1999) ont démontré que la plante *Melilotus alba* appartenant à la même famille de *R. sphaerocarpa* possède un taux de polyphénols apolaires supérieur aux polyphénols polaires.

L'analyse de la variance a révélé que les teneurs en polyphénols polaires de *G. alypum* et *R. alaternus* ne présentent aucune différence significative alors que leurs teneurs en polyphénols apolaires sont très hautement significatives ($p < 0.001$). Les faibles teneurs en polyphénols polaires peuvent être attribuées aux composés interférents lors du dosage des polyphénols polaires. Les extraits n'ont pas subi un lavage avec l'éther de pétrole ou l'hexane. Ces derniers permettent d'éliminer beaucoup de substances telles que les pigments (chlorophylles, caroténoïdes) et plusieurs molécules solubles dans la phase organique (Karou *et al.*, 2005).

Selon Hayder *et al.* (2004), l'utilisation d'un seul solvant d'extraction (méthanol) conduit à un extrait moins raffiné. La présence de composés polymérisés de masse moléculaire élevée et qui tendent à être moins solubles dans le méthanol peut être aussi impliquée dans ces résultats élevés.

2.3. Flavonoïdes totaux

Les résultats du dosage des flavonoïdes totaux sont représentés dans le tableau XII.

Tableau XII : Résultats du dosage des flavonoïdes totaux des extraits de plantes

Flavonoïdes totaux*	
Plantes	Teneurs en mg EQ/g d'extrait sec
<i>Pistacia lentiscus</i>	16,10 ± 1,76 ^c
<i>Globularia alypum</i>	44,52 ± 0,08 ^a
<i>Rhamnus alaternus</i>	35,57 ± 0,30 ^b
<i>Retama sphaerocarpa</i>	11,47 ± 0,54 ^d
<i>Myrtus communis</i>	16,66 ± 0,24 ^c

* Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative ($p < 0.05$)

Globularia alypum présente la teneur moyenne la plus élevée de $44,52 \pm 0,08$ mg d'équivalents quercétine par gramme d'extrait sec. Elle est suivie de *Rhamnus alaternus* avec $35,57 \pm 0,30$ mg d'EQ/g d'extrait sec, teneur aussi considérable comparée à *Retama sphaerocarpa* qui a le taux le plus faible, avec $11,47 \pm 0,54$ mg d'EQ/g d'extrait sec. En terme de significativité statistique, la différence des teneurs en flavonoïdes de ces plantes est très hautement significative.

Dans leur étude sur l'effet antioxydant des extraits de *Globularia alypum*, Es-Safi *et al.* (2006) ont identifié des flavonoïdes, des iridoïdes et des phénylétanoïdes. Dans d'autres études, les principaux constituants phénoliques de la globulaire sont les acides phénoliques et les flavonoïdes (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1986 ; Valnet, 2003). Selon Stocker *et al.* (2004), *R. alaternus* est très riche en anthraquinones et en flavonoles tels que la quercétine et le kaempférol alors que la lutéoline est très abondante chez *P. lentiscus*. Malgré la faible teneur en flavonoïdes de *Retama sphaerocarpa*, López Lázaro *et al.* (1998) et Martin-Cordero *et al.* (1999) ont pu isoler de nouveaux flavonols glycosylés.

Comparés aux polyphénols totaux, *Myrtus communis* et *Pistacia lentiscus* ne présentent en flavonoïdes que 5 % et 13 %, respectivement. Ceci peut être expliqué par le fait que la majorité des polyphénols dosés sont des tanins. Cakir (2004) a rapporté que les feuilles de *Myrtus communis* sont riches en tanins et contiennent aussi des flavonoïdes tels que la quercétine, la catéchine et le myricétine.

En général, pour les cinq plantes étudiées, les teneurs moyennes en flavonoïdes sont faibles par rapport aux polyphénols totaux, ceci peut être aussi attribué au solvant utilisé, car le solvant qui extrait le plus de flavonoïdes est l'acétone (Hayder *et al.*, 2004).

2.4. Tanins

Dans cette étude, la méthode utilisée pour le dosage des tanins repose sur leur propriété à former des combinaisons avec les protéines. Selon Hagerman et Butler (1978), cette méthode est rapide, reproductible et peut être utilisée aussi bien pour le dosage des tanins hydrolysables que les tanins condensés.

Le tableau XIII montre les différentes teneurs en tanins qui sont exprimées en mg d'équivalents d'acide tannique par gramme d'extrait sec.

Tableau XIII : Résultats du dosage des tanins des extraits de plantes.

Tanins*	
Plantes	Teneurs en mg EAT/g d'extrait sec
<i>Pistacia lentiscus</i>	140,17 ± 9,33 ^b
<i>Globularia alypum</i>	75,94 ± 0,97 ^c
<i>Rhamnus alaternus</i>	47,84 ± 2,73 ^d
<i>Retama sphaerocarpa</i>	27,13 ± 1,46 ^e
<i>Myrtus communis</i>	567,39 ± 12,12 ^a

* Les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives ($p < 0.05$)

Les résultats du dosage des tanins ont révélé que les plantes sont très riches en tanins, cas observé par Pilarski *et al.* (2006) en dosant les extraits éthanolique et aqueux d'une plante médicinale *Uncaria Tomentosa*. Les valeurs qu'ils ont trouvés sont très élevées comparées aux résultats cités dans la littérature. Selon ces auteurs, ces valeurs élevées sont dues à la différence du matériel végétal qui diffère par la composition chimique en polyphénols.

La variation des teneurs en tanins entre les plantes est très hautement significative. *Myrtus communis* se singularise par la teneur la plus élevée qui est de 567,39 ± 12,12 mg d'EAT/g d'ES, suivie de *Pistacia lentiscus* qui contient aussi un taux important 140,17 ± 9,33 mg d'EAT/g d'ES.

Le taux obtenu pour *Pistacia lentiscus* est en accord avec le travail de Romani *et al.* (2002) qui ont démontré que les feuilles de cette plante sont riches en tanins.

Les différences entre les résultats obtenus pour *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus* et ceux de *Globularia alypum* et *Retama sphaerocarpa* donnent une meilleure assise à la discussion.

Les taux élevés en tanins peuvent être expliqués soit par la polymérisation des tanins ou la présence de composés à faibles masses moléculaires. Ces deux facteurs affectent le dosage des tanins de différentes façons.

Il a été démontré que l'oxydation (enzymatique ou non) augmente les réactions de polymérisation des catéchines et des polymères de pro-cyanidines, ce qui donne des particules suffisamment grosses pour causer la précipitation (Araya-Farias, 1999). Dans une autre étude, Hagerman et Butler (1978) ont démontré que la catéchine qui réagit avec le chlorure de fer en milieu alcalin est incapable de faire précipiter les protéines. Cependant, l'ajout de 2 mg de catéchine à 1 mg de tanins de sorgho, partiellement purifiés, conduit à une augmentation considérable de 10 % des tanins précipités. Ce résultat est dû probablement à la liaison non spécifique des catéchines aux complexes tanins-protéines.

Les teneurs moyennes en tanins de *Rhamnus alaternus* et *Retama sphaerocarpa* sont faibles par rapport aux autres plantes. Ces faibles teneurs peuvent être dues à la composition chimique de ces plantes ou à la présence de composés phénoliques ayant une masse moléculaire inférieure à 500 Da et qui sont incapables de faire précipiter les protéines (Lesschaeve et Noble, 2005).

La présence de glycosides affecte aussi le dosage des tanins. Les polysaccharides sont des inhibiteurs compétitifs des tanins sur les sites de liaison de la protéine (figure 11). Ces composés peuvent être des pectines, des xanthanes et des carraghénanes (Frietas *et al.*, 2003 ; Mateus *et al.*, 2004).

Ce phénomène résulte de la capacité des polysaccharides à former des complexes réversibles entre les protéines/polyphénols/glycosides, qui augmentent la solubilité dans le milieu aqueux. En plus, certains polysaccharides peuvent développer une structure dans le milieu formant des poches hydrophobes capables d'encapsuler et de complexer les polyphénols, tandis que d'autres s'adsorbent sur les composés phénoliques.

Cette adsorption peut être due à des interactions hydrophobes ou à des liaisons hydrogènes partagées entre les atomes d'oxygène des glycosides et les groupements hydroxyles des composés phénoliques (Friebas *et al.*, 2003).

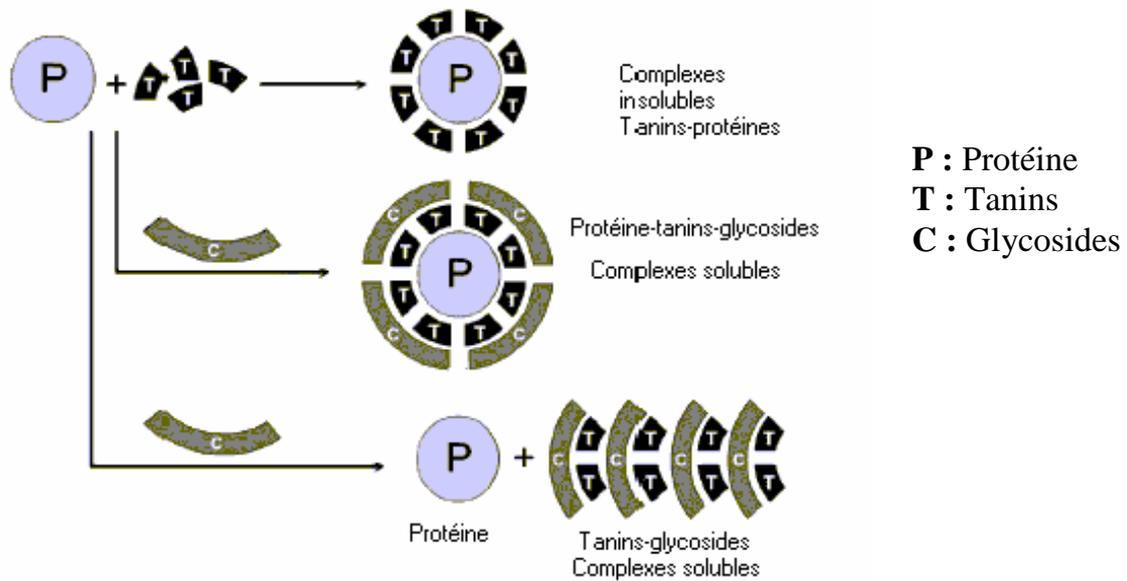


Figure 11 : Mode d'inhibition de la formation des complexes tanins-protéines par les glycosides (Mateus *et al.*, 2004).

Le choix des paramètres du mode opératoire n'est pas fait au hasard, le pH et la température sont les principaux facteurs. La dissolution de la BSA dans un tampon acétate à un pH de 4.9 permet une meilleure précipitation de cette protéine car en se rapprochant de son point isoélectrique (BSA pHi = 4,9), sa solubilité diminue. La solubilité des complexes tanins-protéines formés diminue au fur et à mesure que le pH diminue tandis que leur précipitation augmente et atteint le maximum à l'approche du point isoélectrique de la protéine (Kawamoto et Nakatsubu, 1997 ; Naczka *et al.*, 2001 ; Siebert *et al.*, 2003 ; Naczka *et al.*, 2006).

D'après Naurato *et al.* (1999), les complexes tanins-protéines se forment aussi rapidement qu'ils s'approchent des points isoélectriques des protéines. Dans une autre étude, la BSA à pH 5 devient stable et montre une grande capacité de lier les tanins condensés (Friebas *et al.*, 2003 ; Carvalho *et al.*, 2004).

Cependant, à des pH élevés, les tanins perdent la capacité de lier les protéines suite à l'ionisation de leurs groupements phénols d'où leur incapacité d'établir des liaisons hydrogènes avec les protéines (Hagerman et Butler, 1978).

L'incubation du mélange (extrait méthanolique-BSA) à 4 °C augmente le pouvoir de précipitation des complexes tanins-BSA (Kawamoto et Nakatsubu, 1997). Les complexes obtenus sont dissous dans une solution contenant le SDS et le triéthanolamine. Le SDS dissout ces complexes mais aussi a la capacité de dénaturer les protéines et de se lier dans leurs régions hydrophobes, tout en leur conférant des charges négatives. Par conséquent, il y a la nécessité d'utiliser le triéthanolamine qui augmente le pH et le maintient ainsi élevé. Le chlorure de fer réagit avec les composés phénoliques pour donner des complexes violets qui sont dosés à 510 nm (Hagerman et Butler, 1978). La stabilité de la solution ferrique est maintenue par l'ajout d'acide chlorhydrique qui empêche la formation d'hydroxyde de fer (Ribéreau-Gayon, 1968).

3. Détermination de l'activité antioxydante

3.1. Pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique

Les peroxydes formés, durant l'oxydation de l'acide linoléique, oxydent le Fe^{+2} en Fe^{+3} . Ce dernier forme un complexe avec le thiocyanate (SCN^-) dont l'absorbance maximale est à 500 nm. Ainsi, une absorbance élevée indique une formation intense de peroxydes et par opposition, une faible absorbance signifie une activité antioxydante élevée (Mohd Zin *et al.*, 2002 ; Gülçin *et al.*, 2003 ; Gülçin *et al.*, 2005).

Le choix de l'acide linoléique n'est pas fait au hasard, c'est le substrat de l'oxydation le plus utilisé vu son oxydation représentative de la peroxydation lipidique dans le système biologique (Roginsky et Lissi, 2005).

Le suivi de la peroxydation de l'acide linoléique dans une émulsion contenant l'extrait de plante, pendant cinq jours d'incubation, a donné les résultats montrés dans la figure 12.

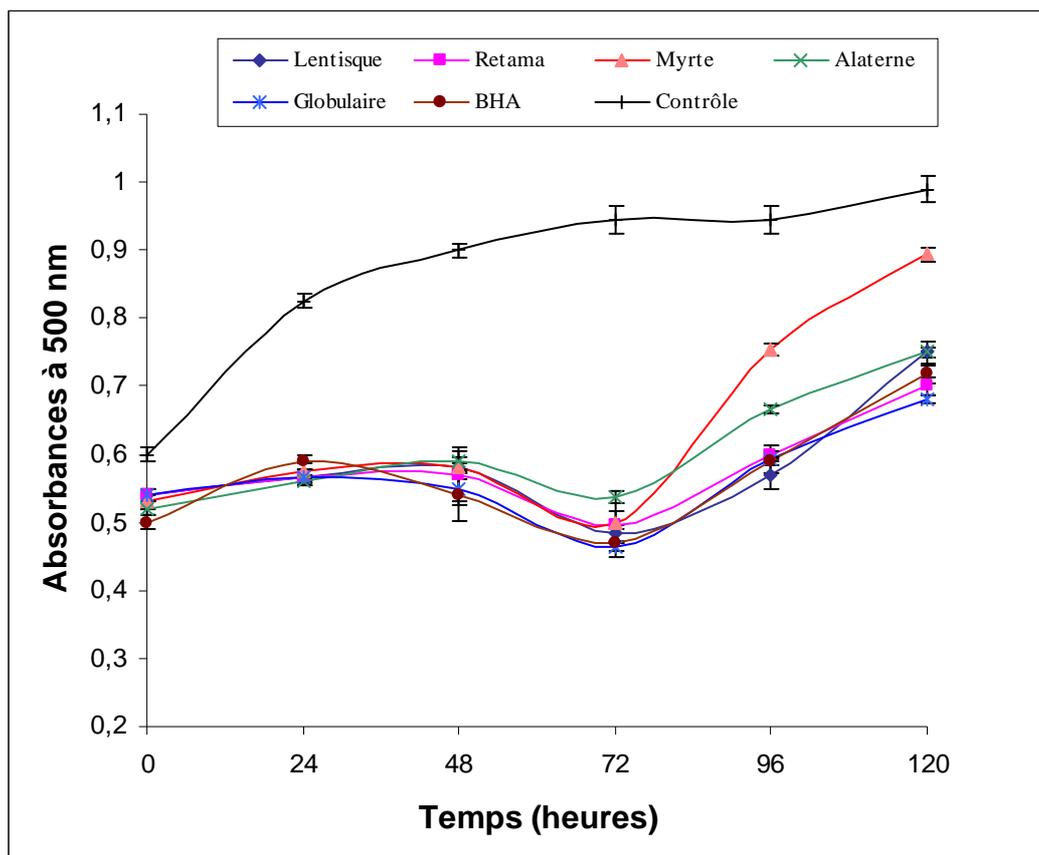


Figure 12 : Pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par les extraits de plantes. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ($n = 3$).

Les courbes obtenues pour les cinq plantes montrent qu'au bout de 72 heures, l'absorbance n'as pas augmenté. Cependant, l'absorbance du contrôle augmente chaque jour suite à la formation continue des complexes ferri-thiocyanates. Ce résultat mène à dire que la peroxydation de l'acide linoléique est inhibée par les extraits de plantes. Ces derniers possèdent des molécules dotées d'un pouvoir antioxydant et exercent un effet inhibiteur comparable à celui du BHA. La diminution de l'absorbance entre 48 et 72 h d'incubation traduit l'augmentation du potentiel inhibiteur de la peroxydation lipidique. Ce résultat peut être expliqué par la libération, dans le milieu, de molécules dotées d'un pouvoir antioxydant et qui ont inhibé l'oxydation de l'acide linoléique.

Les composés phénoliques et principalement les flavonoïdes glycosylés subissent une hydrolyse en milieu acide et sous l'effet des températures élevées, conduisant à la libération des groupements hydroxyles dans le milieu (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Toor et Savage, 2006).

En outre, plusieurs études ont démontré que les composés phénoliques inhibent la peroxydation des lipides. Cette propriété est attribuée à leur capacité à chélater les ions de fer à travers la structure *ortho*-dihydroxy-phénolique et à leur pouvoir d'agir comme donneurs d'hydrogène en piégeant les radicaux lipidiques alkoxyles ou peroxyles (Salah *et al.*, 1995 ; Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Kähkönen *et al.*, 1999 ; Oboh, 2005).

Les acides phénoliques inhibent l'oxydation de l'acide linoléique en cédant des atomes d'hydrogène qui empêchent la formation des diènes conjugués (Rice-Evans *et al.*, 1996) ou en chélatant les ions de fer qui catalysent la peroxydation des lipides (Al-Mamary *et al.*, 2002). Les flavonoïdes sont aussi impliqués dans ce phénomène, ils chélatent les métaux et préviennent ainsi l'initiation de la peroxydation lipidique (Vinson *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 2004). Selon Salah *et al.* (1995), la quercétine réduit les radicaux peroxyles et inhibe la peroxydation lipidique.

A partir du troisième jour, les absorbances des échantillons augmentent significativement ($p < 0.01$) au fur et à mesure que les complexes ferrothiocyanate se forment davantage dans le milieu, jusqu'au cinquième jour d'incubation où l'absorbance du contrôle atteint le maximum. Ce résultat peut être expliqué par la consommation des antioxydants apportés par l'extrait durant trois jours d'incubation et à partir du moment où leurs concentrations ne sont pas suffisantes pour exercer un effet inhibiteur, l'absorbance a augmenté suite à l'oxydation de l'acide linoléique. Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique est calculé pour le troisième jour d'incubation où l'inhibition de la peroxydation est maximale. Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 13.

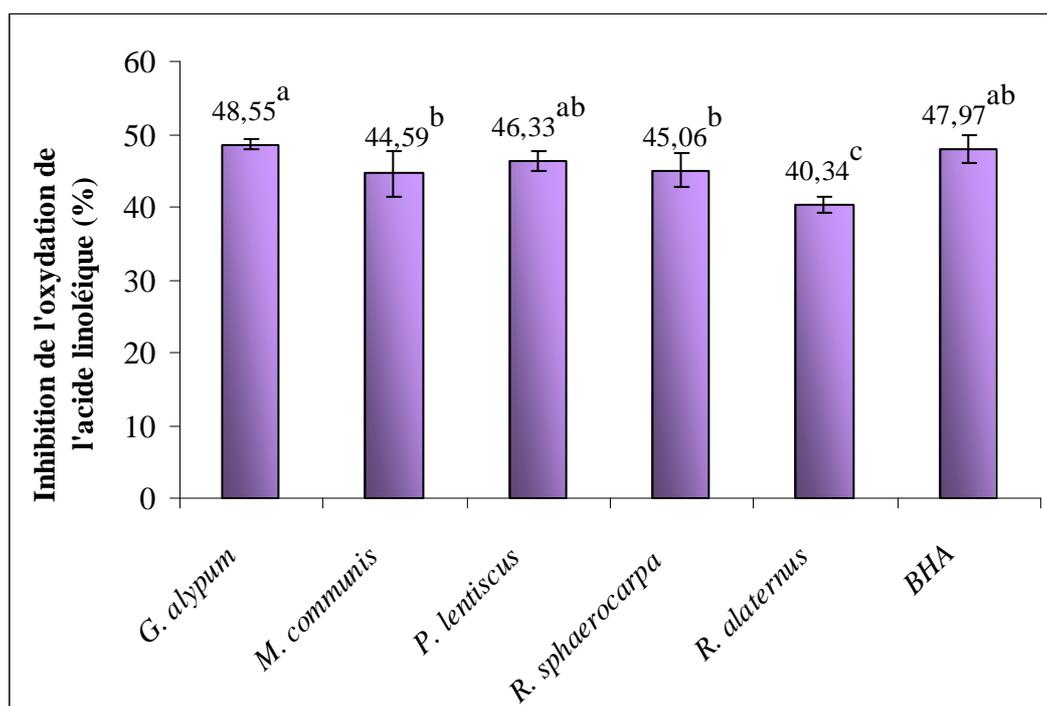


Figure 13 : Pourcentages d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par les extraits de plantes au troisième jour d'incubation.

Les pourcentages d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par les échantillons suivent cet ordre : *Globularia alypum* > BHA > *Pistacia lentiscus* > *Retama sphaerocarpa* > *Myrtus communis* > *Rhamnus alaternus*. Les pourcentages d'inhibition obtenus pour les cinq plantes varient de 40,35 à 48,55 %, ce qui laisse conclure que les extraits de plantes sont des inhibiteurs efficaces de la peroxydation lipidique bien que leur composition chimique est différente. *Rhamnus alaternus* ayant la plus faible activité inhibitrice présente une différence hautement significative ($p < 0.01$) par rapport aux autres plantes qui ne présentent aucune différence à ce seuil. Romani *et al.* (2004) ont démontré que l'extrait de myrte réduit la formation des diènes conjugués, cette activité est due à la présence de dérivés galloylés.

Le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique présenté par les plantes est comparable à celui du butylhydroxyanisole (BHA) qui est un antioxydant synthétique. Un résultat similaire est trouvé par Ordoñez *et al.* (2006) en étudiant l'activité antioxydante d'une plante médicinale, *Sechium edule*.

Retama sphaerocarpa, ayant parmi les échantillons la teneur la plus faible en composés phénoliques, présente une activité inhibitrice aussi efficace que celle du myrte qui possède la teneur la plus élevée en polyphénols. Ce résultat peut être expliqué soit, par la présence de composés phénoliques dans l'extrait de *R. sphaerocarpa* qui ont une très forte activité antioxydante par rapport à ceux retrouvés dans l'extrait de *Myrtus communis*, ce qui est en corrélation avec l'étude réalisée par Al-Ismail et Aburjai (2004) sur l'activité antioxydante de quelques plantes médicinales ; soit par la présence d'autres composés dotés d'un pouvoir antioxydant. Pour appuyer cette hypothèse, un coefficient de corrélation linéaire est établi entre la teneur en composés phénoliques et le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique (figure 14).

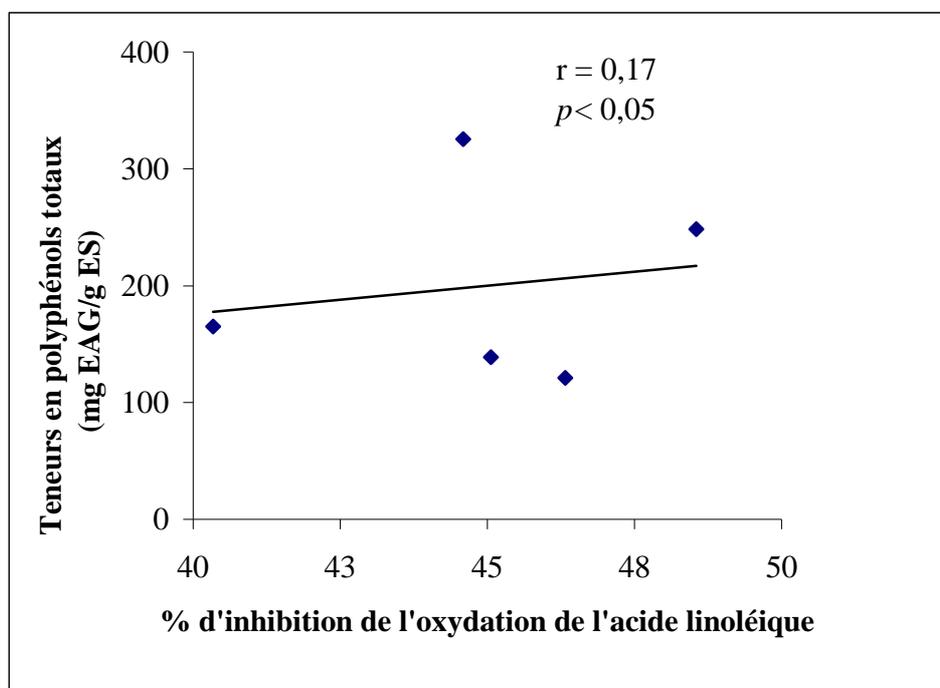


Figure 14 : Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques totaux et le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique.

La figure ci-dessus montre un très faible coefficient de corrélation linéaire ($r = 0,17$) entre la teneur en composés phénoliques totaux et le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique.

Un résultat similaire est trouvé par Peschel *et al.* (2006), en recherchant de nouveaux antioxydants dans les écorces de fruits et légumes, une faible corrélation est obtenue malgré la richesse des échantillons en composés phénoliques. Effectivement, cette faible corrélation peut être attribuée au fait que l'activité antioxydante est exercée par des composés non phénoliques. Selon Chanwitheesuk *et al.* (2005), l'activité antioxydante est due non seulement aux composés phénoliques, mais aussi aux huiles essentielles, caroténoïdes, vitamines et minéraux.

Dans une autre étude, Zhiyong et Yuanzong (2004) ont trouvé aussi une faible corrélation entre le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique et la teneur en composés phénoliques totaux. Ces deux auteurs ont expliqué ce résultat par la répartition des antioxydants dans un système hétérogène. En d'autres termes, les lipides en milieu aqueux forment un système hétérogène constitué de micelles où les radicaux peroxydes baignent à l'intérieur du corps lipophile. Ces micelles lipidiques constituent une vraie barrière aux antioxydants. Si ces derniers n'arrivent pas à franchir cette barrière ou à s'insérer à l'intérieur de la micelle, leur activité antioxydante sera diminuée.

3.2. Pouvoir antiradicalaire

Le pouvoir antiradicalaire est très utilisé pour évaluer rapidement l'activité antioxydante dans les aliments et dans les systèmes biologiques complexes (Prakash, 2001 ; Gülçin *et al.*, 2005). Le radical DPPH', utilisé dans cette étude, se réduit en présence d'antioxydants qui lui transfère des électrons ou des protons. La coloration violette typique du radical DPPH' se dissipe et l'intensité de la réaction dépendra du potentiel des antioxydants (Choi *et al.*, 2002 ; Gülçin *et al.*, 2003 ; Naik *et al.*, 2003). La figure 15 montre le mécanisme de réduction du radical DPPH' (Prakash, 2001 ; Amić *et al.*, 2003).

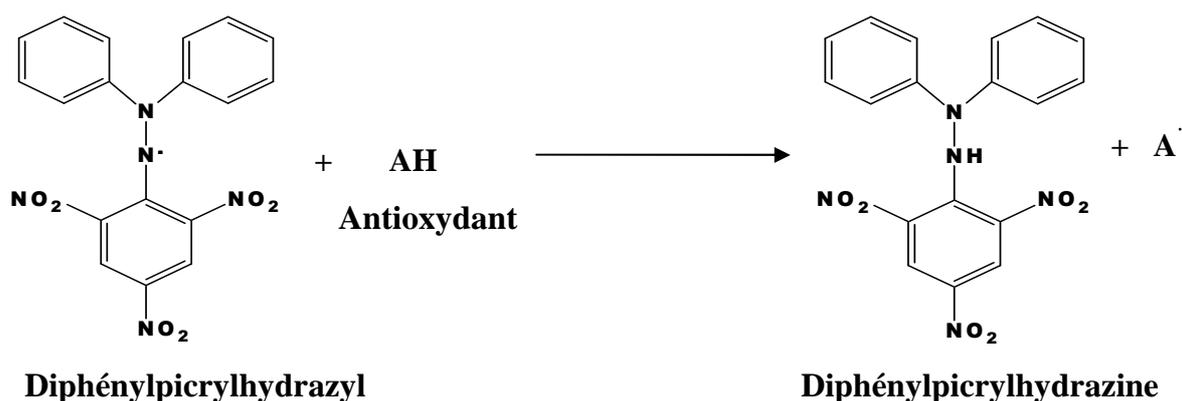


Figure 15 : Mécanisme de réduction du radical DPPH[•] par un antioxydant (Prakash, 2001 ; Amić *et al.*, 2003).

3.2.1. Pouvoir antiradicalaire exprimé en pourcentage

Les résultats du pouvoir antiradicalaire exprimé par les extraits de plantes sont représentés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Pouvoir antiradicalaire des extraits de plantes utilisés.

	<i>G. alypum</i>	<i>R. alaternus</i>	<i>P. lentiscus</i>	<i>R. sphaerocarpa</i>	<i>M. communis</i>
Pouvoir antiradicalaire (%)*	46,16±0.41 ^b	2,23±0.44 ^e	14,90±0.64 ^c	5,24±0.43 ^d	52,75±0.22 ^a

* Les valeurs portant des lettres différentes présentent des différences significatives ($p < 0.001$)

Selon les résultats obtenus, le pouvoir antiradicalaire varie de $2,23 \pm 0,44$ à $52,75 \pm 0,22$ %. Toutes les plantes ont la capacité de piéger les radicaux DPPH[•] et cette propriété de réduction diffère significativement entre les extraits ($p < 0.001$). Le pouvoir de réduction le plus élevé est obtenu par *Myrtus communis* suivi successivement de *Globularia alypum*, *Pistacia lentiscus*, *Retama sphaerocarpa* et enfin *Rhamnus alaternus*.

Myrtus communis présente un pouvoir antiradicalaire de $52,75 \pm 0,22$ %, montrant ainsi une très forte activité antioxydante. Ce pouvoir « scavenger » du radical DPPH[•] est probablement dû à la présence de composés phénoliques. Le dosage de ces molécules dans l'extrait du myrte a montré sa richesse en ces composés.

Selon Naik *et al.* (2003), l'activité antiradicalaire est due aux composés phénoliques qui cèdent facilement des électrons et des protons pour réduire le radical DPPH'. Dans une autre étude, Hayder *et al.* (2004) ont démontré que l'extrait méthanolique de *Myrtus communis* présente un très fort pouvoir réducteur des radicaux DPPH'. Le dosage des polyphénols totaux dans l'extrait de la globulaire a montré la richesse de cette plante en ces composés mais aussi sa teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux. Ces résultats traduisent son pouvoir antiradicalaire et qui est aussi important que celui du myrte.

Es-Safi *et al.* (2006) ont trouvé que *Globularia alypum* présente un pouvoir réducteur élevé vis-à-vis du radical DPPH', ce qui est en corrélation avec le résultat trouvé dans ce test. Beaucoup d'études effectuées sur la globulaire ont démontré que les composés responsables de ce pouvoir antiradicalaire sont les flavonoïdes, les dérivés phénoliques et les phényléthanoïdes glycosylés (Djeridane *et al.*, 2006 ; Es-Safi *et al.*, 2006 ; Es-Safi *et al.*, 2007) et dans le même contexte, un travail effectué sur *Globularia davisiana* a montré aussi le pouvoir antiradicalaire des phényléthanoïdes glycosylés (Çalis *et al.*, 2002).

La figure 16 montre un coefficient de corrélation linéaire important entre la teneur en composés phénoliques totaux et le pouvoir antiradicalaire ($r = 0,90$), ce qui montre la contribution des composés phénoliques dans l'activité antiradicalaire. Des résultats similaires sont trouvés dans plusieurs études effectuées sur le thé noir, le basilique et les composés phénoliques (Peyrat-Maillard *et al.* 2000 ; Javanmardi *et al.*, 2003 ; Turkmen *et al.*, 2006).

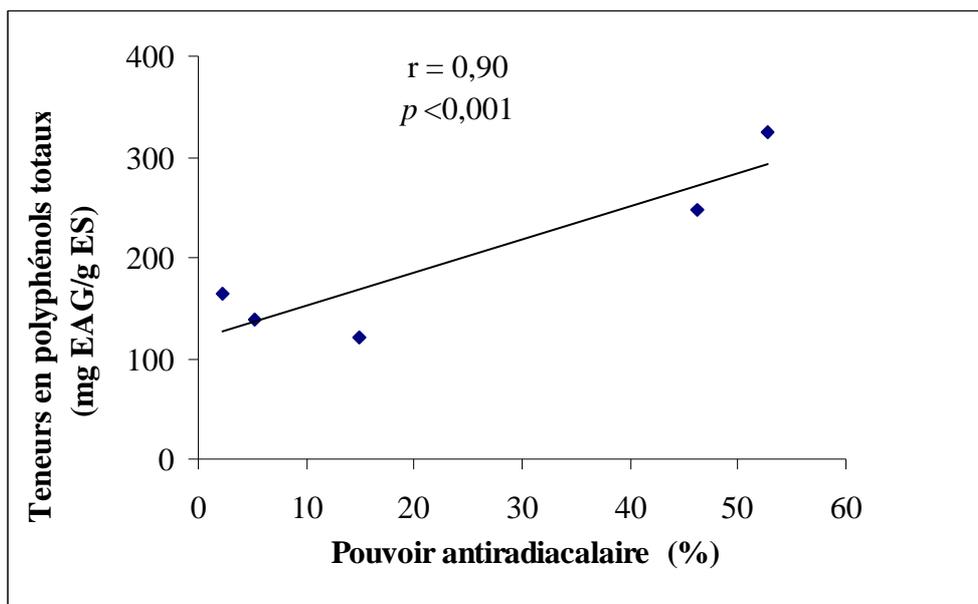


Figure 16 : Corrélation entre les teneurs en composés phénoliques totaux et le pouvoir antiradicalaire.

Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées, leur activité antiradicalaire est liée à :

- 1- la structure *ortho*-diphénolique du cycle B, qui est essentielle à l'activité des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé (figure 17.a) (Remesy *et al.*, 1996 ; Rice-Evans *et al.*, 1996) ;
- 2- la double liaison 2-3 conjuguée avec la fonction 4-oxo-, qui est responsable de la délocalisation d'électrons stabilisant le radical aroxyde (figure 17.b) (Rice-Evans *et al.*, 1997 ; Pietta, 2000) ;
- 3- les hydroxyles en position 3 et 5 qui permettent une activité antiradicalaire maximale (figure 17.c) (Milane *et al.*, 2004 ; Rajendran *et al.*, 2004 ; Furusawa *et al.* 2005).

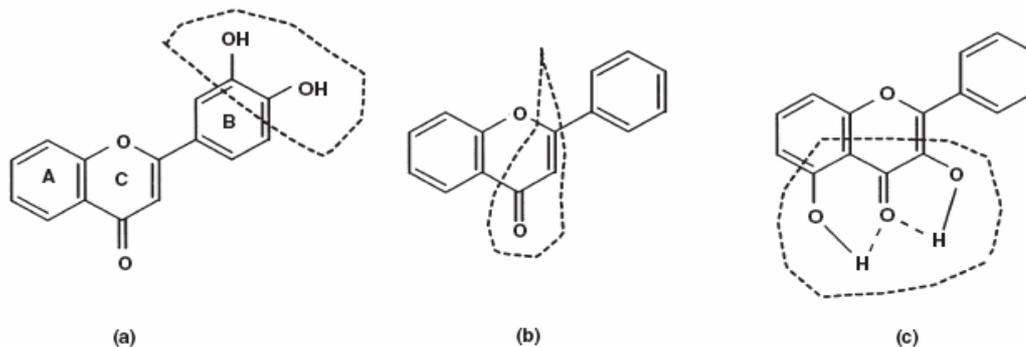


Figure 17 : Relation entre la structure des flavonoïdes et l'activité antioxydante (Pokorny *et al.*, 2001).

La quercétine présente les trois éléments de structure décrits ci-dessus, ce qui fait d'elle un piègeur efficace des radicaux hydroxyles et peroxydes (figure 18) (Salah *et al.*, 1995 ; Naurato *et al.*, 1999 ; Sánchez-Moreno *et al.*, 1999). La catéchine possède une structure catéchol sur le cycle B, ce qu'il lui confère l'activité de piéger l'oxygène singulet (Rice-Evans, 1996 ; Amić *et al.*, 2003 ; Milane, 2004).

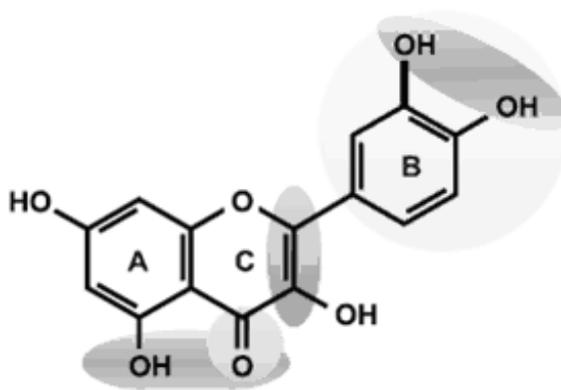


Figure 18 : Structure de la quercétine (Williams *et al.*, 2004)

Les flavonols, appartenant aux flavonoïdes, présentent une forte analogie structurale avec la vitamine C. Ils ont une structure qui leur permet de piéger les radicaux libres en les neutralisant par fixation de deux atomes d'hydrogène fournis par deux fonctions phénol du flavonol. Les deux électrons célibataires créés sur la molécule de flavonol s'apparient de façon interne pour conduire à une tricétone neutre. Lorsque celle-ci est réduite par voie ionique, elle peut régénérer le flavonol initial (figure 19). C'est ainsi que les flavonols jouent un rôle de médiateurs judicieux qui permettent de neutraliser les espèces radicalaires destructrices en molécules inactives neutres, grâce à l'association d'une oxydation radicalaire et d'une réduction ionique (Wilson et Salamatian, 2003 ; Amić *et al.*, 2003 ; Gorinstein *et al.*, 2004).

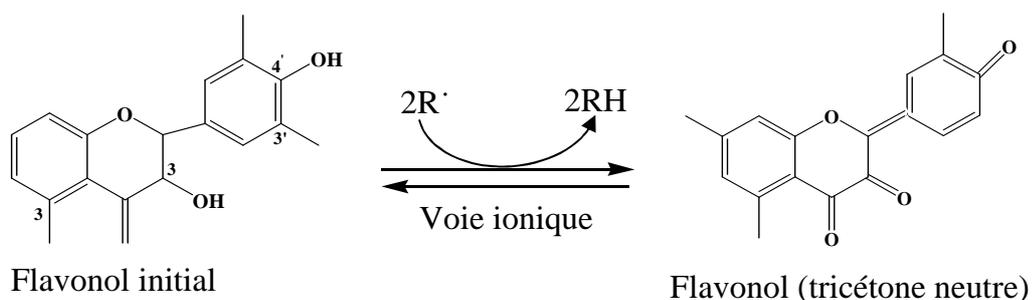


Figure 19 : Mode d'action antiradicalaire d'un flavonol (Pietta, 2000).

3.2.2. Pouvoir antiradicalaire exprimé en équivalents d'antioxydants

Le pouvoir antiradicalaire des extraits de plantes est exprimé en quantité d'antioxydants en mg, en équivalents d'acide gallique et en vitamine C par g d'extraits sec. La figure 20 montre les différents résultats obtenus.

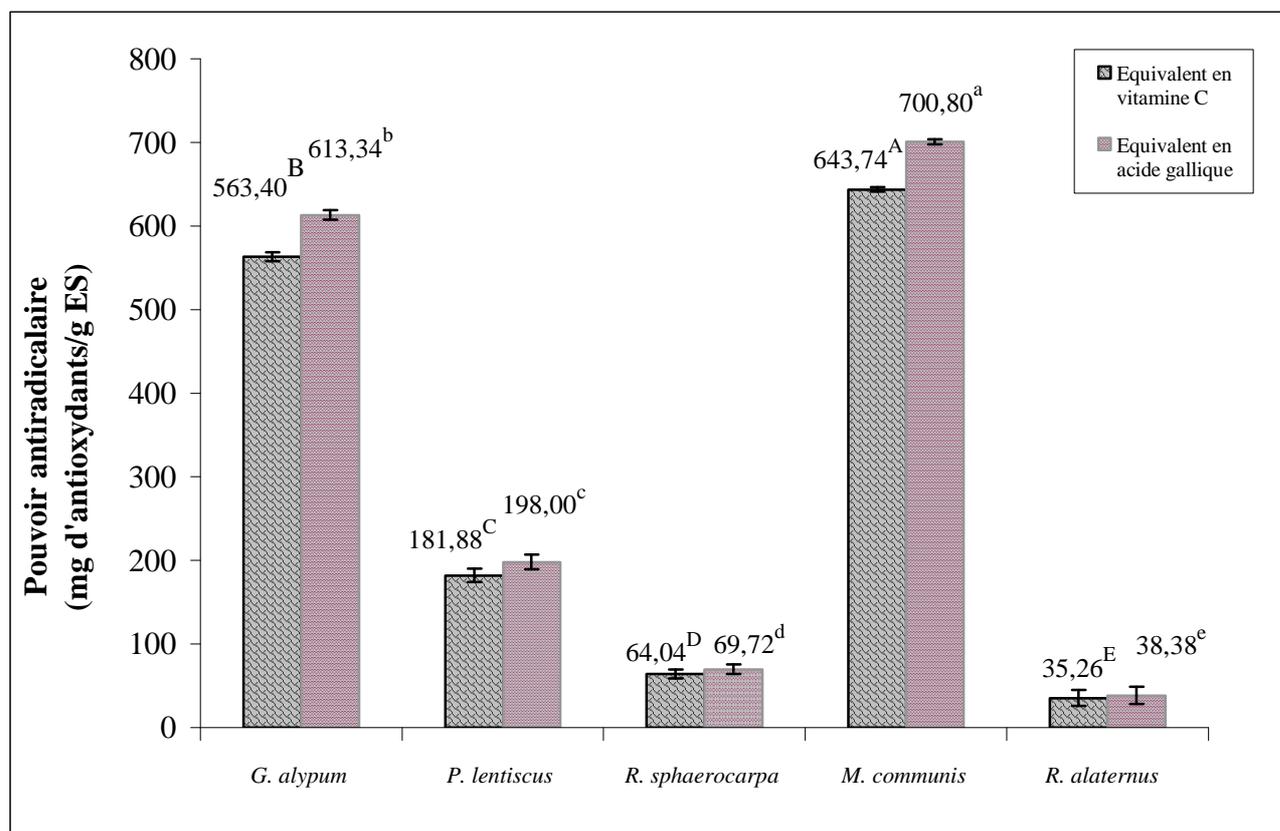


Figure 20 : Pouvoir antiradicalaire des extraits de plantes exprimé en quantité d'antioxydants.

Les résultats obtenus pour chaque standard (vitamine C ou acide gallique) montrent que les cinq extraits de plantes ont la capacité de piéger le radical DPPH'et que cette propriété de réduction diffère significativement entre les extraits ($p < 0,001$).

Pour les extraits de *R. sphaerocarpa* et *R. alaternus*, les quantités d'antioxydants exprimées en équivalents d'acide gallique et en vitamine C ne présentent aucune différence significative ($p < 0,05$). Par ailleurs, beaucoup d'études ont démontré que les composés phénoliques ont une meilleure activité antioxydante comparés aux vitamines C et E (Rice-Evans *et al.*, 1997 ; Espigares *et al.*, 2004 ; Oboh, 2005).

G. alypum, *M. communis* et *P. lentiscus* montrent clairement l'efficacité de la vitamine C. Cette dernière exerce la même activité antiradicalaire que l'acide gallique et en impliquant peu d'antioxydants.

3.2.3. Effet de la concentration de l'extrait sur le pouvoir antiradicalaire

Pour voir l'effet de la teneur en antioxydants sur le pouvoir antiradicalaire, des solutions d'extraits de plantes, à des concentrations différentes, sont mises en contact avec la solution de DPPH. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de réduction du radical DPPH et sont représentés dans la figure 21.

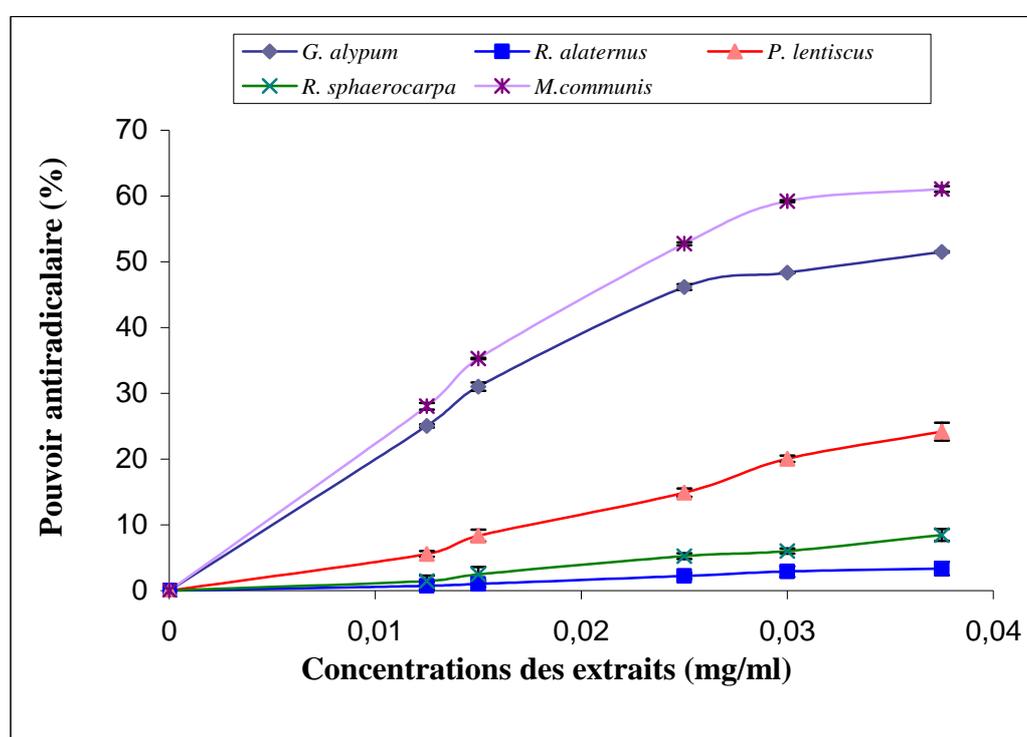


Figure 21 : Pouvoir antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits de plantes. Chaque valeur est représentée par la moyenne \pm écart type ($n = 3$).

Les courbes obtenues montrent que l'activité antiradicalaire augmente significativement ($p < 0,001$) avec l'augmentation de la concentration des extraits. Plus il y a apport d'antioxydants, plus les radicaux DPPH \cdot sont réduits. Plusieurs études utilisant le test de réduction du radical DPPH \cdot ont trouvé des résultats similaires (Gülçin *et al.*, 2003 ; Hayder *et al.*, 2004 ; Gülçin *et al.*, 2005). Le pouvoir réducteur de *Myrtus communis* et *Globularia alypum* augmente proportionnellement avec l'élévation de la concentration des extraits.

A partir d'une concentration de 0,03 mg/ml, le pouvoir antiradicalaire atteint presque le maximum et tend à se stabiliser pour une concentration plus élevée suite à la réduction de la quasi-totalité des radicaux DPPH'.

Cependant, *Retama sphaerocarpa* et *Rhamnus alaternus* présentent de très faibles activités comparées aux deux plantes précédentes. Ces résultats peuvent être attribués à leurs faibles teneurs en composés phénoliques.

La variation de l'activité antiradicalaire d'une plante à une autre peut être affectée par plusieurs facteurs :

- la teneur en composés phénoliques, leurs structures moléculaires et la position de leurs groupements hydroxyles (Choi *et al.*, 2002 ; Jung *et al.*, 2005) ; la position *ortho*- des groupements hydroxyles des flavonoïdes augmente l'activité antioxydante (Es-Safi *et al.*, 2007) ;
- la propriété redox des polyphénols qui leur permet d'agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et piègeurs de l'oxygène singulet (Javanmardi *et al.* 2003 ; Pyo *et al.*, 2004 ; Chanwitheesuk *et al.*, 2005) ;
- la présence des monophénols en grande concentration. Ces composés sont moins efficaces que les polyphénols (Sánchez-Moreno *et al.*, 1999) ;
- le degré de glycosylation affecte le pouvoir de réduction du radical DPPH'. Il a été démontré que les composés aglycones sont plus puissants que ceux glycosylés (Kähkönen, 1999 ; Pietta, 2000). La quercétine, un flavonoïde aglycone, a un potentiel de réduction du DPPH plus élevé que la rutine qui a un disaccharide (Sánchez-Moreno *et al.*, 1999) ;
- la présence des acides phénoliques, des flavonoïdes, des tanins et autres composés à activité antioxydante tels que les vitamines, les minéraux et l'effet synergique entre eux augmentent l'activité antiradicalaire (Sánchez-Moreno *et al.*, 1999) ;
- les antioxydants peuvent être solubles dans la matière grasse, ou être liés aux membranes cellulaires, ce qui les empêche de réagir avec le DPPH (Prakash, 2001).

3. 3. Pouvoir réducteur

La capacité réductrice d'un composé est un indicateur très important de son potentiel antioxydant et l'absorbance mesurée à 700 nm reflète la quantité de composés antioxydants présents dans l'échantillon (Gülçin *et al.*, 2003 ; Gülçin *et al.*, 2005 ; Que *et al.*, 2006).

La figure 22 montre le pouvoir réducteur des extraits de plantes en fonction de leurs concentrations.

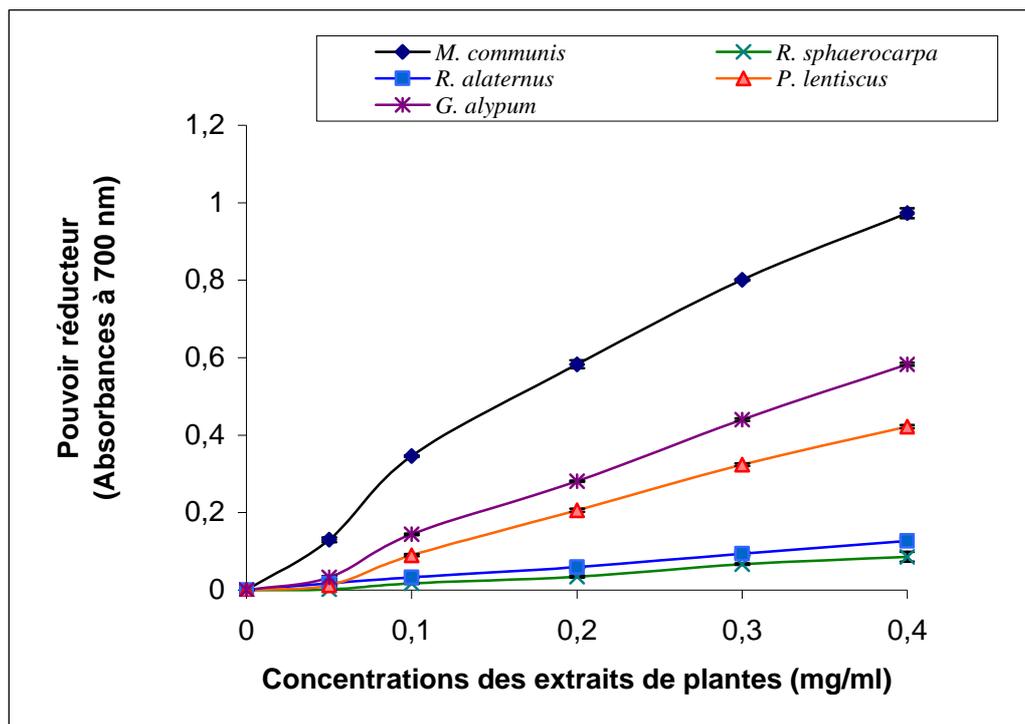


Figure 22 : Pouvoir réducteur en fonction de la concentration des extraits de plantes.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ($n = 3$).

Les courbes obtenues indiquent que l'absorbance augmente au fur et à mesure que la concentration en extrait s'élève. Ce résultat peut être expliqué par la présence de composés donneurs d'électrons qui entraînent la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} . Plus la concentration d'extrait augmente, plus il y a apport d'antioxydants et par conséquent, le pouvoir réducteur augmente.

Plusieurs études, en testant le pouvoir réducteur de différents échantillons, ont démontré que ce pouvoir s'élève au fur et à mesure que la concentration de l'échantillon augmente (Huang *et al.*, 2004 ; Oboh, 2005).

Dans ce test, les courbes obtenues montrent que le pouvoir réducteur diffère significativement entre les extraits ($p < 0,001$) et suit l'ordre croissant suivant : *Retama sphaerocarpa* < *Rhamnus alaternus* < *Pistacia lentiscus* < *Globularia alypum* < *Myrtus communis*.

La fluctuation des résultats entre les échantillons peut être due à plusieurs paramètres. Selon Mau *et al.* (2005), la différence du pouvoir réducteur entre les échantillons est due à la variation des espèces de plantes utilisées. Le pouvoir réducteur élevé de *Myrtus communis*, *Globularia alypum* et *Pistacia lentiscus* peut être attribué à leurs teneurs élevées en composés phénoliques. Ces derniers semblent contribuer d'une manière très importante à l'augmentation de ce pouvoir vue leurs capacités à transférer des électrons et des protons dans le milieu réactionnel (Hinneburg *et al.*, 2006). Parmi ces composés, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les diterpènes phénoliques et les tanins (Javanmardi *et al.*, 2003 ; Balasundram *et al.* 2006 ; Pilarski *et al.* 2006). Les huiles essentielles, les caroténoïdes et les vitamines semblent aussi augmenter ce pouvoir (Chanwitheesuk *et al.* 2005).

En outre, un coefficient de corrélation linéaire élevé est obtenu entre les teneurs en polyphénols totaux des échantillons et leurs pouvoir réducteur ($r = 0,87$) (Figure 23). Des résultats similaires sont trouvés par plusieurs études effectuées sur les plantes médicinales, soit en utilisant la méthode FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) ou la méthode au ferrothiocyanate (Hinneburg *et al.*, 2006 ; Katalinic *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2006).

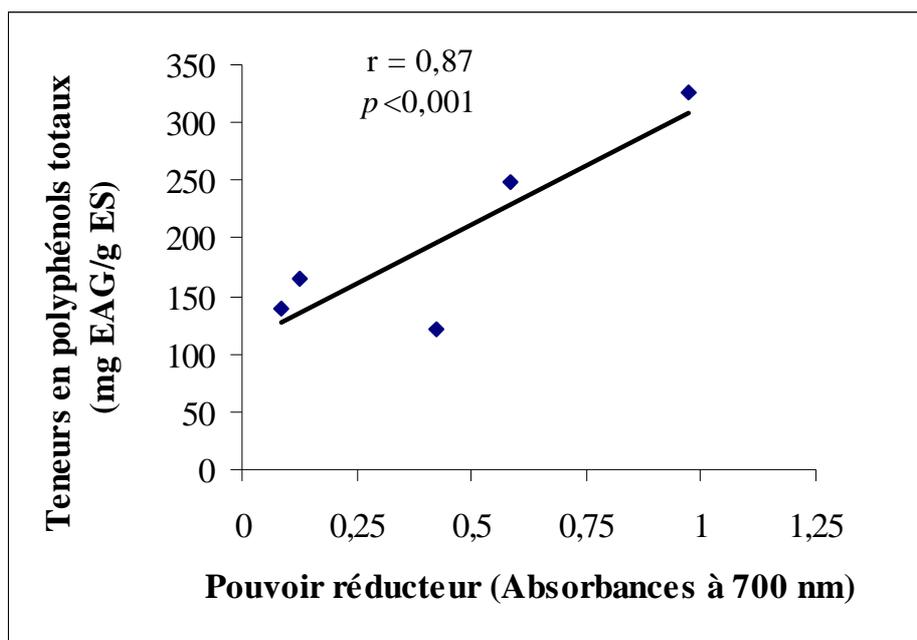


Figure 23 : Corrélation entre le pouvoir réducteur et les teneurs en composés phénoliques totaux.

Retama sphaerocarpa et *Rhamnus alaternus* ont aussi des teneurs en composés phénoliques non négligeables, mais présentent un pouvoir réducteur très faible. Dans une étude, évaluant l'activité antioxydante de trois espèces de lichens, Odabasoglu *et al.* (2004) ont démontré que la différence du pouvoir réducteur entre ces espèces est due à la variation de leurs teneurs en composés phénoliques. Selon ces auteurs, ces composés n'ont pas tous la même activité antioxydante, certains polyphénols ont un potentiel antioxydant très fort et d'autres moyens ou faibles. Ils développent des interactions synergiques ou antagonistes entre eux ou avec d'autres composés tels que les glycosides et les protéines.

En évaluant l'activité antioxydante de soixante dix plantes médicinales et leurs teneurs en composés phénoliques, Katalinic *et al.* (2006) ont rapporté que le pouvoir réducteur augmente lorsque deux groupements hydroxyles du composé phénolique sont orientés en position *ortho*- ou *para*-. L'augmentation du pouvoir réducteur des extraits de plantes peut être aussi attribuée à la présence de certains composés non phénoliques dans le matériel végétal ayant un pouvoir antioxydant tels que l'acide ascorbique, les tocophérols, les minéraux et les pigments (Bhandari et Kawabata, 2004).

De plus, ces résultats présument la présence de composés aglycones à des concentrations élevées au dépend des composés glycosylés qui ont une faible activité antioxydante par rapport aux composés précédents (Odabasoglu *et al.*, 2004 ; Oboh, 2005).

La figure 24 montre le pouvoir réducteur des extraits de plantes à une concentration de 0,4 mg/ml. Ce pouvoir est exprimé en quantités d'antioxydant en mg, en équivalents d'acide gallique et en quercetine par g d'extrait sec.

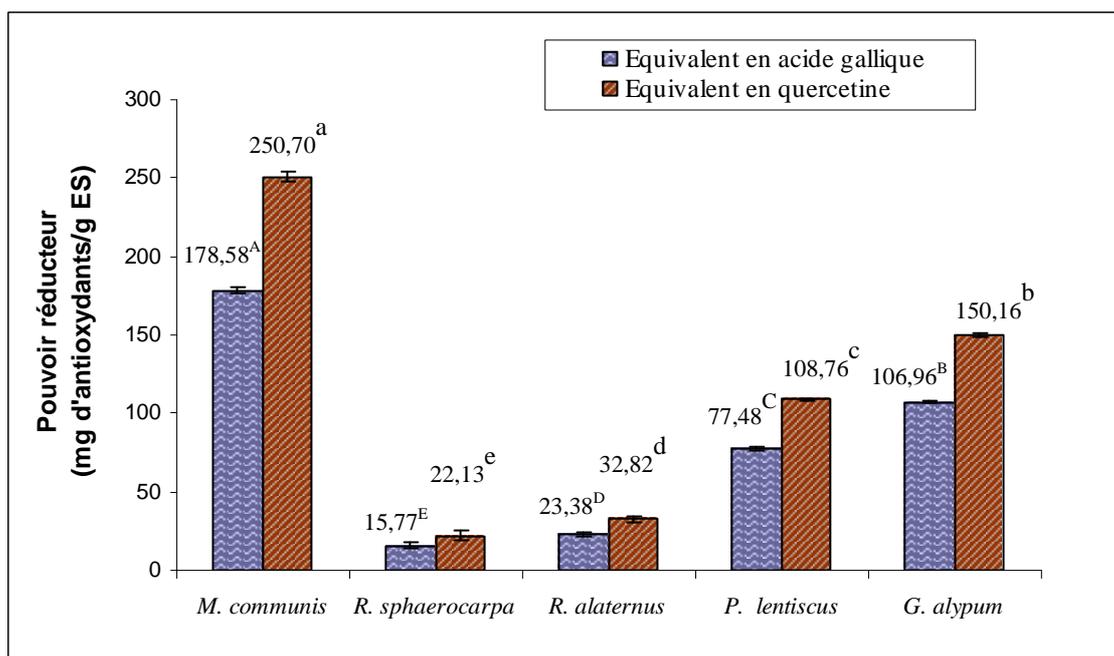


Figure 24 : Pouvoir réducteur des extraits de plantes exprimé en mg d'antioxydants

Selon les résultats obtenus, le pouvoir réducteur diffère significativement d'une plante à une autre ($p < 0,001$) et suit le même ordre décroissant pour les équivalents de chaque standard : *Myrtus communis* < *Globularia alypum* < *Pistacia lentiscus* < *Rhamnus alaternus* < *Retama sphaerocarpa*.

Pour pouvoir exercer le même pouvoir réducteur, *Myrtus communis*, *Globularia alypum* et *Pistacia lentiscus* nécessitent plus d'antioxydants équivalents en quercetine qu'en acide gallique, d'où l'efficacité de l'acide gallique.

Pour *Rhamnus alaternus* et *Retama sphaerocarpa*, les quantités d'antioxydants équivalents à l'acide gallique et la quercétine ne présentent aucune différence significative.

3.4. Relation entre le pouvoir antiradicalaire et le pouvoir réducteur

Les antioxydants peuvent exercer des activités antiradicalaires ou réductrices grâce à leurs propriétés redox qui leur permet d'agir comme étant des agents réducteurs et/ou donneurs d'électrons (Naik *et al.*, 2003 ; Chanwitheesuk *et al.*, 2005 ; Gülçin *et al.*, 2005). Plusieurs auteurs ont déterminé des coefficients de corrélations entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante, qui est déterminée par le pouvoir antiradicalaire, le pouvoir réducteur ou par d'autres tests tels que la méthode au ferrothiocyanate, le test TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), le test FRAP, etc. (Javanmardi *et al.*, 2003 ; Hinneburg *et al.*, 2006 ; Katalinic *et al.*, 2006).

Dans ce travail, un coefficient de corrélation linéaire est déterminé entre le pouvoir réducteur et l'activité antiradicalaire (figure 25). Ces deux tests ont montré une très bonne corrélation ($r = 0,94$), qui peut être expliquée par la présence d'antioxydants dans les extraits de plantes ayant à la fois une activité réductrice et antiradicalaire. Leong et Shui (2002), en évaluant l'activité antioxydante des fruits, ont trouvé de bonnes corrélations entre les deux méthodes utilisant l'ABTS et le DPPH ($r = 0,99$) et entre le pouvoir réducteur et la méthode au ferrothiocyanate ($r = 0,59$).

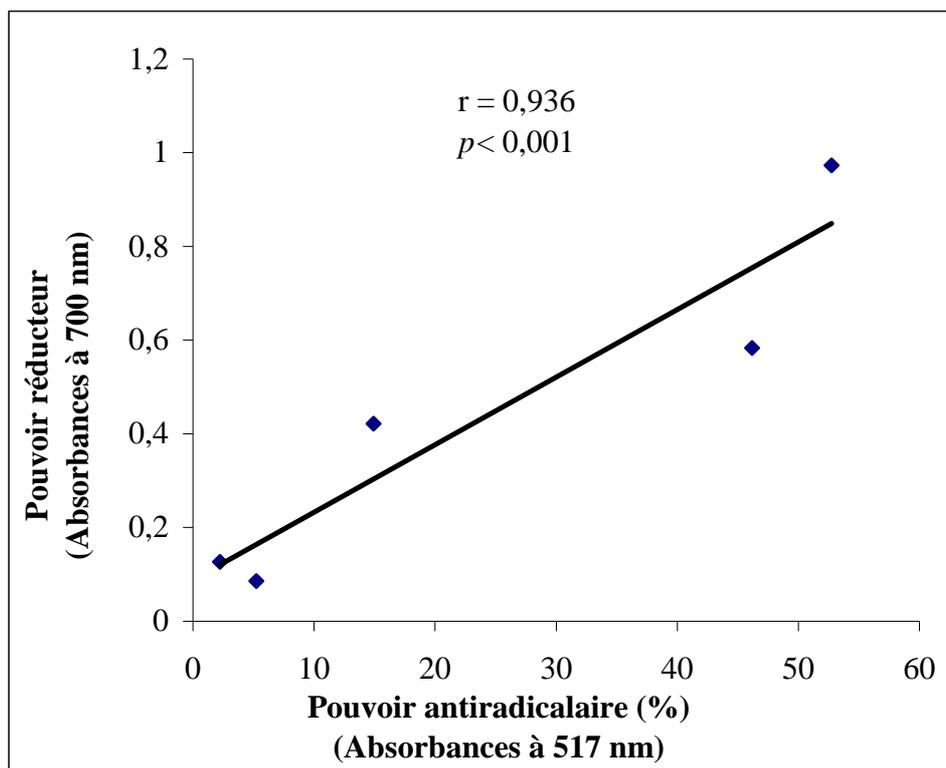


Figure 25 : Corrélation entre le pouvoir réducteur et le pouvoir antiradicalaire.

4. Activités biologiques

4.1. Interactions polyphénols – protéines

Ce travail concerne en une première approche l'étude de l'interaction polyphénols–protéines d'un point de vue phytochimique. Le suivi de l'effet de la concentration de l'extrait ainsi que la force ionique sur la formation des complexes polyphénols–protéines est un élément essentiel à la compréhension de la nature de l'interaction.

4.1.1. Effet de la concentration des extraits

La mise en contact d'extraits de plantes à différentes concentrations avec une solution de BSA conduit à l'apparition d'un trouble issu de la formation des complexes polyphénols-protéines. Les résultats obtenus pour les cinq plantes étudiées sont illustrés dans la figure 26.

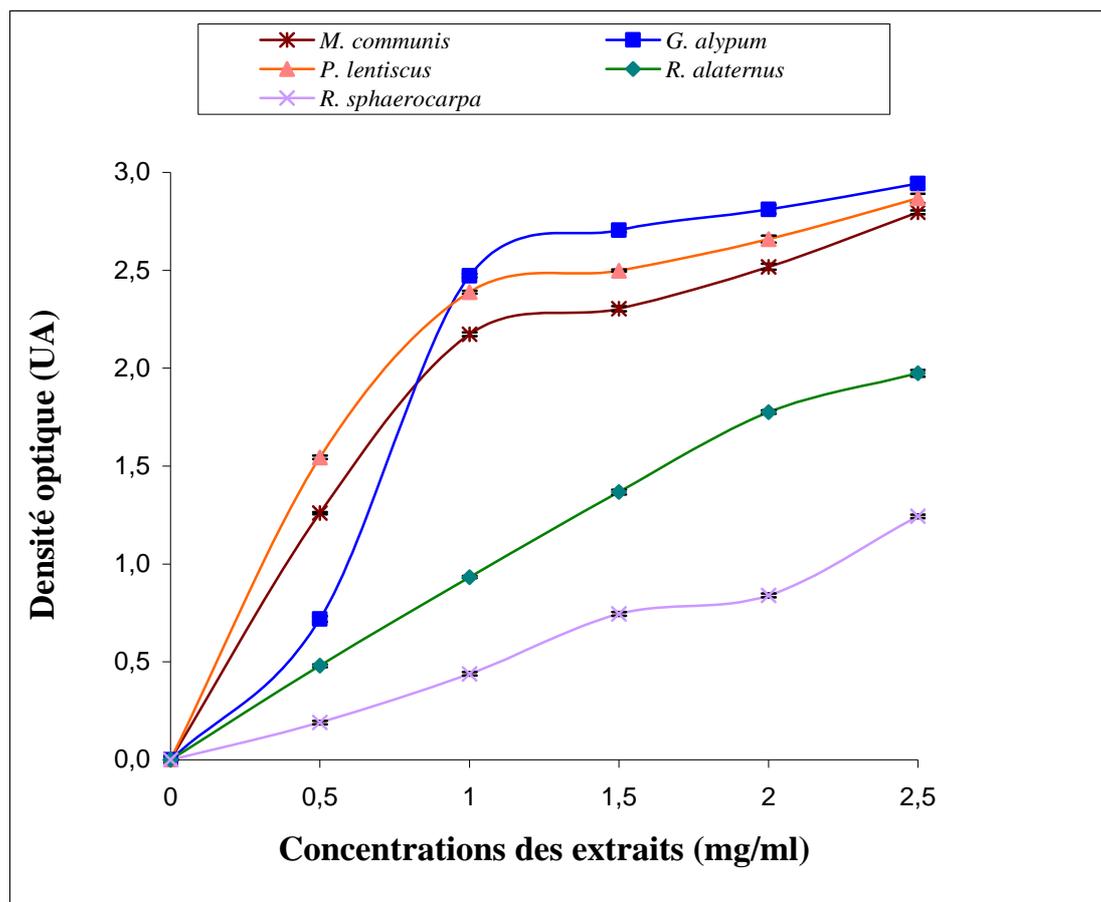


Figure 26 : Variation de la densité optique en fonction des concentrations des extraits de plantes. Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ($n = 3$).

Les courbes obtenues montrent clairement que la turbidité est fortement influencée par la concentration des extraits et plus précisément leurs contenus en polyphénols. L'évolution de la densité optique (DO) en fonction de la concentration des extraits méthanoliques de *Globularia alypum*, *Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis* montrent des allures hyperboliques ressemblant à l'isotherme de Langmuir, généralement observées dans des études interactionnelles (Papadopoulou et Frazier, 2004).

Plus la concentration des extraits augmente, plus la turbidité s'élève avec formation de précipité et c'est le cas observé pour toutes les plantes. La densité optique augmente légèrement entre les concentrations de 1,5 à 2,5 mg/ml pour les extraits du myrte, du lentisque et de la globulaire et tend à se stabiliser.

Quant aux extraits de *R. alaternus* et *R. sphaerocarpa*, les courbes obtenues révèlent que les concentrations d'extraits utilisées ne sont pas assez suffisantes pour atteindre un palier de saturation.

L'analyse du complexe formé lors de l'interaction peut prendre différents chemins. En effet, plusieurs critères définissent cette interaction et peuvent être regroupés en deux classes : ceux qui sont intrinsèques à la nature de la protéine et du polyphénol et ceux liés aux conditions dans lesquelles ont eu lieu ces complexations. Plusieurs recherches ont démontré que les tanins ont une très grande affinité aux protéines et un fort pouvoir de précipitation avec eux (Kawamoto *et al.*, 1996 ; Lu et Bennick, 1998 ; Feldman *et al.*, 1999 ; Hoffman *et al.*, 2002). Les polymères de catéchines, les proanthocyanidines ou les tanins condensés sont des molécules qui ont des tailles suffisamment grosses pour causer la turbidité et la précipitation en se combinant avec les protéines (Hagerman et Butler, 1981 ; Araya-Farias, 1999 ; Simon, 2003 ; Mateus *et al.*, 2004).

Il a été rapporté par Nackz *et al.* (2001) que la formation de ces complexes dépend non seulement de la taille mais aussi de la structure et de la flexibilité du tanin impliqué. Selon ces auteurs, les tanins ayant trois sous unités flavanols dans leur structure sont des molécules très efficaces pour la précipitation des protéines, tandis que les dimères et les flavanols simples ne les précipitent pas. Ce qui mène à conclure que les plantes étudiées sont très riches en tanins polymérisés.

L'augmentation de la masse moléculaire et le nombre de groupements hydroxyles portés sur les unités monomériques accroît l'affinité et favorise la précipitation avec les protéines (Siebert *et al.*, 1996, Santos-Buelga et Scalbert, 2000 ; Simon, 2003 ; Carvalho *et al.*, 2004).

Ce phénomène de précipitation est dû à la formation des surfaces hydrophobiques suffisantes sur le complexe (Nackz *et al.*, 2001 ; Nackz *et al.*, 2006), il apparaît lorsqu'il y a un nombre important et suffisant de polyphénols et de protéines (Kawamoto et Nakatsubo, 1997 ; Carvalho *et al.*, 2004 ; Nackz *et al.*, 2006).

Les tanins jouent un rôle de ligand polydenté, ils s'associent avec les protéines par des interactions hydrophobiques (forces attractives de Van der Waals) et par des liaisons hydrogènes (Bennick, 2002 ; Freitas *et al.*, 2003 ; Carvalho *et al.*, 2004 ; Mateus *et al.*, 2004). Ces dernières se forment entre les groupements hydroxyles des phénols et les groupements carbonyles des protéines (Yan et Bennick, 1995 ; Araya-Farias, 1999 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

Selon Fickel *et al.* (1999), les tanins peuvent former des liaisons ioniques, hydrogènes et parfois covalentes avec les groupements amino-, hydroxy- ou carboxy- des protéines et même par des liaisons peptidiques. Siebert *et al.* (1996) ont démontré que la quantité des complexes polyphénols-protéines formés dépend des concentrations de protéines, de polyphénols et du rapport entre les deux. Quand le nombre total de terminaisons de polyphénols est à peu près égal aux nombres de points de liaisons des protéines, un vaste réseau de grosses particules colloïdales se formera, causant un maximum de turbidité dans la solution. Ce cas correspond aux résultats observés pour les plantes suivantes : *P. lentiscus*, *M. communis* et *G. alypum*.

Lorsqu'il y a ajout d'extrait dans le milieu, c'est-à-dire un apport de plus en composés phénoliques (plus de 1 mg/ml), la turbidité évolue légèrement. Ceci peut être expliqué par la saturation des protéines BSA, tous les sites sont occupés par les polyphénols et ça concorde avec les résultats trouvés par Araya-Farias (1999) et Carvalho *et al.*, (2004). Ces auteurs ont montré que lorsque la concentration en composés phénoliques est supérieure à celle de la protéine BSA, tous les points de liaison sur les protéines seront occupés. Il est difficile de réunir plusieurs protéines ensemble pour former un réseau, ce qui donne de plus petites particules, menant en cas d'excès exagéré en polyphénols à la diminution de la turbidité. Cette dernière étape n'est pas obtenue car la concentration utilisée dans cette étude (2,5 mg/ml) n'est pas suffisante.

Les polysaccharides peuvent aussi interférer en agissant de manière compétitive avec les protéines sur la fixation des polyphénols (Freitas *et al.*, 2003 ; Carvalho *et al.*, 2004 ; Mateus *et al.*, 2004). Cependant, l'interaction de la BSA avec les extraits de *Rhamnus alaternus* et *R. sphaerocarpa* a montré que les sites de liaison sur les protéines ne sont pas saturés.

Un autre facteur intervenant dans l'interaction polyphénols-protéines est la protéine elle-même. La structure tridimensionnelle est primordiale dans cette interaction, elle doit adopter une structure ouverte, plus exposée au solvant pour faciliter l'approche des tanins (Simon, 2003). D'autres auteurs ont cité que les protéines riches en proline ont une meilleure affinité à complexer des polyphénols (Santos-Buelga et Scalbert, 2000 ; Bennick, 2002 ; Nackz *et al.*, 2006).

Il n'existe pas de séquences spécifiques d'interactions sur les protéines, seule leur particularité à posséder en tandem des résidus proline, glycine et glutamine suffirait à provoquer une forte affinité pour les polyphénols (Bennick, 2002 ; Simon, 2003). La protéine BSA est très utilisée dans le domaine des interactions. En outre, sa composition variée en différents acides aminés justifie son utilisation. D'après Freidli (1996), la BSA est constituée de 58 acides glutamiques et de 28 prolines.

Le deuxième paramètre étant les facteurs du milieu réactionnel qui influent sur l'interaction tanins-protéines. Hagerman et Butler (1978) ont rapporté que la précipitation des complexes tanins-protéines dépend essentiellement du pH du milieu. Dans d'autres études, la solubilité des complexes polyphénols-protéines diminue à des pH proches du point isoélectrique de la protéine utilisée où les forces de répulsion électrostatique sont minimisées (Kawamoto et Nakatsubo, 1997 ; Bennick, 2002 ; Nackz *et al.*, 2006).

Pour écarter ce paramètre et pour démontrer que la précipitation se fait uniquement sous l'effet de l'interaction tanin-protéine, un tampon phosphate (pH 6.9) est utilisé, le pH de la solution est maintenu malgré l'ajout du méthanol dans le milieu.

La présence d'ions inorganiques (K^+ , Na^+) favorise aussi la précipitation. Ces ions sont apportés dans le milieu par le tampon phosphate.

4.1.2. Effet de la force ionique sur les interactions polyphénols/protéines

La force ionique, souvent notée I , est un des principaux facteurs influençant l'activité des ions en solution aqueuse. Elle s'exprime en mol.l^{-1} et est calculée de la manière suivante (Bouabdallah et Mekkaoui, 1993) :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2$$

Où

C_i : [Concentration](#) de l'ion i

z_i : Nombre de charge

La force ionique joue un rôle important dans la formation des complexes polyphénols-protéines (Kawamoto et Nakatsubo, 1997 ; Freitas *et al.*, 2003 ; Simon, 2003 ; Carvalho *et al.*, 2004 ; Mateus *et al.*, 2004). Cette dernière est augmentée dans le milieu par l'ajout de NaCl. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 27.

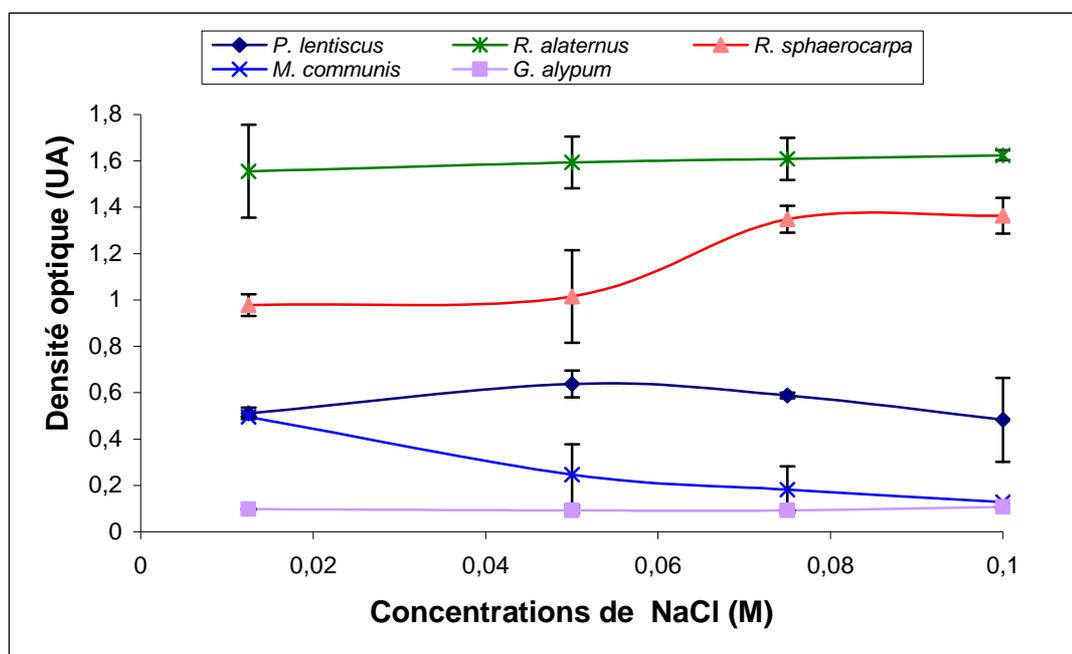


Figure 27 : Variation de la densité optique en fonction de la force ionique.

Chaque valeur représente la moyenne \pm écart type ($n = 3$).

Les courbes obtenues pour *Globularia alypum*, *Rhamnus alaternus* et *Pistacia lentiscus* montrent que la turbidité n'a pas évolué. Elle est restée stable malgré l'ajout des concentrations croissantes de NaCl, ce qui mène à dire que la présence du chlorure de sodium n'a aucun effet sur la formation des complexes polyphénols-protéines BSA et que l'interaction entre ces complexes est indépendante de la force ionique.

Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par des études réalisées par Boulekbeche (2005) sur *Eucalyptus globulis* (appartenant à la même famille de *Myrtus communis*) et Benaazouz (2005) sur *Nigella sativa*. Ces auteurs ont démontré que l'interaction polyphénols-protéines est indépendante de la force ionique.

La courbe obtenue pour *Myrtus communis* montre que la densité optique diminue en fonction des concentrations croissantes en NaCl soit de 0,0150 à 0,1 M. Ce résultat peut être expliqué par l'augmentation de la solubilité de la protéine dans le milieu avec une diminution de la formation des complexes tanins-protéines et par conséquent diminution de la turbidité.

Dans leurs études sur les facteurs influençant l'interaction tanins-protéines, Kawamoto et Nakatsubo (1997) ont démontré que la précipitation des complexes tanins-protéines diminue lorsque la concentration en NaCl augmente de 0,005 à 0,1 M, ce qui est en accord avec le résultat trouvé pour *Myrtus communis*. Selon ces mêmes auteurs, la solubilité d'une protéine augmente à faible force ionique et diminue lorsque la force ionique du milieu augmente. C'est le phénomène du « Salting-out » utilisée pour la purification des protéines.

Les résultats obtenus pour *Retama sphaerocarpa* montrent qu'à des concentrations de 0,0125 à 0,05 M de NaCl, la turbidité est restée stable et l'interaction entre polyphénols-BSA est indépendante de la force ionique. Cependant, pour des concentrations allant de 0,05 à 0,075 M de NaCl, le trouble a augmenté suite à la formation de plusieurs complexes polyphénols-protéines BSA. L'augmentation de la force ionique dans le milieu a conduit à la diminution de la solubilité des protéines. La répulsion électrostatique entre les molécules de protéines étant minimisés et par conséquence la précipitation a augmentée.

La présence des ions K^+ , Na^+ favorise la précipitation des complexes polyphénols-protéines. Ces ions inorganiques se fixent sur les protéines, diminuent leur solubilité et augmentent les surfaces hydrophobes accessibles aux polyphénols. Dans ce cas, les liaisons impliquées dans cette interaction sont de type hydrophobe (Simon, 2003).

Conclusion

Conclusion

Les phytothérapeutes soutiennent que la plante et ses composants actifs sont incontestablement des atouts de poids pour conserver un état de santé optimal et juguler les effets néfastes des radicaux libres. Cette nouvelle approche et l'intérêt croissant porté à la phytothérapie sont riches de perspectives pour la qualité de la vie. En se basant sur des considérations générales, le travail entrepris a pour objectif l'extraction et le dosage des différents composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante des feuilles de plantes.

De l'analyse des résultats obtenus, il ressort que les teneurs en eau des feuilles varient de 49 à 55 %, ce qui confirme leurs richesses hydriques. Les rendements sont supérieurs à 50 % pour toutes les plantes, quant aux composés phénoliques, le dosage des polyphénols totaux a révélé la richesse des plantes en ces composés. *Myrtus communis* et *Globularia alypum* présentent les teneurs les plus élevées. Les résultats du dosage des polyphénols polaires sont marqués par les faibles teneurs, laissant ainsi apparaître les polyphénols apolaires qui représentent plus de 73 % par rapport aux polyphénols totaux. *Globularia alypum* et *Rhamnus alaternus* sont les plantes les plus riches en flavonoïdes. Les teneurs moyennes en tanins varient significativement entre les plantes. *Retama sphaerocarpa* présente une quantité de tanin très négligeable devant *Myrtus communis* qui a la teneur la plus élevée.

Les pourcentages d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique par les échantillons varient de 40 à 48 % d'où les extraits sont tous des inhibiteurs efficaces de la peroxydation lipidique et leur pouvoir d'inhibition est comparable à celui du BHA. Les industries agroalimentaires et pharmaceutiques peuvent mettre à profit la propriété antioxydante de ces extraits de plantes pour assurer une meilleure conservation des aliments, de produire de meilleurs médicaments et de substituer l'agent de conservation chimique, le BHA qui est suspecté d'avoir des effets carcinogènes.

Les résultats de l'activité antiradicalaire et du pouvoir réducteur ont fait ressortir, par ordre décroissant, les plantes ayant une forte activité : *M. communis*, *G. alypum* et *P. lentiscus*. Cependant, *R. alaternus* et *R. sphaerocarpa* ne présentent qu'un faible pouvoir réducteur.

Un coefficient de corrélation linéaire élevé est trouvé entre les teneurs en polyphénols totaux et les tests du pouvoir antiradicalaire ($r = 0,90$) et du pouvoir réducteur ($r = 0,87$). L'étude des interactions polyphénols-protéines a montré que la turbidité est fortement influencée par la concentration des extraits. L'interaction entre les extraits de *G. alypum*, *R. alaternus*, *P. lentiscus* et la protéine BSA a révélé que la présence du chlorure de sodium n'a aucun effet sur la formation des complexes polyphénols-protéines BSA et que l'interaction entre ces complexes est indépendante de la force ionique. Cependant, *M. communis* et *R. sphaerocarpa* ont montré une sensibilité à des fourchettes de force ionique plus ou moins variable.

A la lueur de ces résultats, il n'est donc pas interdit de penser qu'un apport d'antioxydants puisse se révéler bénéfique pour notre organisme. Toutefois, il faut garder à l'esprit que l'utilisation massive d'antioxydants peut entraîner des effets contraires à ceux espérés. Néanmoins, de nombreuses lacunes demeurent dans l'arsenal thérapeutique contre le stress oxydant et les maladies engendrées. Il est donc capital d'enrichir les banques de données de référence sur les plantes médicinales. L'idéal serait d'aboutir à une prospection de nouvelles plantes. En effet, il faut essayer de collecter l'ensemble des plantes, s'assurer que le peuplement de la plante est suffisant pour permettre un ravitaillement important ; mais aussi de recenser toutes les informations sur les usages traditionnels en vue de mieux les connaître.

Ce travail doit être complété par d'autres études afin d'étayer les connaissances au sujet des antioxydants. Il serait donc intéressant :

- d'établir un protocole d'extraction plus sélectif suivi d'un lavage des extraits par des solvants organiques en vue d'éliminer d'éventuelles substances interférentes ;

- d'étendre l'étude sur d'autres parties des plantes telles que les tiges, les fruits et les racines ;
- d'identifier les molécules responsables de l'activité antioxydante et de tester leur pouvoir antioxydant sur d'autres espèces radicalaires ;
- d'identifier les composés phénoliques contenus dans chaque plante par des techniques d'analyses fines telles que l'HPLC, RMN et la GC-MS ;
- de déterminer la composition en polyphénols de chaque plante ;
- de réaliser des essais *in vivo* sur les antioxydants de plantes afin de voir leur éventuel effet dans les milieux biologiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Agarwal S. and Rao A. V., 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic disease. *Canadian Medical Association*, 163 (6): 739-744.

Al-Ismail K. M. and Aburjai T., 2004. Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 173-178.

Albrecht R., 1994. Aspects nutritionnels de la protection antiradicalaire. *Médecine et Nutrition*, 111 (1): 19-24.

Allen J., Pure O. and Chen A., 1994. Absorption, transport and metabolism of carotenoids in humans. *Biochemistry and Biophysics*, 66 (5): 1011-1016.

Al-Mamary M., Al-Meerri A. and Al-habori M., 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22: 1041-1047.

Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. and Trinajstić N., 2003. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76 (1): 55-61.

Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., Mc Donald S. and Robards K., 2002. **Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127: 183-198.**

Araya-Farias M., 1999. La clarification du jus de pomme par électroflottation. *Mémoire (Maître ès Sc.)*. Université Laval: 4-12.

Auddy B., Ferreira M., Blasina F., Lafon L., Arredondo F., Dajas F., Tripathi P. C., Seal T. and Mukherjee B., 2003. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 84: 131-138.

Aurousseau B., 2002. **Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA Productions Animales*, 15 (1): 67-82.**

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Gazin M., Cazin J. G. and Pinkas M., 1996. **Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzeimittle-forschung*, 46 (11): 1086-1089.**

Balasundram N., Sundram K. and Samman S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.

Bas J. M., Crisanto Gómez C. and Pons P., 2005. Fruit production and predispersal seed fall and predation in *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Acta Oecologica*, 27: 115-123.

- Beloued A. K., 2001.** Nigelle cultivée. In « Plantes médicinales d'Algérie ». Edition Office de Publications Universitaires: 144-145.
- Benaazouz L., 2005.** Etude des interactions polyphénols protéines: étude de cas *Nigella sativa*. *Mémoire de magister*, Université de Béjaia: 69.
- Bennick A., 2002.** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Review in Oral Biological Medicine*, 13(2): 184-196.
- Benzie I. I. F. and Strain J. J., 1996. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay.** *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Berger M. M., 2006.** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20: 48-53.
- Bermond P., 1991.** Radicaux libres et vieillissement. *Cahier de Nutrition Diététique*, 26 (6): 403-407.
- Bremness L., 2005.** Plantes aromatiques et médicinales. Edition Larousse: 74-116.
- Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M. and Torch M., 1986.** Les plantes dans la thérapeutique moderne. 2^{ème} Edition Maloine: 297-360.
- Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torch M. and Trotin F., 1980.** Plantes médicinales des régions tempérées. 2^{ème} Edition Maloine: 147-278.
- Bhandari M. R. and Kawabata J., 2004.** Organic acid, phenolic content and antioxidant activity of wild yam (*Dioscorea* spp.) tubers of Nepal. *Food Chemistry*, 88: 163-168.
- Blomhoff R., 2005.** Dietary antioxydants and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, 16: 47-54.
- Bonnefont-Rousselot D., Peynet J., Beaudeau J. L., Thérond P., Legrand A. B. and Delattre J., 2002.** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et Métabolisme*, 16: 260-267.
- Bouabdallah F. and Mekkaoui A., 1993.** Cours de biophysique. Edition Office des Publications Universitaires: 1-5.
- Boulekbache L., 2005.** Profil GC-MS des polyphénols d'une plante médicinale: *Eucalyptus globulus*. *Mémoire de Magister*, Université de Béjaia: 65-66.
- Cacace J. E. and Mazza G., 2002.** Extraction à l'eau sulfurée des anthocyanines et d'autres composés phénoliques du cassis. *Institut National de Technologie Agricole*.Canada: 1-16.
- Cakir A., 2004.** Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 809-816.

- Çaliş İ., Kirmizibekmez H., Taşdemir D. and Ireland C. M., 2002.** Iridoid Glycosides from *Globularia davisiana*. *Chemistry Pharmaceutical Bulletin*, 50 (5): 678-680.
- Caravaca F., Alguacil M. M., Figueroa D., Barea J. M. and Roldán A., 2003.** Re-establishment of *Retama sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in a semi-arid Mediterranean area. *Forest Ecology and Management*, 182: 49-58.
- Carrasco-Pancorbo A., Cerrtani L., Segura-Carretero A., Del Carlo M., Gallina-Toschi T., Lercker G., Compagnone D. and Fernandez-Gutiérrez A., 2005.** Evaluation of antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 8918-8925.
- Carvalho E., Mateus N. and Freitas V. d., 2004.** Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. *Analytica Chimica Acta*, 513: 97-101.
- Castelluccio C., Paganga G., Melikian N., Bolwell G. P., Pridham J., Sampson J. and Rice-Evans C., 1995.** Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 368: 188-192.
- Castola V., Bighelli A. and Casanova J., 2000.** Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 79-88.
- Castronovo V., 2003.** Alimentation et cancer. *Review Medical Liege*, 58 (4): 231-239.
- Chanwitheesuk A., Teerawutgulrag A. and Rakariyatham N., 2005.** Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*, 92: 491-497.
- Cheeseman K. H. and Slater T. F., 1993.** An introduction to free radicals biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49: 481-493.
- Choi C. W., Kim S. C., Hwang S. S., Choi B. K., Ahn H. J., Lee M. Y. Park S. H. and Kim S. K., 2002.** Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163: 1161-1168.
- Chung K. T., Wong T. Y., Wei C. I. and Huang Y. W., 1998.** Tanins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (6): 421-464.
- Ciccarelli D., Andreucci A. C., Pagni A. M. and Garbari F., 2005.** Structure and development of the elaiosome in *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) seeds. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200: 326-331.
- Clarkson P. M. and Thompson H. S., 2000.** Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal Clinical Nutrition*, 72: 637-646.

- Correia O. and Diaz Barradas M. C., 2000.** Ecophysiological differences between male and female plants of *Pistacia lentiscus* L. *Plant Ecology*, 149: 131–142.
- Cowan M. M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4): 564-582.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A. and Capasso F., 1999.** Flavonoids: old and new aspect of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, 65 (4): 337-353.
- De Moffarts 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.
- 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.
- Djerroumi A. and Nacef M., 2004.** 100 plantes médicinales d'Algérie. Edition Palais du livre : 159.
- Dodet B., 1991.** La chasse aux radicaux libres oxygénés. *Biofutur*, 3: 23-35.
- Droy-Lefaix M. T., Ferradini C. and Gardes-Albert M., 1993.** Les radicaux libres en 10 questions. *Laboratoire de chimie-physique URA* : 5-45.
- Duan X., Jiang Y., Su X., Zhang Z. and Shi J., 2007.** Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. *Food Chemistry*, 101: 1365-1371.
- Ducros V. and Favier A., 2004.** Métabolisme du sélénium. *EMC Endocrinologie*, 1: 19-28.
- Duru M. E., Cakir A., Kordali S. H., Zengin H., Harmandar M., Izumi S. and Hirata T., 2003.** Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia*, 74: 170-176.
- Dutta D., Chaudhuri U. R. and Chakraborty R., 2005.** Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Biotechnology*, 4 (13): 1510-1520.
- Elbetieha A., Oran S. A., Alkofahi A., Darmani H. and Raies A. M., 2000.** Fetotoxic potentials of *Globularia arabica* and *Globularia alypum* (Globulariaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 72: 215-219.
- Endo T., Nakagauva T., Iguchi F., Kita T., Okano T., Sha S. H., Schacht J., Shiga A., Kim T. S. and Ito J., 2005.** Elevation of superoxide dismutase increases acoustic trauma from noise exposure. *Free Radical Biology and Medicine*, 38: 492-498.
- Englberger L., Aalbersberg W., Ravi P., Bonnin E., Marksa G. C., Fitzgerald M. H. and Elymore J., 2002.** Further analysis on micronesian banana, taro, breadfruit and other

foods for provitamin A carotenoids and minerals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16: 219-236.

Escribano-Bailón M. T. and Santos-Buegla C., 2003. Polyphenol extraction from foods. In "Method in polyphenol analysis". Edition Royal Society of Chemistry: 1-16.

Espigares T., López-Pintor A. and Rey-Benayas J. M., 2004. Is the interaction between *Retama sphaerocarpa* and its understorey herbaceous vegetation always reciprocally positive? Competition-facilitation shift during *Retama* establishment. *Acta Oecologica*, 26: 121-128.

Es-Safi N., Khlifi S., Kolimann A., Kerhoas L., El-Abbouyi A. and Ducrot P. H., 2006. Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54 (1): 85-88.

Es-Safi N., Kollmann A., Khlifi S. and Ducrot P. H., 2007. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure-activity relationship. *LWT*, 40: 1246-1252.

Fang Y. Z., Yang S. and Wu G., 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18: 872-879.

Faulks R. M. and Southon S., 2000. Carotenoids, metabolism and disease in handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC Press, 143-156. *Food Chemistry*, 83: 595-600.

Favier A., 2003. Le stress oxydant. L'actualité chimique: 108-115.

Feldman K. S., Sambandam A., Lemon S. T., Nicewonger R. B., Long G. S., Battaglia D. F., Ensel S. M. and Laci M. A., 1999. Binding affinities of gallotannin analogs with bovine serum albumin: ramifications for polyphenol-protein molecular recognition. *Phytochemistry*, 51: 867-872.

Fickel J., Pitra C., Joest B. A. and Hofmann R. R., 1999. A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 122: 225-229.

Fintelman V. and Weiss R. F., 2004. Manuel pratique de phytothérapie. Edition Vigot: 3-6.

Fioretto A., Papa S., Curcio E., Sorrention G. and Fuggi A., 2000. Enzyme Dynamics on decomposing leaf litter of *Cistus incanus* and *Myrtus communis* in a Mediterranean ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1847-1855.

Flamini G., Cioni P. L., Morelli I., Maccioni S. and Baldini R., 2004. Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy). *Food Chemistry*, 85: 599-604.

Freitas V. D., Carvalho E. and Mateus N., 2003. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, 81: 503-509.

- Friedli G. I., 1996.** Interaction of Deamidated soluble wheat protein (SWP) with other food proteins and metals. Thèse de Doctorat Philosophie. Université de Surrey.
- Fujisawa S., Kadoma Y. and Yokoe I., 2004.** Radical-scavenging activity of butylated hydroxytoluene (BHT) and its metabolites. *Chemistry and Physics of Lipids*, 130: 189-195.
- Fungairiño S. G., Fernández C., Serrano J. M., López F. and Acosta F. J., 2005.** Developmental instability and plant potential fitness in a Mediterranean perennial plant, *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. *Acta Oecologica*, 27: 43–48.
- Furusawa M., Tanaka T., Ito T., Nishikawa A., Matsuura N., Tsuchiya H., Nagayama M. and Linuma M., 2005.** Antioxidant activity of hydroxyflavonoids. *Journal of Health Science*, 51 (3): 376-378.
- Gausсен H., Leroy J-F. and Ozenda P., 1982.** Précis de Botanique. Edition Masson: 365.
- Geletii Y. V., Balavoine G. G. A., Efimov O. N. and Kulikova V. S., 2002.** The determination of total concentration and activity of antioxidants in foodstuffs. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 28 (6): 501-514.
- Ghedira K., 2005.** Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4: 162-169.
- Gieseler H., 2004.** Product Morphology and Drying Behavior delineated by a new Freeze-Drying Microbalance. *Thèse de Doctorat*, Université d'Erlangen-Nürnberg: 45.
- Gilgun-Sherki Y., Melamed E. and Offen D., 2001.** Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40: 959–975.
- Giovannucci E., 2002.** A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 277: 852-859.
- Gonzalez L., Soutou L., Gonzalez X., Soutou C. and Reigosa M. J., 1995. **Allelopathic effects of *Acacia melanoxylon* R.Br. phyllodes during their decomposition.** *Forest Ecology and Management*, 77: 53-63.
- Gorinstein S., Cvikrova M., Machackova I., Haruenkit R., Park Y. S., Jung S. T, Yamamoto K., Martinez Ayala A. L., Katrich E. and Trakhtenberg S., 2004.** Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweeties and grapefruits. *Food Chemistry*, 84: 503-510.
- Green J. J., Baddeley J. A., Cortina J. and Watson C. A., 2005.** Root development in the Mediterranean shrub *Pistacia lentiscus* as affected by Nursery treatments. *Journal of Arid Environments*, 61: 1-12.
- Guignard J. L., 2001.** Botanique systématique moléculaire. 12^{ème} Edition Masson: 174-179.

- Gülçin İ., Alici H. A. and Cesur M., 2005.** Determination of *in Vitro* Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53 (3): 281-285.
- Gülçin İ., Oktay M., Kirreççi E. and Küfrevioğlu Ö. I., 2003.** Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83: 371-382.
- Hagerman A. E. and Butler L. G., 1981.** The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The journal of Biological Chemistry*, 256 (9): 4494-4497.
- Hagerman A. E. and Butler L. G. 1978.** Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (4): 809-812.
- Hayder N., Abdelwahed A., Kilani S., Ben Ammar R., Mahmoud A., Ghedir K. and Chekir-Ghedira K., 2004.** Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis*. *Mutation Research*, 564: 89-95.
- Hedqvist H., 2004. **Metabolism of Soluble Proteins by Rumen Microorganisms and the Influence of Condensed Tannins on Nitrogen Solubility and Degradation.** *Thèse de Doctorat, Université Suédoise des Sciences Agronomiques: 13-17.*
- Helm J. P., Chazan J. B. and Perrin J. L., 1999. **Antioxydants.** In « **Actifs et Additifs en Cosmétologie** ». Martini M. C., Seiller M. Edition Technique et Documentation: 329-352.
- Hensley K., Benaksas E. J., Bolli R., Comp P., Grammas P., Hamdheydari L., Mou S., Pye Q. N., Stoddard M. F., Wallis G., Williamson K. S., West M., Wechter W. J. and Floyd R. A., 2004. **New perspectives on vitamin E: γ -tocophérol and carboxyethyl-hydroxychroman metabolites in biology and medicine.** *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (1): 1-15.
- Hinneburg I., Damien Dorman H. J. and Hiltunen R., 2006.** Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97: 122-129.
- Hlimi A., 2004.** Les plantes médicinales. Edition BERTI: 304.
- Ho K. Y., Huang J. S., Tsai C. C., Lin T. C., Hsu Y. F. and Lin C. C., 1999. **Antioxidant Activity of Tannin Componenets from *Vaccinium Vitis-idaea* L.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51: 1075-1078.
- Hoffmann E. M., Muetzel S. and Becker K., 2002. **A modified dot-blot method of protein determination applied in the tannin-protein precipitation assay to facilitate the evaluation of tannin activity in animal feeds.** *British Journal of Nutrition*, 87: 421-426
- Hollman P. C. H., Hertog M. G. L. and Katan M. B., 1996. **Analysis and health effects of flavonoids.** *Food Chemistry*, 57 (1): 43-46.

- Horne J., Hayes J. and Lawless H. T., 2002.** Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chemistry Senses*, 27: 653-659.
- Huang D. J., Lin C. D., Chen H. J. and Lin Y. H., 2004.** Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45: 179-186.
- Huang H., Appel L. J., Croft K. D., Miller E. R., Mori T. A. and Puddey I. B., 2002.** Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation : results of a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 549-555.
- Hurabielle M., 1981.** Généralités monographie. In « abrégé de matière medicalopharmacognosie ». Tome I, Edition Masson: 72-113.
- Jadot G., 1998.** Introduction à la superoxyde dismutase (biochimie pharmacologie, thérapeutique). Edition Masson : 1.
- Janakat S. and Al-Merie H., 2002.** Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea Latifolia* and *Nicotiana glauca*. *Journal of Ethnopharmacology*, 83: 135-138.
- Javanmardi J., Stushnoff C., Locke E. and Vivanco J. M., 2003.** Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83: 547-550.
- Josse E. M., 2003.** Caractérisation d'une oxydase terminale plastidiale impliquée dans la biosynthèse des caroténoïdes et dans la réponse au stress. *Thèse de Doctorat*. Université Joseph Fourier: 29-31.
- Jouad H., Maghrani M. and Eddouks M., 2002.** Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 351-356.
- Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A. and Stevens P., 2002.** Botanique Systématique. 1ère Edition De Boeck Université : 321-323.
- Judde A., 2004.** Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 11 (6): 414-418.
- Jung C. H., Seog H. M., Choi I. W. and Cho H. Y., 2005.** Antioxidant activities of cultivated and wild Korean ginseng leaves. *Food Chemistry*, 92: 535-540.
- Kähkönen M. P., Hopia A. I., Vuorela H. J., Rauha J., Pihlaja K., Kujala T. S. and Heinonen M., 1999. **Antioxydant activity of plant extracts containing phenolic compounds.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 3954-3962.
- Kähkönen P. M., Hopia A. and Heinonen, 2001.** Beerg polyphenols and their antioxidant activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 4076-4082.

- 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): 823-858.
- Katalinic V., Milos M., Kulisic T. and Jukic M., 2006.** Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94: 550-557.
- Kawamoto H., Nakatsubo F. and Murakami K., 1996.** Stoichiometric studies of tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry*, 41: 1427-1431.
- Kawamoto H. and Nakatsubo F., 1997.** Effects of environmental factors on two-stage tannin-protein co-precipitation. *Phytochemistry*, 46 (3): 479- 483.
- Kiokias S. and Oreopoulou V., 2006.** Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7: 132-139.
- Kivçak B. and Akay S., 2005.** Quantitative determination of α -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 76: 62-66.
- Kordali S., Cakir A., Zengin H. and Duru M. E., 2003.** Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74: 164-167.
- Lako J., Trenerry V. C., Wahlqvist M., Wattanapenpaiboon N., Heeswaranc S. and Premier R., 2007.** Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, 101: 1727-1741.
- Lampe W. J., 1999. **Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies.** *American Journal of Clinical Nutrition*, **70: 475-490.**
- Lapornik B., Prošek M. and Wondra A. L., 2005.** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71: 214-222.
- Lecerf J. M., 1999.** Les antioxydants et les autres éléments protecteurs dans les jus de fruits et de légumes. Edition Institut pasteur de Lille: 10-24.
- Leclerc H., 1999.** Précis de phytothérapie. 5^{ème} édition Masson: 14-256.
- Lee J., Koo N. and Min D. B., 2004.** Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 21-33.
- Leong L. P. and Shui G., 2002.** An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76: 69-75.

- Lesschaeve I. and Noble C., 2005.** Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal Clinical Nutrition*, 81: 5-33.
- Liégeois C., Lermusieau G. and Collin S., 2000.** Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 1129-1134.
- Liu R. H., 2004.** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 134: 3479-3485.
- López Lázaro M., Martín-Cordero C., Iglesias-Guerra F. and Ayuso Gonzalez M. J., 1998.** An isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry*, 48 (2): 401-402.
- Louisot P., 1980.** Biochimie générale et médicale. Edition Simep: 89.
- Lu Y. and Bennick A., 1998.** Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*, 43: 717-728.
- Lugasi A., Hovari J., Sagi K. V. and Biro L., 2003. **The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases.** *Acta Biologica Szegediensis*, 47: 119-125.
- Ma Y. Z., Holt N. E., Li X. P., Niyogi K. K. and Fleming G. R., 2003.** Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Pnas*, 100: 4377-4382.
- Machlin L. J. and Bendich A., 1987.** Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEBJ*, 1: 441-445.
- Mantle D., Anderton J. G., Falkous G., Barnes M., Jones P. and Perry E. K., 1998. **Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 121: 385-391.
- Martín-Cordero C., Lázaro M. L. Serrano G., Rodríguez Carvajal M. A. and Ayuso-González M. J., 1999.** Novel flavonol glycoside from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Phytochemistry*, 51: 1129-1131.
- Mateus N., Carvalho E., Luís C. and Freitas V. D., 2004.** Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta*, 513: 135-140.
- Mau J. L., Tsai S. Y., Tseng Y. H. and Huang S. J., 2005.** Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 93: 641-649.
- Mehneche A. B., 2004.** La thérapie avec les plantes médicinales. Edition Dar El Hoda: 113-117.

- Mendes M. M., Gazarini L. C. and Rodrigues M. L., 2001.** Acclimation of *Myrtus communis* to contrasting Mediterranean light environments effects on structure and chemical composition of foliage and plant water Relations. *Environmental and Experimental Botany*, 45: 165-178.
- Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractères prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; étude et applications thérapeutiques. *Thèse de Doctorat*. Université Louis Pasteur, Strasbourg I : 1-155.
- Mohd Zin Z., Abdul-Hamid A. and Osman A., 2002.** Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia*) root, fruit and leaf. *Food Chemistry*, 78: 227-231.
- Mojžišová G. and Kuchta M., 2001.** Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiological Research*, 50: 529-535.
- Molyneux P., 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*, 26 (2): 211-219.
- Mompon B., Lemaire B., Mengal P. and Surbled M., 1996. **Extraction des polyphénols: du laboratoire à la production industrielle.** In « Polyphenols 96, 18th International Conference on Polyphenols ». Edition INRA: 31-43.
- Monties B., Catesson A. M., Roland J. C., Barnoud F., Joseleau J. P., Tollier M. T., Mercier C., Thibaut J. F., Metche M., De Lestang-Bremont G. and Janin G., 1980.** Les polymères végétaux: Polymères pariétaux et alimentaires non azotés. Edition Gauthier-Villard: 345.
- Montoro P., Braca A., Pizza C. and De Tommasi N., 2005.** Structure antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry*, 92: 349-355.
- Montoro P., Tuberoso C. I. G., Perrone A. , Piacente S. , Cabras P. and Pizza C., 2006.** Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *Journal of Chromatography*, 1112: 232-240.
- Mulet L., 1997.** Flore toxique de la communauté de Valence. Edition Castellón: 490.
- Nacz M., Amarowicz R., Zadernowski R. and Shahidi F., 2001.** Protein precipitating of condensed tannins of beach pea, canola hulls, evening primrose and faba bean. *Food Chemistry*, 73: 467-471.
- Nacz M., Grant S., Zadernowski R. and Barre E., 2006. **Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits.** *Food Chemistry*, 96: 640647.
- Naik G. H., Priyadarsini K. I., Santav J. G., Banavalikar M. M., Sohoni D. P., Biyani M. K. and Mohan H., 2003. **Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine.** *Phytochemistry*, 63: 97-104.

- Naurato N., Wong P., Lu Y., Wroblewski K. and Bennick A., 1999. **Interaction of tannin with human salivary histatins.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**: 2229-2234.
- Nergiz C. and Engez Y., 2000. Compositional variation of olive fruit during ripening. *Food Chemistry*, **69**: 55-59.
- Nève J., 2002. Optimisation of dietary intake of antioxidants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16**: 292-300.
- Oboh G., 2005. Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. *LWT*, **38**: 513-517.
- Odabasoglu F., Aslan A., Cakir A., Suleyman H., Karagoz Y., Halici M. and Bayir Y., 2004. Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytotherapy Research*, **18**: 938-941.
- Ordoñez A. A. L., Gomez J. D., Vattuone M. A. and Isla M. I., 2006. **Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts.** *Food Chemistry*, **97**: 452-458.
- Owen P. L. and Johns T., 1999. Xanthine oxidase inhibitory of northeastern north american plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, **64**: 149-160.
- Papadopoulou A. and Frazier R. A., 2004. Characterization of protein Polyphenol interactions. *Trends in food science & Technology*, **15**: 186-190.
- Peschel W., Sanchez-Rabaneda, Diekmann W., Plescher A., Gartzia I., Jiménez D., Lamuela-Raventos R., Buxaderas S. and Codina C., 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, **97**: 137-150.
- Peyrat-Maillard M. N., Bonnely S. and Berset C., 2000. **Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection.** *Talanta*, **51**: 709-716.
- Pietta P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: 1035-1042.
- Pilarski R., Zielinski H., Ciesiołk D. and Gulewicz K., 2006. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, **104**: 18-23.
- Pincemail J. and Defraigne J. O., 2004. Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Symposium « Antioxydants et alimentation », Institut Danone: 1-2.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. and Defraigne J. O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolique*, **16**: 233-239.

- Pincemail J., Defraigne J. O., Meurisse M. and Limet R., 1998b.** Antioxydant et prévention des maladies cardiovasculaires, 1^{ème} partie : la vitamine C. *Medi Sphere*, 89: 1-3.
- Pincemail J., Defraigne J. O., Meurisse M. and Limet R., 1998c.** Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires, 2^{ème} partie: la vitamine E. *Medi Sphere*, 90: 1-5.
- Pincemail J., Defraigne J. O., Meurisse M. and Limet R. 1998d.** Antioxydant et prévention des maladies cardiovasculaires. 3^{ème} partie : caroténoïdes et vitamine A. *Medi Sphere. Bilan* 98: 1-4.
- Pincemail J., Lecomte J., Collart E., Castiaux J. P. and Defraigne J. O., 2001.** Stress oxydant, antioxydants et exercice physique. *Vaisseaux, Coeur, Poumons*, 6 (5): 1-3.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R. and Defraigne J. O., 1998a.** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine. *Medi Sphere*, 73: 1-4.
- Poitouti V., Tanaka Y., Reach G. and Robertson P., 2000.** Stress oxydatif, insulinosécretion, et insulinoresistance. *Pacific Northwest Research Institut, USA*: 1-5.
- Pokorny J., Yanishlieva N. and Gordon M., 2001.** Antioxidants in food. Edition Wood head Ltd., Cambridge: 153-155.
- Prakash A., 2001.** Antioxidant activity. Medallion Laboratories. *Analytical Progress*, 19 (2): 1-6.
- Prieto P., Pineda M. and Aguilar M., 1999. **Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E.** *Analytical Biochemistry*, 269: 337-341.
- Pyo Y. H., Lee T. C., Logendra L. and Rosen R. T., 2004.** Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chemistry*, 85: 19-26.
- Que F., Mao L. and Pan X., 2006.** Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*, 39: 581-587.
- Rajendran M., Manisankar P., Gandhidasan R. and Murugesan R., 2004.** Free Radicals Scavenging Efficiency of a Few Naturally Occurring Flavonoids: A Comparative Study. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 7389-7394.
- Ré D. B., Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goff L. and Had-Aissouni L., 2005.** Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate? Implication sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24: 502-509.
- Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O. and Regeat F., 1996.** Interest of polyphenols in preventive nutrition. *Polyphenols 96, les colloques n° 87*: 251-263.

Reuben C., 1995. Preventing and healing diseases with antioxidants. In “antioxidants your complete guide”. Edition Prima: 79-203.

Rhodes M. J. C., 1998. Physiological roles of phenolic compounds in plants and their interactions with microorganisms and humans. Polyphénols 96, Edition INRA, Les Colloques n° 87: 13-43.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P. and Ribéreau-Gayon P., 1982. Composés phénoliques. In “Traité d’œnologie, sciences et technique du vin ». Edition Dunod: 477-499.

Ribéreau-Gayon P., 1968. Propriétés chimiques des phénols. In « Les composés phénoliques des végétaux ». Edition Dunod: 29-57.

Rice-Evans C. A., Miller N. J. and Paganga G., 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20 (7): 933-956.

Rice-Evans C. A., Miller N. J. and Panganga G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science Reviews*, 2 (4): 152-159.

Richter G., 1993. **Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie.** Edition Presse polytechnique et universitaire romande: 526.

Robards K. and Antolovich M., 1997. **Analytical chemistry of fruit bioflavonoids.** *Analyst*, 122: 11-34.

Robbins R. J., 2003. Phenolic acids in foods. An overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 2866-2887.

Roginsky V. and Lissi E. A., 2005. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** *Food Chemistry*, 92: 235-254.

Roland S., John F. and Keaney J. R., 2004. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Review*, 84: 1381-1478.

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 (2): 79-86.

Romani A, Coinu R, Carta S, Pinelli P, Galardi C, Vincieri F. F. and Franconi F., 2004. **Evaluation of antioxidant effect of different extract of *Myrtus communis* L.** *Free Radical Research*, 38 (1): 97-103.

Sá M. C. and Rodriguez-Amaya D. B., 2003. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. *Food Chemistry*, 83: 595–600.

Saari H., 1991. **Oxygen derived free radicals and synovial fluid hyaluronate.** *Annals of the Rheumatic Diseases*, **50**: 389-392.

Salah N., Miller N. J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell G. P. and Rice-Evans C., 1995. Polyphenolic Flavanols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as Chain-Breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **322** (2): 339-346.

Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A. and Saura-Calixto F., 1999. **Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents.** *Food Research International*, **32**: 407-412.

Sallé J. L., 1991. Le totum en phytothérapie, approche de la phyto-biothérapie. Edition Frison-Roche : 13-14.

Santos-Buelga C. and Scalbert A., 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 1094-1117.

Scalbert A. and Mazur A., 2003. Dietary polyphenols and the prevention of atherosclerosis. *NAFAS*, **1** (2): 3-7.

Schauenberg P. and Paris F., 2005. Guide des plantes médicinales. Edition Beta: 301.

Servais S., 2004. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : effets de l’âge et d’une supplémentation en oméga-3. *Thèse de Doctorat*. L’université Claude Bernard Lyon-1: 163.

Siebert K. J. and Chassy A. W., 2003. **An alternate mechanism for the astringent sensation of acids.** *Food Quality and preference*, **15**: 13-18.

Siebert K. J., Troukhanova N. V. and Lynn P. Y., 1996. **Nature of polyphénol-protein interactions.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **44**: 80-85.

Simon C., 2003. **Structure et dynamique de protéines de la salive humaine en interaction avec les tanins du vin de Bordeaux.** *Thèse doctorat*, Université de Bordeaux: 219.

Singleton V. L. and Rossi J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybde-phosphotungstic acids reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**: 144-158.

Skim F., Kaaya A., Jaouhari J. T., Lazrek H. B., Janab M. and El Amric H., 1999. Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. *Fitoterapia*, **70**: 382-389.

Small E. and Catling P. M., 2000. Les cultures médicinales canadiennes. Edition Presses scientifiques du CNRC, Canada: 281.

Soobrattee M. A., Neergheen V. S., Luximon-Ramma A., Aruoma O. I. and Bahorun T., 2005. **Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions.** *Mutation Research*, 579: 200-213.

Spichiger R. E., Savolainen V. V., Figeat M. and Jeanmonod D., 2002. Botanique systématique des plantes à fleurs. 2^{ème} Edition Press polytechniques et Universitaire Romandes: 202-212.

Stahl W. and Sies H., 2004. **Bioactivity and protective effects of natural carotenoids.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740: 101-107.

Stocker P., Yousfi M., Djerridane O., Perrier J., Amziani R., El Boustani S. and Moulin A., 2004. Effect of flavonoids from various Mediterranean plants on enzymatic activity of intestinal carboxyesterase. *Biochimie*, 86: 919-925.

Tamimi R. M., Lagiou P., Adami H. O. and Trichopoulos D., 2002. Prospects for chemoprevention of cancer. *Journal of Internal Medicine*, 251: 286-300.

Tassou C. C. and Nychas J. E., 1995. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Mastic Gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia.*) on Gram Positive and Gram Negative Bacteria in Broth and in Model Food System. *International Biodeterioration and biodegradation*, 36: 411-420.

Tessier F. and Marconnet P., 1995. Radicaux libres, système antioxydant et exerce. *Science et Sport*, 10: 1-13.

Tomás-Barberá F. A. and Espin J. C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 853-876.

Toor R. K., Savage G. P. and Lister C. E., 2006. Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 1-10.

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.

Valnet J., 2003. Phytothérapie. 6^{ème} Edition Vigot: 368-467.

Vinson J. A., Dabbagh Y. A., Serry M. M. and Jang J., 1995. Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, Are Powerful Antioxidants Using an *in Vitro* Oxidation Model for Heart Disease. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 2800-2802.

Vivot E., Muñoz J. D., Cruaños M. C., Cruaños M. J., Tapia A., Hirschmann G. S., Martinez E., Di Sapio O., Gattuso M. and Zacchino S., 2001. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *Affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 65-71.

Wang S. Y. and Jiao H., 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 5677-5684.

Wang Y., Mao L. and Hu X., 2004. Insight into the structural role of carotenoids in the photosystem I. *Biophysical Journal*, 86: 3097-3111.

Williams R. J., Spencer J. P. E. and Rice-Evans C., 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free Radical Biology & Medicine*, 36 (7): 838-849.

Wilox J. K., Catignani G. L. and Lazarus S., 2003. Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43: 1-18.

Wilson A. and Salamantian L., 2003. Les radicaux libres : Une question d'équilibre. DESS IST. Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines : 1-35.

Wong C. C., Li H. B., Cheng K. W. and Chen F., 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97: 5-711.

Wroblewski K., Muhandiram R., Chakrabartty A. and Bennick A., 2001. The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. *European Journal of Biochemistry*, 268: 4384-4397.

Yan Q. and Bennick A., 1995. Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochemical Journal*, 31: 341-347.

Yen, G. and Hsieh C., 1998. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 3952-3957.

Zhiyong C. and Yuanzong L., 2004. **Reducing power: the measure of antioxidant activities of reductant compounds?** *Redox Report*, 9 (4): 213-216.

Références électroniques

- Anonyme 1, 2006**3
<http://images.google.fr/images?hl=fr&q=globularia%20alypum&ie=UTF-8&oe=UTF-8&um=1&sa=N&tab=wi>
- Anonyme 2, 2006**5
<http://images.google.com/images?hl=fr&q=Myrtus+communis&gbv=2>
- Anonyme 3, 2006**7
<http://images.google.com/images?gbv=2&svnum=10&hl=fr&sa=X&oi=spell&resnum=0&ct=result&cd=1&q=Pistacia+lentiscus&spell=1>
- Anonyme 4, 2006**9
<http://images.google.com/images?q=Retama+sphaerocarpa&gbv=2&ndsp=20&svnum=10&hl=fr&start=40&sa=N>
- Anonyme 5, 2006**11
<http://images.google.com/images?svnum=10&hl=fr&gbv=2&q=Rhamnus+alaternus>

Glossaire

Adduits : En chimie, résultat d'une réaction d'addition.

Angiosperme : Végétal phanérogame dont les organes reproducteurs sont condensés en une fleur et dont les graines fécondées sont enfermées dans un fruit.

Apoptose : Mort cellulaire programmée.

Athérome : Dépôt de plaques riches en cholestérol sur la paroi interne des artères, finissant par provoquer l'athérosclérose.

Calice : Ensemble des sépales ou ensemble des pièces les plus externes du périanthe.

Capitule : Inflorescence dense regroupée sur l'extrémité élargie du pédoncule.

Cataracte : Opacification partielle ou totale du cristallin, due à l'altération du métabolisme des fibres cristalliniennes et responsable d'une baisse progressive de la vision.

Catharre : Inflammation aiguë ou chronique d'une muqueuse, surtout dans les voies aériennes supérieures (nez, pharynx), avec hypersécrétion non purulente de ses glandes.

Contusion : Lésion produite par un coup, un choc ou une compression sans plaie des téguments.

Corolle : Ensemble des pétales d'une fleur.

Dépuratif : Se dit de tisanes et de médications auxquelles on attribuait la propriété de débarrasser l'organisme de ses toxines et de ses déchets.

Dicotylédone : Plante à fleurs herbacées ou arborescentes, à feuilles aux nervures ramifiées et dont la graine contient une plantule, le plus souvent à deux cotylédons.

Diurétique : Se dit d'une substance qui augmente la diurèse et qui peut éventuellement être utilisée contre l'hypertension artérielle ou contre les œdèmes et l'insuffisance cardiaque.

Eczéma : Dermatose allergique très fréquente, caractérisée surtout par une rougeur, de fines vésicules, des squames ainsi que des démangeaisons.

Expectorant : Fluidifiant bronchique facilitant l'expectoration des sécrétions produites par les voies respiratoires inférieures (trachée, bronches, alvéoles pulmonaires).

Feuille alterne : Chaque feuille s'insère à un niveau différent de la précédente.

Foliole : Chacune des divisions d'une feuille composée.

Furoncle : Infection aiguë et suppurée d'un follicule pilo-sébacé par un staphylocoque

Goutte : Maladie métabolique à manifestations articulaires, rénales, cutanées (tophus), liée à une surcharge organique en acide urique.

Inflammation : Ensemble de phénomènes réactionnels se produisant suite à la réponse des tissus conjonctifs, vascularisés, à une agression (traumatisme, infection, etc.), pouvant se manifester par divers signes (douleur, tuméfaction, chaleur, rougeur, etc.).

Inflorescence : Ensemble des fleurs regroupées sur le même axe chez un spermaphyte. .

Ischémie : Diminution ou arrêt de la circulation artérielle dans une région plus ou moins étendue d'un organe ou d'un tissu.

Jaunisse : Maladie qui se caractérise par la coloration jaune de la peau suite à la présence d'un excès de bilirubine dans le sang.

Lancéolée: En pointe de lance ou de flèche, plus large à la base.

Laxatif : Se dit d'une substance facilitant l'évacuation des selles, sans irritation locale ou générale, employée contre la constipation.

Leucémie : Maladie maligne, aiguë ou chronique, caractérisée par la prolifération dans la moelle osseuse (leucose), et éventuellement dans les autres organes lymphoïdes, de globules blancs ou de leurs précurseurs, qui peuvent se répandre dans le sang (leucémie proprement dite).

Lipofuschine : C'est un pigment jaune constitué par la liaison de lipides et de protéines, liaison qui se forme après la peroxydation des acides gras membranaires dans des cellules vieillissantes.

Maladie d'Alzheimer : Trouble neurodégénératif qui entraîne, progressivement, la perte des fonctions mentales, suite à la détérioration du [tissu cérébral](#) (perte de neurones cholinergiques), conduisant, après un stade pré-démence à un tableau de [démence](#).

Maladie de Parkinson : C'est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire du cerveau. Parmi les symptômes, il y a : transpiration excessive, mouvements involontaires et troubles psychologiques.

Oblongue : Une feuille oblongue est nettement plus longue que large et ses deux extrémités sont arrondies.

Oedèmes pulmonaires : Inondation plus ou moins importante des alvéoles pulmonaires par passage d'une sérosité albumineuse d'un milieu vasculaire vers le milieu extravasculaire.

Oligurie : Diminution du volume des urines (moins de 500 millilitres par 24 heures).

Paripennées : Se dit des feuilles pennées qui se terminent au sommet par deux folioles opposées.

Purgative : Se dit d'une substance à l'action laxative, qui provoque l'évacuation du contenu des intestins.

Reperfusion : Rétablissement de la conduction de la circulation sanguine. Ce phénomène est initié par la synthèse des radicaux libres et la libération des cytokines et conduit à la mort cellulaire.

Scavenger : Terme anglo-saxon qui signifie piègeur.

Sclérose latérale amyotrophique : Affection dégénérative qui touche des patients âgés. La maladie se présente sous deux formes : une forme bulbaire, qui est responsable de troubles de la déglutition et de la phonation, et une forme spinale avec une amyotrophie des membres inférieurs et/ou supérieurs

Sédatif : Se dit d'une substance qui agit contre la douleur, l'insomnie ou qui modère l'activité d'un organe.

Sessile: Se dit d'une fleur sans pédoncule ou sans pétiole, qui naît sur la tige ou sur la branche.

Spermaphyte : Ensemble des gymnospermes et des angiospermes ou plantes à graines nues et à graines en close dans un fruit.

Tell : C'est un ensemble des régions humides d'Afrique du Nord dominant les plaines littorales.

Térébinthacée : Famille d'arbres ou arbustes à feuilles alternes, à fleurs généralement unisexuées, au fruit drupacé, tels que le pistachier et l'anacardier.

Tumeur : Processus pathologique où la prolifération exagérée des cellules aboutit à une surproduction tissulaire qui persiste et a tendance à s'accroître.

Vivace : Se dit d'une plante dont la période de végétation s'étend sur plusieurs années, même lorsque les parties souterraines (rhizomes, bulbe, tubercule, etc.) subsistent seules en hiver.

Annexes

Annexe 1 : Matériel et réactifs utilisés

a/ Matériel

Agitateur magnétique (RAYPA AG5)

Bain-marie (MEMMERT)

Balance de précision (BP 310 P)

Balance (SARTORIUS)

Broyeur électrique (A11 BASIC)

Centrifugeuse (SIGMA 2-16 K)

Etuve (BINDER, BD 53)

pH mètre (HANNA , pH 210)

Rotavapor (BÜCHI R-200)

Spectrophotomètre (UV mini 1240, SHIMADZU)

Tamiseur (RHEINISCHE STR 36, de 45 à 500 μm)

b/ Réactifs

- **Acide acétique glacial** (PROLABO)
- **Acide gallique** (SIGMA)
- **Acide linoléique** (PROLABO)
- **Acide tannique** (SIGMA)
- **Acide trichloroacétique** (PROLABO)
- **Carbonate de sodium** (PROLABO)
- **Chlorure ferrique** FeCl_3 (PROLABO)
- **Chlorure ferreux** FeCl_2 (PROLABO)
- **DPPH** (SIGMA)
- **Ethanol 99,5 %** (PROLABO)
- **Ferricyanure de potassium** $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (PROLABO)
- **Folin-Ciocalteu (2 N)** (SIGMA)
- **HCl 36 %** (PROLABO)
- **Méthanol pur** (PROLABO)
- **NaCl** (PROLABO)
- **NaH_2PO_4** (PROLABO)
- **Na_2HPO_4** (PROLABO)
- **Quercetine** (SIGMA)
- **Sérum Albumine Bovine** (FISHER LABOSI)
- **SDS** (PROLABO)
- **Trichlorure d'aluminium** (AlCl_3) (PROLABO)
- **Triéthanolamine** (PROLABO)

Annexe 2 : Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des polyphénols

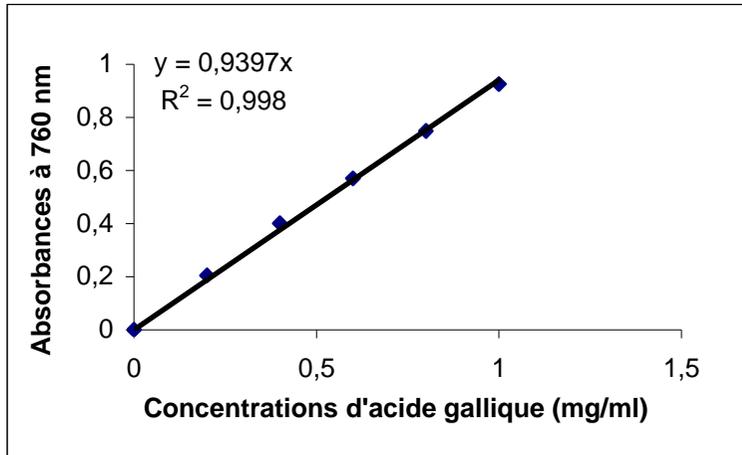


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques totaux

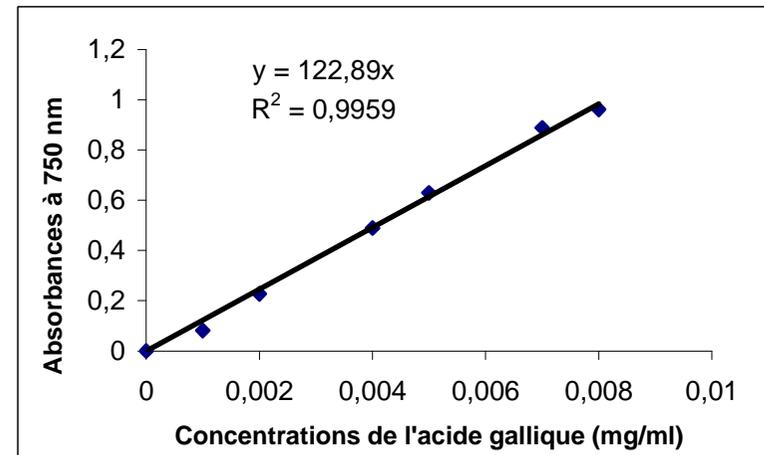


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques polaires

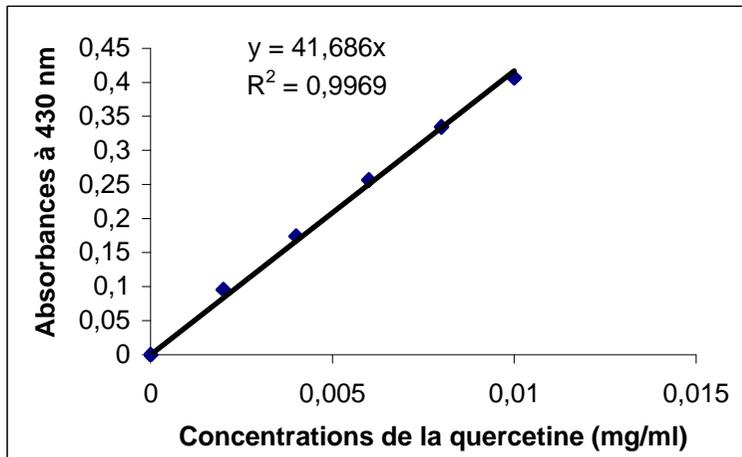


Figure 3 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux

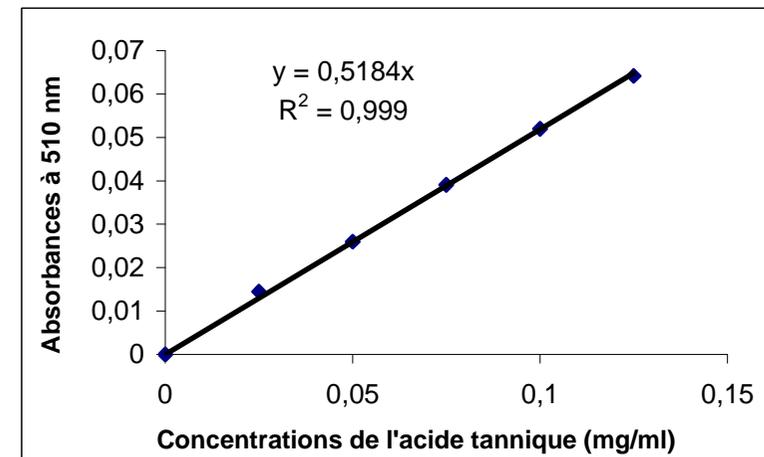


Figure 4 : Courbe d'étalonnage des tanins

Annexe 3 : Courbes d'étalonnages utilisées pour la détermination des équivalents d'antioxydants

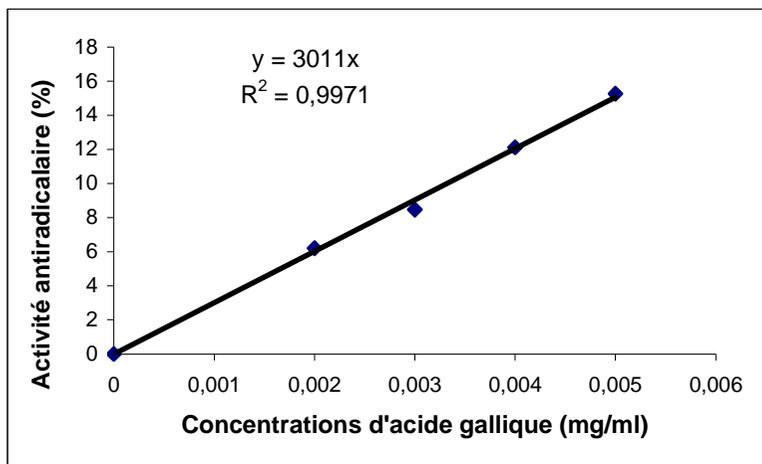


Figure 1 : Activité antiradicalaire en fonction de la concentration de l'acide gallique

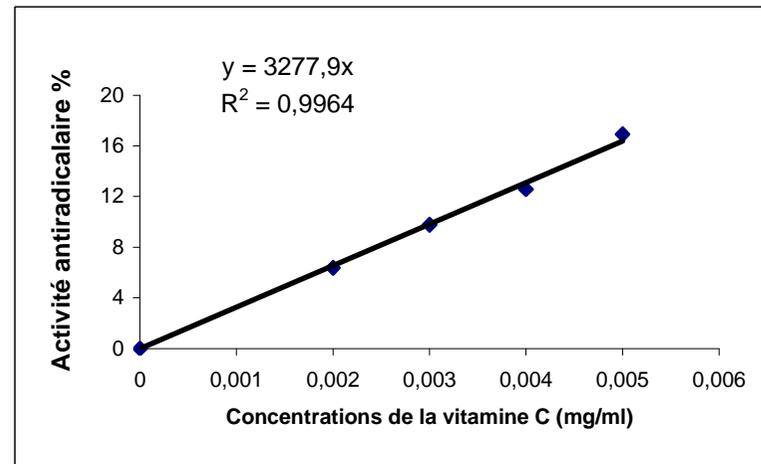


Figure 2 : Activité antiradicalaire en fonction de la concentration de la vitamine C

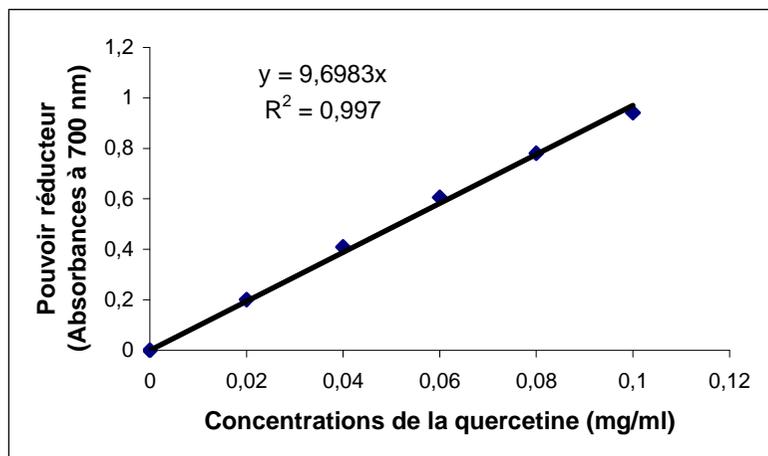


Figure 3 : Pouvoir réducteur en fonction de la concentration de la quercetine

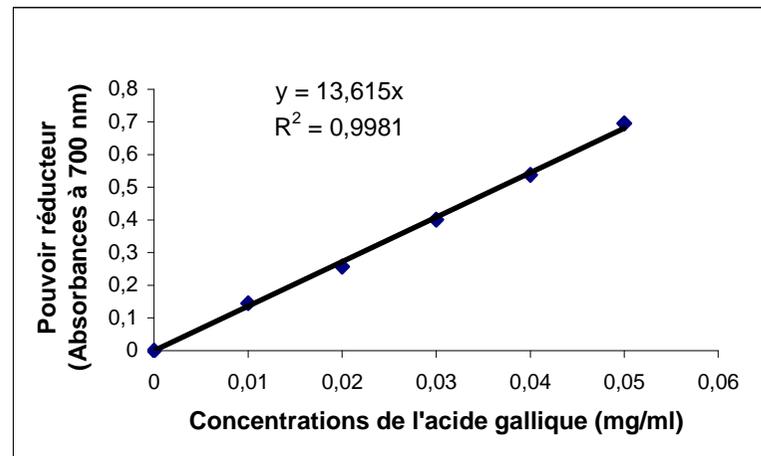


Figure 4 : Pouvoir réducteur en fonction de la concentration de l'acide gallique

Annexe 4 : Résultats du dosage des composés phénoliques

	Teneurs exprimées en mg/g de poudre				
	Polyphénols totaux	Flavonoïdes totaux	Tanins	Polyphénols polaires	Polyphénols apolaires
	mg EAG/g	mg EQ/g	mg EAT/g	mg EAG/g	mg EAG/g
<i>Pistacia lentiscus</i>	63,78 ± 1,60	8,473 ± 0,93	73,75 ± 4,91	10,71 ± 1,05	53,07 ± 0,75
<i>Globularia alypum</i>	187,81 ± 11,30	33,686 ± 0,06	57,46 ± 0,73	20,38 ± 1,43	167,43 ± 10,91
<i>Rhamnus alaternus</i>	117,04 ± 10,22	25,223 ± 0,22	33,92 ± 1,94	21,31 ± 0,88	95,73 ± 9,73
<i>Retama sphaerocarpa</i>	124,63 ± 6,47	10,29 ± 0,49	24,33 ± 1,31	32,49 ± 1,56	92,14 ± 5,77
<i>Myrtus communis</i>	171,45 ± 1,78	8,779 ± 0,13	298,9 ± 6,39	41,49 ± 1,75	129,95 ± 0,86

Abstract

Recently, interest in medicinal plants increased mainly due to their health-promoting properties. In this study, methanolic extracts from *Globularia alypum*, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*, *Retama sphaerocarpa* and *Rhamnus alaternus* were measured for their different phenol contents, antioxidant activities using the inhibition of linoleic acid peroxidation, DPPH radical scavenging activities and ferric reducing power tests. The interaction between their polyphenols and Bovine Serum Albumin protein (BSA) was also studied. The moisture content of leaves ranges from 49 to 55 %. The best results for total phenol contents were obtained for *M. communis* and *G. alypum*. Polar phenolic contents are less important compared with apolar phenolic compounds for all samples while no significant differences in flavonoid contents between *P. lentiscus* and *M. communis*. These latter have the best tannin values. The plant extracts inhibited the linoleic acid peroxidation during 72 h and were as effective as BHA. They also exhibited an effective reducing power and DPPH· free radical scavenging activity, except for *R. alaternus* and *R. sphaerocarpa* which show lower effectiveness. The interaction between plant extracts and BSA revealed that it is strongly influenced by the concentration of the extracts. The addition of NaCl to the extracts of *P. lentiscus*, *G. alypum* and *R. alaternus* did not influence the polyphenols/protein complex formation. Thus, the interaction was independent on the ionic strength.

Keywords : Medicinal plants, Phenolic compounds, Antioxidant activities, Polyphenols/BSA protein interaction.

Résumé

Dernièrement, un grand intérêt est accordé aux plantes médicinales à cause de leurs propriétés thérapeutiques démontrées. Dans la présente étude, les extraits méthanoliques de *Globularia alypum*, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*, *Retama sphaerocarpa* et *Rhamnus alaternus* sont étudiés pour leurs teneurs en différents composés phénoliques, leurs activités antioxydantes en utilisant le pouvoir d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique, l'activité antiradicalaire (DPPH) et le pouvoir réducteur du fer. L'interaction entre les polyphénols et la protéine Sérum Albumine Bovine (BSA) est aussi étudiée. L'humidité des feuilles varie de 49 à 55 %. Les meilleurs résultats en polyphénols totaux sont obtenus par *M. communis* et *G. alypum*. Les teneurs en polyphénols polaires sont très faibles comparés aux polyphénols apolaires pour toutes les plantes. Aucune différence significative des teneurs en flavonoïdes entre *P. lentiscus* et *M. communis*. Ces dernières présentent les teneurs les plus élevées en tanins. Les extraits de plantes ont inhibé l'oxydation de l'acide linoléique durant 72 h et sont aussi efficaces que le BHA. Ils ont aussi montré un pouvoir réducteur important et une forte activité antiradicalaire (DPPH·), exception faite pour *R. alaternus* et *R. sphaerocarpa* qui sont moins efficaces. L'interaction entre les extraits des plantes et la protéine BSA a montré qu'elle est fortement influencée par la concentration des extraits. L'addition de NaCl aux extraits de *P. lentiscus*, *G. alypum* et *R. alaternus* n'a aucun effet sur la formation des complexes polyphénols/protéines. Ainsi, l'interaction des polyphénols/protéines est indépendante de la force ionique.

Mots clés : Plantes médicinales, Composés phénoliques, Activités antioxydantes, Interaction polyphénols/protéine BSA.

الملخص

في الآونة الأخيرة، ارتفع الاهتمام بالنباتات الطبيعية نظرا للخصائص الصحية التي أظهرتها. من خلال هذه الدراسة، تم تقييم المستخلصات الميثانولية لكل من *Myrtus* ، *Pistacia lentiscus* ، *Retama sphaerocarpa* ، *Rhamnus alaternus* و *Globularia alypum* و *communis* من حيث كمية احتوائها على مختلف المركبات الفينولية و مدى نشاطها المضاد للأكسدة (قوة منع أكسدة حمض اللينولييك، قوة تثبيط الجذر الحر DPPH و قوة إرجاع الحديد). في الأخير، تم دراسة التفاعل بين الفينولات و بروتين المصل البقري (BSA). نسبة رطوبة الأوراق تتراوح بين 49 و 55%. *M. communis* و *alypum* *G.* أظهرتا أحسن كمية للفينولات الكلية. نسبة الفينولات المحبة للماء ضعيفة جدا مقارنة بالفينولات الكارهة للماء لكل النباتات. لا يوجد أي فارق معتبر من حيث كمية الفلا فونويد لكل من *P. Lentiscus* و *M. communis* هاتان الأخيرتان تملكان أعلى نسبة من التني. جميع المستخلصات النباتية منعت أكسدة حمض اللينولييك لمدة 72 سا و هذه القوة مشابهة لقوة BHA. كما أظهرت أيضا قوة الإرجاع وقوة تثبيط الجذر الحر DPPH إلا مستخلصي *R. sphaerocarpa* و *R. alaternus* اللذان كانا ضعيفين. التفاعل بين المستخلصات النباتية و بروتين المصل البقري يتأثر بتركيز كل المستخلصات. إضافة NaCl لكل من *G. R. sphaerocarpa salypum* اظهر انه لا يؤثر على تكون مركبات الفينولات/البروتين و أن التفاعل ليس مرتبط بالقوة الأيونية.

مفتاح الكلمات : النباتات الطبية، المركبات الفينولية، القوى المضادة للأكسدة، التفاعل متعددات الفينول/بروتين المصل البقري.