

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

Université A. Mira de Bejaïa
Faculté des sciences de la nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire de fin de cycle

En vue d'obtention du diplôme de Master II
Option : Pharmacologie moléculaire

Thème

Evaluation de l'activité anti-
oxydante des extraits des feuilles
de *Camellia sinensis* (Thé)

Présenté par

M^{elle} AMGHAR Karima.

M^{elle} BOUKHEMAL Faïza.

Jury

Présidente : M^{me} BEDJOU F.

Examinatrices : M^{elle} SEBAIHI S.

M^{me} KRAOUCHE N.

Promotrice : M^{elle} ADRAR S.

Promotion : 2011 - 2012

Remerciements

Tout d'abord, nous exprimons nos remerciements à ALLAH de nous avoir donné le courage et la patience pour terminer notre travail.

En préambule à ce mémoire, on souhaiterait adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apportés leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire, surtout notre promotrice M^{elle} ADRAR Sabah pour ses conseils et on lui souhaite une bonne réussite dans ses projets.

On tient à remercier sincèrement Madame BEDJOU F., qui, en tant que présidente des membres de jury, pour le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer pour ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent également aux examinatrices : M^{elle} SEBAIHI S. et M^{me} KRAUCHE N. pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce modeste mémoire.

Nous exprimons notre gratitude à tous les enseignants rencontrés lors de notre cycle universitaire.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos parents, à nos proches et amis, qui nous ont toujours soutenue et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents : Salem et Dahika, qui m'ont fourni au quotidien un soutien, et pour leur éducation et sacrifices. Que Dieu les protège et les garde pour nous.

Mes chères amours de sœurs : Hakima et Kahina qui mon épaulées au quotidiens.

Mes formidables frères : Omar et Ahcene qui ravivent ma vie par leurs joies et présences a mes coté.

Ma chère grand-mère : Melaaz que Dieu lui procure une longue vie.

Mes adorables amis (es) : Faiza, Taous, Nabila, Lydia, Anissa, Samira, Naïma, Souad, Soraya, Kahina, Nawel, Akli, Billal, Réda et Sofiane. Qui mon tant fait rire et remontés (es) le moral.

À toute la promotion de Pharmacologie Moléculaire et Biochimie Appliquée.

À toute ma famille proche et loin que soit-elle

Et pour toutes les personnes qui m'ont soutenu jusqu'à la fin.



Je vous aime



Karima

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes chers parents : Hachemi et Nassima, qui m'ont fourni au quotidien un soutien, et pour leur éducation et sacrifices. Que Dieu les protège et les garde pour nous.

Pour ma chère sœur : Nesrine.

Pour mes chers frères : Billal et El-hocine.

Pour mes très chères amies : Karima, Houa, Zina, lydia, Kahina et Nawel.

À toute la promotion de pharmacologie moléculaire et biochimie appliquée.

Et pour toutes les personnes qui m'ont soutenu jusqu'à la fin.

Faiza

Résumé

Les antioxydants jouent un rôle fondamental dans l'élimination de l'excès en espèces réactives de l'oxygène à l'origine de diverses maladies. Ainsi, l'exploitation des molécules végétales naturelles serait très bénéfique pour la santé humaine. Par conséquent, on s'est intéressé à l'évaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques extraits à partir d'une plante médicinale locale, *Camellia sinensis* (le thé vert), et cela en faisant deux types de manipulations, après, bien évidemment, avoir obtenu les différents extraits des feuilles de la plante. D'abord, on a effectué le dosage des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés), pour pouvoir faire une appréciation quantitative ; puis, on est passé à la mesure de l'activité anti-oxydante de nos extraits et ceci en réalisant trois tests différents : l'activité scavenging du radical DPPH, le pouvoir réducteur et la chélation du fer. Les résultats expérimentaux ont montré que la plante a présenté des teneurs appréciables en composés phénoliques. Quant aux résultats de l'activité anti-oxydante, nous constatons que *Camellia sinensis* a exhibé un pouvoir antioxydant satisfaisant. En effet les pourcentages de l'activité scavenging du radical DPPH ont été très élevés pour tous les extraits de la plante, dont ils ont donné une $IC_{50} = 3,94 \mu\text{g/ml}$. Par contre l'activité chélatrice du fer et le pouvoir réducteurs c'est avéré faibles. Ces constatations nous laissent penser à réaliser des études plus approfondies sur d'autres composés de cette plante, et d'on exploiter mieux la richesse et vertus du règne végétal et améliorer leur utilisation thérapeutique.

Abstract

The antioxidants play a fundamental role in the elimination of the excess reactive in cash of oxygen at the origin of various degenerative diseases. Thus, the exploitation of the natural vegetable molecules would be very beneficial for human health. Therefore, we were interested by the evaluation of the anti-oxidant activity of the phenolic compounds extracted from our local medicinal plant, *Camellia sinensis* (green tea), and that by making two types of manipulations, of course, after getting, the various extracts of the sheets of the plant. First, we quantified the phenolic compounds amounts (total phenolics, flavonoids, and condensed tannins), in order to make a quantitative assessment. Then, we realized the anti-oxidant activity assays such as: the DPPH radical scavenging activity, the reducing power and the iron chelating activity. The experimental results revealed that *Camellia sinensis* extracts were rich in total phenolics, showed moderate levels of flavonoids and they exhibited significant levels of condensed tannins. As for the antioxidant activities of the plant, the extracts were very good scavengers of radical DPPH, (the IC_{50} of the leaves ethanolic extract was $3,94 \mu\text{g/ml}$). On the other hand the chelating activity of iron and the capacity reducers it is proven weak. These findings suggest conducting further studies on other compounds of this plant, and we better exploit the wealth and virtues of the vegetable and improve their therapeutic use.

Sommaire

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : <i>Camellia sinensis</i> (thé)	2
I-Généralités sur <i>Camellia sinensis</i> (thé).....	2
I-1- Description.....	2
I-2- Classification classique.....	2
I-3- Historique.....	3
I-4- Catégories du thé.....	3
I-5- Usages médicinal.....	4
Chapitre II : Les radicaux libres et les anti-oxydants	6
I-Les radicaux libres.....	6
I-1- Définition des radicaux libres.....	6
I-2- Génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et du nitrogène (ERN).....	7
I-3- Rôles physiologiques des radicaux libres.....	8
I-4- Le stress oxydant.....	9
I-5- Les conséquences du stress oxydant.....	10
I-6- Les maladies liées au stress oxydant.....	12
II-Les anti-oxydants.....	13
II-1- Définition des antioxydants.....	13
II-2- Les différents types d'antioxydants.....	13
II-2-1- Les antioxydants enzymatiques.....	13
II-2-2- Les antioxydants non enzymatiques.....	15
II-2-2-1- Les vitamines.....	16
II-2-2-2- Les oligoéléments.....	17
II-2-2-3- Les composés phénoliques.....	18
II-2-2-4- Les mécanismes antioxydants des flavonoïdes.....	22

Partie pratique

I-Matériel et méthodes	24
I-1- Cueillette de la plante.....	24
I-2- Séchage et broyage.....	24
I-3- Préparation des extraits.....	24
I-4- Dosage des composés phénoliques.....	26
I-4-1- Dosage des phénols totaux.....	26
I-4-2- Dosage des flavonoïdes.....	26
I-4-3- dosage des tanins condensés (Proanthocyanidines).....	27
I-5- Activités antioxydantes des extraits.....	28
I-5-1- Activité scavenging du radical DPPH.....	28
I-5-2- Le pouvoir réducteur.....	29
I-5-3- L'activité chélatrice du fer.....	31
I-6- Etude statistique.....	31
II- Résultats et discussion	32
II-1- Extraction.....	32
II-2- Dosage des composés phénoliques.....	33
II-2-1- Les phénols totaux.....	33
II-2-2- Les flavonoïdes.....	34
II-2-3- Les pro-anthocyanidines.....	35
II-3- L'activité antioxydante.....	36
II-3-1- L'activité scavenging du radical DPPH.....	36
II-3-2- Le pouvoir réducteur.....	38
II-3-3- La chélation du fer.....	39
Conclusion et perspectives	41
Références bibliographiques	43

Annexes

Liste des figures

Figure 1 : Photographie de <i>Camellia sinensis</i>	2
Figure 2 : Photographie de la plante <i>Camellia sinensis</i>	2
Figure 3 : Schéma d'un radical libre.....	6
Figure 4 : Intermédiaire réduits de l'oxygène.....	7
Figure 5 : Activité de la NO synthase endothéliale et formation du peroxy-nitrite.....	8
Figure 6 : La production de l'anion superoxyde, lors d'un stress oxydant.....	10
Figure 7 : Effet de l'attaque du radical hydroxyle (OH.) sur la guanine.....	11
Figure 8 : Mécanisme d'action de la maladie d'Alzheimer.....	12
Figure 9 : Elimination du H ₂ O ₂ par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR.....	15
Figure 10 : Structure chimique des différents tocols.....	16
Figure 11 : Structure de l'acide ascorbique (vitamine C).....	16
Figure 12 : Les formes variées de l'acide ascorbique (vitamine C) et sa réaction avec les radicaux R'.....	17
Figure 13 : Principaux caroténoïdes anti-oxydants.....	17
Figure 14 : Effets biologiques des polyphénols.....	18
Figure 15 : Structure chimique des acides phénoliques.....	19
Figure 16 : Structures chimiques des dérivés de coumarines.....	19
Figure 17 : Structure de base des flavonoïdes.....	20
Figure 18 : Structure de base d'un tanin condensé.....	21
Figure 19 : Structure d'un tanin hydrolysable.....	22
Figure 20 : La complexation de l'ion métallique par les flavonoïdes.....	23
Figure 21 : Photographie des feuilles séchées de <i>Camellia sinensis</i>	24
Figure 22 : Photographie de poudre de <i>Camellia sinensis</i>	24
Figure 23 : Schéma d'extraction.....	25
Figure 24 : Réaction de la vanilline avec les tanins condensés.....	27
Figure 25 : Schéma du protocole du pouvoir réducteur.....	30
Figure 26 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i>	33
Figure 27 : Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i>	34
Figure 28 : Teneurs en proanthocyanidines dans les extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i>	35
Figure 29 : Les pourcentages de l'activité scavenging du radical DPPH des extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i> et des standards.....	36

Figure 30 : Activité scavenging du radical DPPH des différentes concentrations de l'extrait éthanolique des feuilles de <i>Camellia sinensis</i>	37
Figure 31 : Activité scavenging du radical DPPH des différentes concentrations des standards (BHA et Acide ascorbique).....	37
Figure 32 : Représentation graphique de l'absorbance de l'ion ferreux (Fe^{2+}) du pouvoir réducteur des extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i>	38
Figure 33 : Représentation graphique du pourcentage de l'activité chélatrice du fer des extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i>	39

Liste des tableaux

Tableau I : caractéristiques des espèces actives dérivées de l'oxygène moléculaire.....	7
Tableau II : Principaux anti-oxydants non enzymatiques et sources alimentaire associées.....	15
Tableau III : structures des catégories des flavonoïdes.....	20
Tableau IV : les pourcentages d'extraction des extraits de <i>Camellia sinensis</i>	32

Liste des abréviations

ADN: Acide Desoxyribo-nucléique.

AOX: Anti-oxydant.

APP: Amyloïd Precursor Protein.

A β : β -amyloïde.

DPPH: 1,1- Diphényl- 2- Picryl- Hydrazyl.

EDTA: Ethylène Diamine Tétra- Acétique.

eNOS: Nitric Oxide Synthase Endothelial.

ERN: Espèce Réactive de Nitrogène.

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène.

GPx: Glutathion Peroxyde.

GR: Glutathion Réductase.

GSH: Glutathion.

iNOS: Nitric Oxide Synthase Inductible.

LDL: Low Density Lipoprotein.

NADP: Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate.

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate Hydrogenase.

ND: NADH-FMN déshydrogénase.

NF- κ B: Facteur Nucleaire- kappa B.

NOS: Nitric Oxide Synthases.

NOX2: NADPH Oxydase 2.

RL: Radical Libre.

SD: Succinate déshydrogénase.

SOD: Superoxyde-dismutase.

UQ: Ubiquinone.

UQH: Ubisémiquinone.

UQH: Ubiquinol.

Vit C: Vitamine C.

Vit E: Vitamine E.

XO: Xanthine Oxydase.

BHA: Buty- Hydroxy- Anisol.

TCA: Acide TrichloroAcétique.



Introduction



"C'est la nature qui guérit les malades". Hippocrate Père fondateur de la médecine Occidentale

Introduction

Radicaux libres, antioxydants et stress oxydant, ces termes sont devenus dans un court laps de temps le sujet de notre ère. Du fait de leur haute réactivité, les radicaux libres sont responsables de nombreux dommages vis-à-vis des constituants cellulaires. La production de ces espèces est généralement équilibrée par la consommation à vitesse égale par le système anti-oxydant endogène (**Durand et al., 2003**). Certes ces espèces radicalaires sont d'une importance capitale pour l'organisme puisqu'ils interviennent dans la régulation de la transduction de signaux et dans l'attaque bactérienne. Néanmoins, à fort concentration un déséquilibre peut vite s'installé en faveur des pro-oxydants et on désigne cette rupture d'équilibre par le terme stress oxydant.

A l'heure actuelle, les radicaux libres et leur toxicité cellulaire sont une réalité de plus en plus étudiée dans les laboratoires biochimiques. En effet, la pharmacologie industrielle du 21^{ème} siècle s'y intéresse de très près (**Tessier et Marconnet, 1995**).

Pour remédier à cela, la recherche scientifique a fait une débouche sur la chimie thérapeutique qui a apporté une révolution synthétique dans la pharmaceutique. Cependant les interactions qu'elle engendre, endommagent nos systèmes internes par son action peu spécifique. C'est pourquoi les chercheurs se sont reconverties vers la phytothérapie. En effet, ces plantes médicinales représentent un réservoir immense en métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité structurale et qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques capables d'entraver l'action de ces radicaux libres.

Notre faune est riche en plantes de divers constituants et propriétés thérapeutique. C'est pour cela, notre travail s'intéresse dans cette optique, a une plante d'une rareté locale et d'excellent vertus. Par conséquent l'étude consiste à l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits des feuilles de *Camellia sinensis*, une plante médicinale couramment nommée le thé, qui est en corrélation avec son contenu en composés phénoliques.

Partie théorique



"Si quelqu'un désire la santé, il faut d'abord lui demander s'il est prêt à supprimer les causes de sa maladie. Alors seulement il est possible de l'avoir". Hippocrate Père fondateur de la médecine Occidentale



Camellia sinensis (Thé)



*"La santé, c'est comme la liberté, ça n'existe que quand on en manque."
Citation de Georges Perros ; Correspondance (1955-1978)*

I-Généralités sur *Camellia sinensis* (thé)

I-1- Description

Camellia sinensis, *Théa sinensis* (Théacées ou Théier), couramment appelé le Thé, est un arbuste à feuilles vert foncé persistantes et à fleurs blanches et odorantes (Iserin et al., 2007).

Cet arbuste peut atteindre 20 m de haut, c'est pour cela qu'on le surnomme l'arbre à thé mais dont la plantation ne dépasse pas 1,50 m.

On récolte les jeunes bourgeons pointus et les feuilles qui produiront le thé. Le théier nécessite un climat chaud et humide et peut être cultivé jusqu'à 3000m d'altitude. Les récoltes débutent au printemps (début avril) et s'échelonnent jusqu'en automne (Arnal-Schnebelen et al., 2008 ; Debuigne et Couplan, 2009).



Figure 1 : Photographie de *Camellia sinensis* (1)

I-2- Classification classique

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Theales

Famille : Theaceae

Genre : *Camellia*

Espèce : *Camellia sinensis* (2)



Figure 2 : Photographie de la plante *Camellia sinensis* (3).

I-3- Historique

La Chine est le berceau du thé et le pays d'origine de sa culture. D'après les recherches botaniques récentes, on évalue l'origine de premières plantes de théiers entre 60 et 70 millions d'années dans le sud-ouest de la Chine. Puis de cette région la culture des théiers s'est propagée dans d'autres provinces de Chine, puis au Vietnam et en Inde. C'est au IX^{ème} siècle que le Thé fut introduit au Japon et dans le monde arabe. L'Europe le découvrit plus tardivement grâce à la Compagnie des Indes Orientales: La Hollande en 1610, la France en 1636 et l'Angleterre en 1650 **(Peyrin-Biroulet et al., 2004)**.

D'après Lu Yu qui a écrit le "traité du Thé"(Cha Jing), la découverte du thé est attribuée à l'Empereur Shen Nung (qui a développé la Médecine Traditionnelle Chinoise). Pour écrire le "Traité des plantes", Shen Nung goûta lui même une centaine de plantes afin de connaître leurs vertus mais il fût empoisonné par 72 d'entre elles et le thé le sauva à chaque fois. Il apprécia donc le thé est comme un excellent médicament **(Scharbert et Hofmann, 2005)**.

Tout commence en 2737 avant notre ère, en Chine. Selon la légende, alors que l'empereur Shen Nung faisait bouillir de l'eau à l'abri d'un arbre pour se désaltérer, une légère brise agita les branches et détacha quelques feuilles. Elles se mêlèrent à l'eau et lui donnèrent une couleur et un parfum délicat. L'empereur y goûta, s'en délecta et en reprit. L'arbre était un théier sauvage : le thé était né **(Kimura et al., 2007)**.

Aujourd'hui, le thé est la boisson la plus consommée dans le monde après l'eau. Le thé vert représente 18 % de la consommation de thé mondiale, et le thé noir, 80 %. La Chine reste le premier pays producteur, suivie de l'Inde et du Kenya **(Guy Rousseau, 2010)**.

I-4- Catégories du thé

Le thé est probablement une des boissons les plus consommées au niveau mondial avant d'être une plante médicinale. Son utilisation remonte à plus de 4 000 ans en Orient.

La phytothérapie s'est surtout intéressée au thé vert pour ses vertus amaigrissantes. Il entre dans la composition d'une dizaine de spécialités pharmaceutiques sous différentes formes soit extrait hydro-alcoolique, extrait aqueux ou poudre de feuille **(Peyrin-Biroulet et al., 2004)**.

Camellia sinensis peut être divisé en trois catégories basée sur le processus de fabrication du thé (fermentation):

- Le thé vert (Non fermenté),
- thé oolong (partiellement fermenté),
- et le thé noir (Entièrement fermenté).

Le thé vert a été considéré comme une riche source de catéchine et ses dérivés appelé thé catéchines ou flavan 3-ols comprenant : catéchine (C), épicatechine (CE), épigallocatechine (EGC), Épicatechine gallate (ECG), Épigallocatechine gallate (EGCG) et gallocatechine gallate (GCG) qui contribuent à la capacité des propriétés anti-oxydantes et organoleptiques **(Kim et al., 2011)**. Une feuille de thé vert déshydratée contient de 0,5 % à 10 % de caféine et de 15 % à 30 % de catéchines parmi lesquelles 50 % à 75 % d'EGCG **(Guy Rousseau, 2010)**.

Aujourd'hui, la recherche scientifique fournit la preuve des bienfaits pour la santé associés depuis longtemps au thé vert, notamment dans la lutte contre le cancer et les maladies cardio-vasculaires. Le secret du thé vert repose dans sa teneur riche en tanins polyphénols, en particulier celui appelé EGCG pour Epigallocatechine gallate, un puissant antioxydant **(Jacquelin-Ravel, 2008)**.

Ce qui sépare le thé vert des autres théés est la façon dont il est préparé. Les feuilles de thé vert sont chauffées à haute température, ce qui empêche le composant EGCG de s'oxyder **(Jacquelin-Ravel, 2008)**.

A l'inverse, les théés noirs et oolong sont fabriqués à partir de feuilles déjà fermentées, ce qui neutralise l'EGCG et le transforme en d'autres composants moins efficaces dans la prévention et la lutte contre de nombreuses maladies **(Jacquelin-Ravel, 2008)**.

I-5- Usage médicinal

Depuis des millénaires, les infusions des feuilles du thé (*Camellia sinensis*) ont présenté une palette d'activités médicinales spécifiques **(Debuigne et Couplan, 2009)**, dont on citera :

- Ses effets astringents et stimulants **(Arnal-Schnebelen et al., 2008)**.
- Action sur la diurèse et l'asthénie **(Arnal-Schnebelen et al., 2008)**.
- Des vertus anticancéreuses (prostate, pancréas, colon, rectum) par inhibition de l'enzyme « l'urokinase » **(Arnal-Schnebelen et al., 2008)**.
- Le thé est également utilisé pour la prévention des maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, diabète et ostéoporose **(Jaulin, 2011)**.

- Il favorise la dépense énergétique surtout dans le cas de surcharge pondérale (**Aubert, 2009**).
- Stimule le système nerveux central (SNC) (**Debuigne et Couplan, 2009**).
- Augmente l'activité intellectuelle avec accroissement de la vigilance et du tonus physique (**Debuigne et Couplan, 2009**).
- Améliore la capacité à effectuer des associations d'idées dissipées les migraines et les céphalées (**Debuigne et Couplan, 2009**).
- Facilite et accélère la digestion (**Debuigne et Couplan, 2009**).
- Action sur le système cardio-respiratoire (**Debuigne et Couplan, 2009**).
- Effet hypocholestérolémiant (**Debuigne et Couplan, 2009**).
- Par ailleurs, il est réputé pour calmer les irritations des paupières et des piqûres d'insectes, les œdèmes et les coups de soleil (**Iserin et al., 2007**).
- Il peut traiter les hépatites et prévenir la formation des caries (**Iserin et al., 2007**).



Les radicaux libres et les anti-oxydants



*"Ce n'est là que la santé des êtres, une bonne hygiène pour bien vivre.
Citation d'Émile Zola ; Travail, Fasquelle – 1901*

I-Les radicaux libres

I-1- Définition des radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié (figure 1). Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule (Afonso *et al.*, 2007). Ceci lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte (10^{-9} à 10^{-6} s) (Tessier et Marconnet, 1995 ; Goudable et Favier, 1997).

L'oxygène, étant indispensable aux organismes aérobies, représente paradoxalement, pour eux, une menace permanente (Tessier et Marconnet, 1995). En effet, en biologie, les RL sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l'oxygène (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Les espèces pro-oxydantes sont représentées par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives du nitrogène (ERN) (Groussard, 2006).

Les RL les plus courants sont le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). d'autres molécules, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ion peroxydant ($ONOO^{\cdot}$) ne sont pas des RL mais ils peuvent en générer par différentes réactions chimiques (Ré *et al.*, 2005).



Figure 3 : Schéma d'un radical libre (Mallice, 2010).

I-2- Génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et du nitrogène (ERN)

I-2-1- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

La réactivité chimique des ERO est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants (**Goudable et Favier, 1997**).

Tableau I : caractéristiques des espèces actives dérivées de l'oxygène moléculaire (**Tessier et Marconnet, 1995**).

▪ O_2	▪ Oxygène moléculaire	▪ Bi-radical, stable, faible pouvoir oxydant
▪ $O_2^{\cdot -}$	▪ Radical anion superoxyde	▪ Radical peu réactif, mais toxique, oxyde les catécholamines, peut former OH^{\cdot}
▪ 1O_2	▪ Oxygène singulet	▪ Non radical, très réactif, peut initier lipoperoxydation
▪ H_2O_2	▪ Peroxyde d'hydrogène	▪ Non radical, stable, faiblement toxique, diffusible, antiseptique, peut former le OH^{\cdot}
▪ OH^{\cdot}	▪ Radical hydroxyle	▪ Très réactif, peu diffusible, initiateur principale de lipoperoxydation altère protéine, ADN.

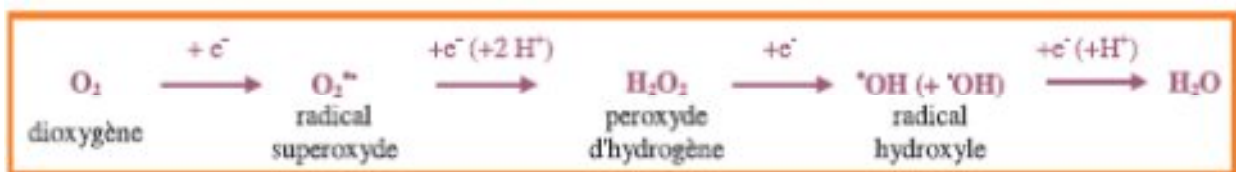
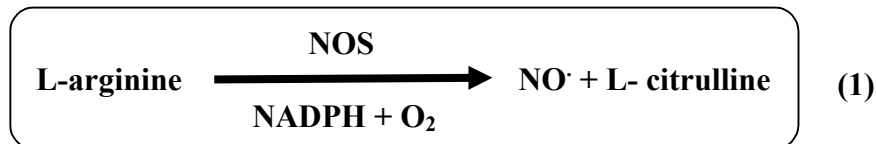


Figure 4 : Intermédiaire réduits de l'oxygène. Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène (**Gardès-Albert et al., 2003**).

I-2-2- Les espèces réactives du nitrogène (ERN)

❖ Le radical oxyde nitrique (NO[•])

Certaines cellules peuvent produire le radical NO[•]. Il est synthétisé lors de l'oxydation de l'arginine en citrulline, réaction catalysée par les NO synthases (NOS ou *nitric oxide synthases*) en présence de NADPH et d'oxygène (Ré et *al.*, 2005). Selon la réaction (1) suivante :



❖ L'anion peroxyxynitrite (ONOO⁻)

Une production trop importante de NO[•] peut avoir des effets toxiques, car le NO[•] peut alors se combiner avec le radical superoxyde pour donner l'anion peroxyxynitrite. Ce dernier est un puissant oxydant et agent de nitration, ses effets peuvent être soit directs, soit médiés par des radicaux libres secondaires dont il est à l'origine (Ré et *al.*, 2005; Huet et Duranteau, 2008).

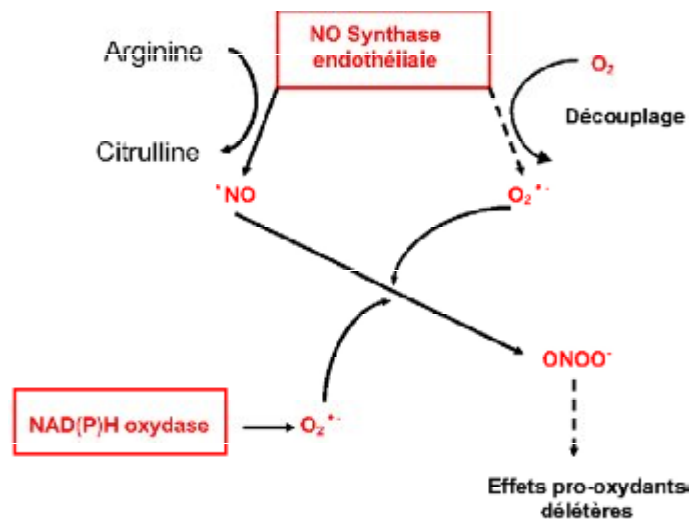


Figure 5: Activité de la NO synthase endothéiale et formation du peroxyxynitrite (Beaudeau et *al.*, 2006).

I-3- Rôles physiologiques des radicaux libres

Certes, les RL sont très nocifs pour l'organisme, mais néanmoins la faible réactivité de l'anion radicalaire superoxyde (O₂^{•-}) et du monoxyde d'azote (NO[•]) permet leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant les fonctions biologiques telles que la vasodilatation capillaire, la

prolifération ou le message de neurone (Fevier, 2003). Ce sont également des messagers intracellulaires au cours de l'hypoxie (Duranteau et al., 1997).

Les ERO ou ERN, même réactifs, ne sont pas uniquement toxiques, au contraire, ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire les bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) (Fevier, 2003), ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle que la mort cellulaire programmée ou apoptose (Curtin et al., 2002), d'activer des facteurs de transcription, eux – mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Owuor et Kong, 2002) et de moduler l'expression de gènes de structure codant pour les enzymes anti-oxydantes (Holgrem, 2003).

I-4- Le stress oxydant

Chez l'Homme sain, la production et la neutralisation d'ERO s'équilibrent (Zazzo, 2002). En pathologie, Le stress oxydant, résulte d'un déséquilibre entre les systèmes générateurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense anti-oxydante au profit des premiers (Bonnefout-Rousselat et al., 2002 ; Durand et al., 2005 ; Baudin, 2006).

La notion de stress est avant tout une réponse à une modification des conditions habituelles de vie cellulaire (Barouki, 2006).

Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement), d'une activation de système enzymatique (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamine, ...). Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en anti-oxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant (Pincemail et al., 2002).

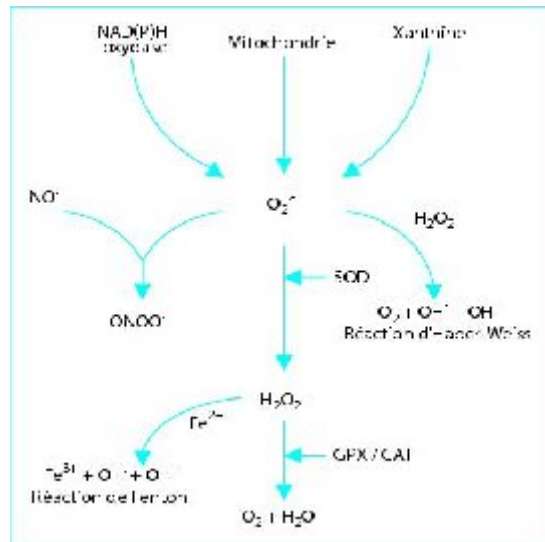


Figure 6 : La production de l'anion superoxyde, lors d'un stress oxydant par la NADPH oxydase, la xanthine oxydase ou encore la chaîne respiratoire mitochondriale. (SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; GPX : glutathion peroxydase ; NO : monoxyde d'azote ; ONOO : peroxydinitrite) (Monteil et al., 2004).

I-5- Les conséquences du stress oxydant

Par diverses attaques au niveau moléculaire et cellulaire, le stress oxydant possède un impact négatif sur la fonction organique (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les ERO étant des dérivés de l'oxygène, hautement réactifs et instables, participent au vieillissement des protéines, à la peroxydation lipidique et à l'altération de l'ADN. Elles ont été longtemps considérées comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de mort cellulaires (Negre-Salvayre et Salvayre, 2005).

I-5-1- La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est une conséquence du stress oxydant et aussi un relais pour sa propagation (Guichardant et al., 2006). La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés quelle que soit leur origine (huiles végétales, huiles de poissons, graisses animales, membranes cellulaires, lipoprotéines) sont concernés (Cillard et Cillard, 2006).

I-5-2- L'oxydation des protéines

Les ERO sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines, altérant ainsi leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés

aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical OH^\cdot s'additionne, modifiant la conformation de la protéine.

Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les RL conduit à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines. Les ERO sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, anti-enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensible à l'action des protéases et notamment du protéasome (Favier, 2003).

I-5-3-L'oxydation de l'ADN

Les ERO peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. Il peut y avoir jusqu'à 70 modifications oxydatives différentes des acides nucléiques, certaines affectant les bases, d'autres induisant des cassures dans les brins (Ré et al., 2005).

Le radical OH^\cdot est le plus réactif envers les bases azotées et les sucres des acides nucléiques. Par exemple, la guanine peut être oxydée en 8-hydroxy-guanine ; les atomes 4 et 5 peuvent aussi être touchés et des attaques semblables ont été retrouvées sur les mêmes atomes de l'adénine ainsi que sur les carbones du noyau ou de groupement méthyle de la thymine, par exemple pour former du thymidine-glycol. Le ribose et le désoxyribose peuvent être oxydés en dérivés mono ou dicarbonylés (Baudin, 2006).

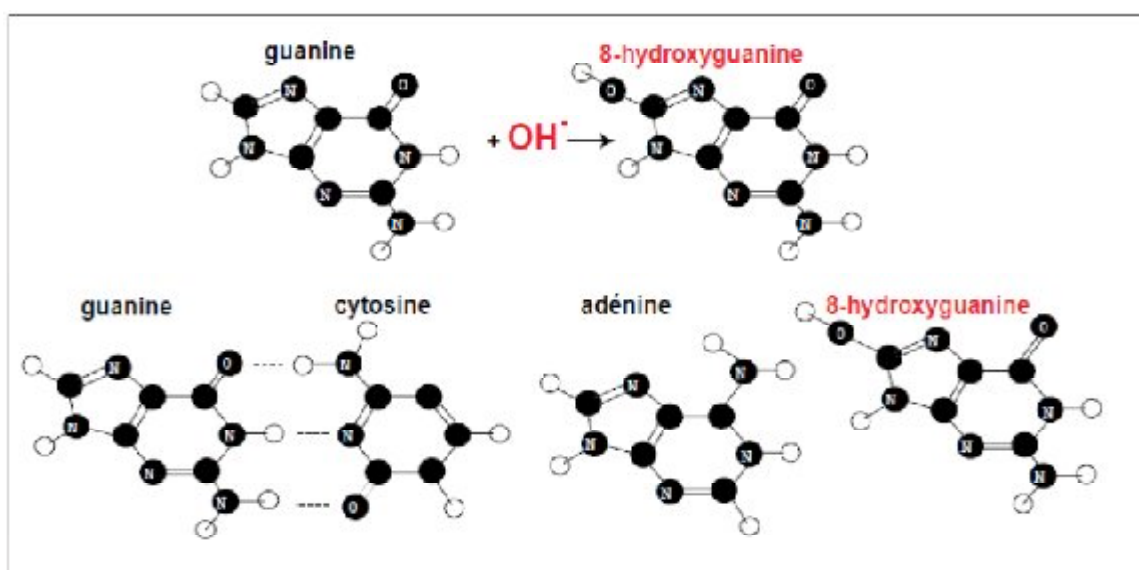


Figure 7: Effet de l'attaque du radical hydroxyle (OH^\cdot) sur la guanine, base constitutive de l'ADN (Pincemail et al., 1999).

I-6- Les maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydant apparaît aujourd'hui comme un lien unifacteur de différentes composantes dans la genèse et la progression de lésion (**Beaudeau et al., 2006**).

Assimilée pendant longtemps, à un effet de vieillissement, la maladie d'Alzheimer est depuis peu reconnue comme une vraie pathologie (**Etiemble, 2007**).

La maladie d'Alzheimer est une pathologie très fréquente qui apparaît habituellement chez les patients de plus de 50 ans par une atteinte précoce de la mémoire et une perte du jugement (**Wilkinson, 2002**).

Les symptômes de cette maladie s'expliquent par la mort des neurones du cerveau, en particulier dans le cortex et l'hippocampe. L'exposition à des agents oxydants stimule la réparation dans les cellules normales, elle la diminue dans les cellules produisant la protéine A β (**Rachidi, 2012**).

Ce ne sont pas les dépôts de protéines mais des globules blancs des cellules microgliales qui sont responsables de la mort des neurones dans la maladie d'Alzheimer.

Les chercheurs ont aussi découvert l'enzyme appelée NOX2, qui produit des radicaux libres et dont se servent les cellules microgliales pour occire les neurones (**Ruth, 2006**).

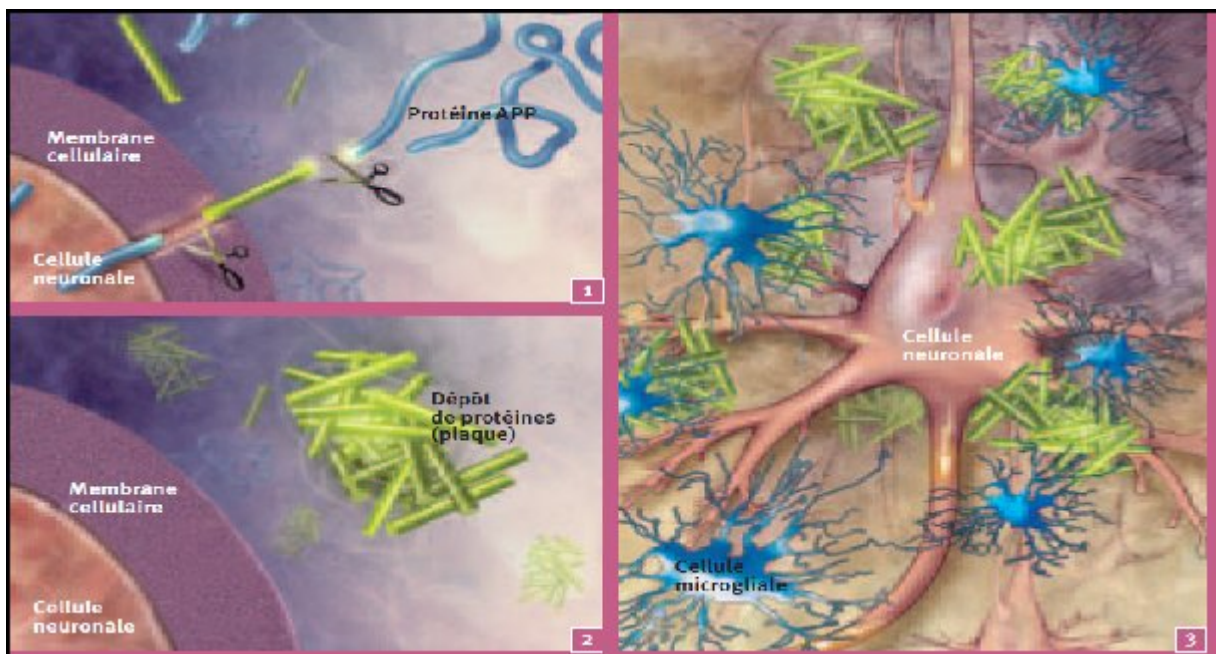


Figure 8 : Mécanisme d'action de la maladie d'Alzheimer (**Ruth, 2006**).

1. Certains segments (en vert) de la protéine APP (amyloid precursor protein) naturelle, ancrée dans la membrane cellulaire, sont sectionnés.
2. Ces morceaux de protéines s'agglutinent et se déposent autour des cellules neuronales.
3. Les cellules neuronales avec des dépôts de protéines sont attaquées par les cellules microgliales.

II- Les anti-oxydants

II-1- Définition des anti-oxydants

Un anti-oxydant (AOX) est une substance qui va s'opposer de manière plus ou moins spécifique à des formes radicalaires (**Ghibu et al., 2008**). Ce sont n'importe quelle substance qui lorsqu'elle est présente à une concentration faible par rapport à un substrat oxydable, retarde de façon significative ou empêche l'oxydation de ce substrat (**Mercan, 2010**). Ces AOX sont des composés qui réagissent avec les RL en arrêtant leurs multiplications, devenant ainsi inoffensifs, le plus souvent parce que la structure des AOX est relativement stable (**Coene, 2004**).

II-2- Les différents types d'anti-oxydants

Pour se protéger de cet effet toxique de l'oxygène, des systèmes de défense qui permettent de réguler la production des ERO. Ces systèmes sont composés d'anti-oxydants enzymatiques et non enzymatiques (**L'hénaff, 2006**), énumérés respectivement comme suite :

- ❖ Les anti-oxydants enzymatiques : ce sont des systèmes de défense naturels à l'intérieur des cellules, constitués d'enzymes telle la superoxyde-dismutase, mais aussi la catalase et la glutathion-peroxydase (**Jadot, 1988**), qui vont s'opposer aux actions radicalaires en neutralisant les RL formés au niveau de la cellule (**Ghibu et al., 2008**).
- ❖ Les anti-oxydants non enzymatiques : ils représentent le deuxième recours dont nous disposons pour lutter contre le stress oxydant, ils incluent l'acide ascorbique (vitamine C), les tocophérols (vitamine E), les caroténoïdes, les oligoéléments et il ya aussi certains qui sont rassemblés dans le grand groupe des polyphénols (**Kassab et al., 2003 ; Gardès-Albèrt et al., 2003 ; Berger, 2006**).

Il est important de noter que la nature des moyens de défense contre les RL dans les milieux interstitiels est très différente de ceux mis en œuvre dans le milieu intracellulaire (**Jadot, 1988**).

II-2-1- Les anti-oxydants enzymatiques

II-2-1-1- Les superoxydes-dismutases (SOD)

La superoxyde-dismutase appartient au système « primaire » de défense anti-radicalaire (**Ghisolfi-Marque, 1996**). Elle fait partie de la catégorie des métalloenzymes qui sont omniprésentes dans les organismes eucaryotes. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde

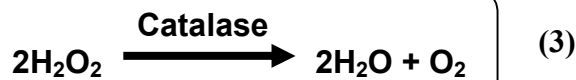
($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et oxygène (O_2) (Laguerre et al., 2007 ; Parihar et al., 2008). Décrite comme suite dans la réaction (2)



La reprise du H_2O_2 par la glutathion peroxydase (GPx) ou la catalase est très importante, évitant et prévenant ainsi la formation de dérivés plus toxiques comme le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) ou le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) (Afonso et al., 2007 ; Roy, 2008).

II-2-1-2- Les catalases

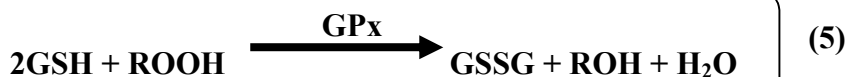
Les catalases sont la classe d'enzymes qui catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et oxygène gazeux (O_2) (Nicholls, 2012). La catalase élimine ainsi l'excès du H_2O_2 , en présence d'ions ferreux, afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (Goudeb et Favier, 1997 ; Nicholls, 2012). Montrée dans la réaction (3) ci-dessous :



II-2-1-3- Les glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme sélénodépendante dont le cofacteur est le glutathion (Beani, 1999). Elle peut agir sur de petites quantités d'ERO (Roy, 2008).

La GPx fait partie d'un système complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H_2O_2 , elle prend aussi en charge des lipides peroxydés (Servais, 2004 ; Valko et al., 2006), Selon les réactions (4) et (5) :



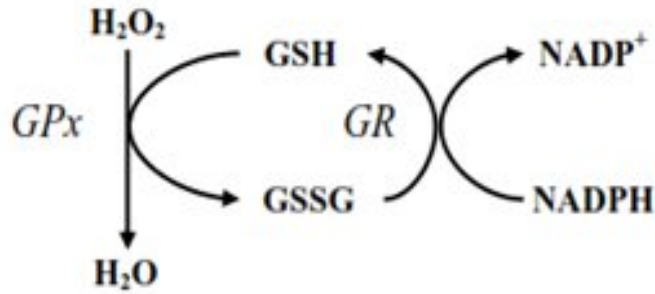


Figure 9 : Elimination du H₂O₂ par les réactions enzymatiques combinées de la GPx et de la GR (Servais, 2004).

II-2-2- Les anti-oxydants non enzymatiques

Ces divers anti-oxydants, apportés par l'alimentation, régulent l'équilibre redox cellulaire (Negre-Salvayre et Salvayre, 2005 ; Koechlin- Ramonatxo, 2006).

Tableau II : Principaux anti-oxydants non enzymatiques et sources alimentaire associées (Koechlin- Ramonatxo, 2006).

Principaux nutriments	Sources alimentaires
Anti-oxydants	
Vitamine C	Agrume, melon, brocoli, fraise, kiwi, poivron
Vitamine E	Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix
β-carotène	Légumes et fruits orangés et verts foncés
Sélénium	Poissons, œufs, céréales, volaille
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huitres, produits laitiers
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert
Acides phénoliques	Céréales complets, baies, cerises
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin

II-2-2-1- Les vitamines

➤ La vitamine E ou l' α -tocophérol (vit E)

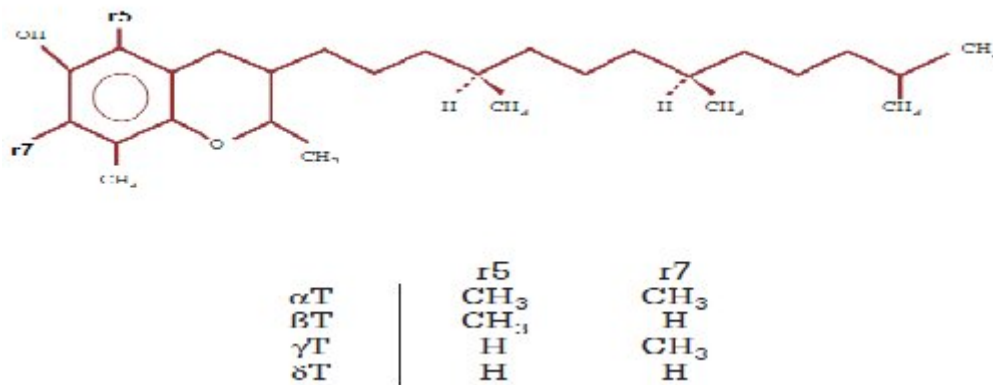


Figure 10: Structure chimique des différents tocols (Pincemil et al., 1998).

Le rôle essentiel de la vit E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques ($RO_2\cdot$), qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice, celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle ($\alpha-T\cdot$), tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde. De plus, l' α -tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée $HO_2\cdot$), les radicaux hydroxyles $OH\cdot$ ainsi que l'oxygène singulet 1O_2 (Gardès-Albert et al., 2003), montrée dans la réaction (6) ci-dessous :



➤ La vitamine C ou l'acide ascorbique (vit C)

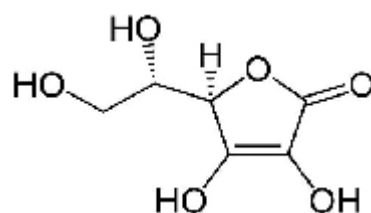


Figure 11 : structure de l'acide ascorbique (vitamine C) (Adrian et al., 1995).

L'ascorbate capte les radicaux peroxydes $RO_2\cdot$. En réagissant avec ces divers oxyradicaux, l'ascorbate ($AscH^-$) est oxydé en radical ascorbyle ($Asc\cdot^-$) qui est relativement inerte vis-à-vis des matériaux biologiques. Par conséquent, le radical ascorbyle $Asc\cdot^-$ ne développe pas de réactions ultérieures dommageables (Gardès-Albert et al., 2003).

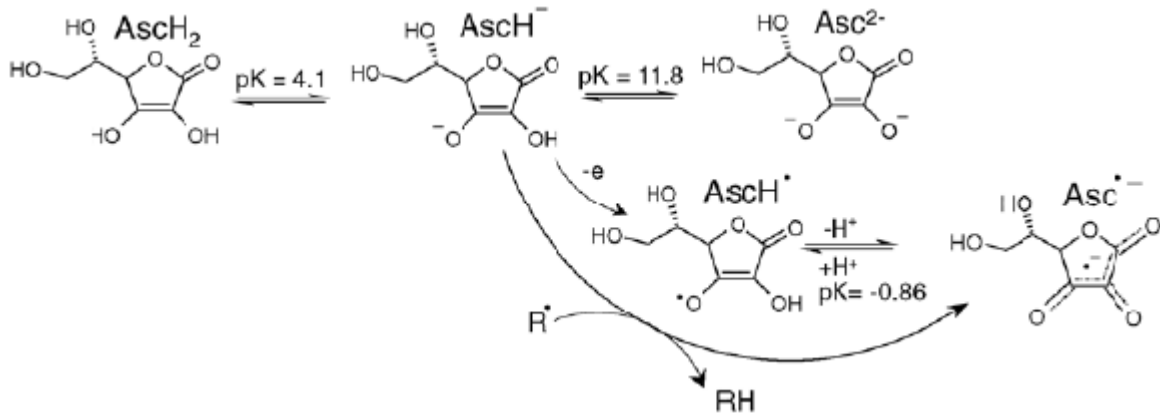


Figure 12 : Les formes variées de l'acide ascorbique (vitamine C) et sa réaction avec les radicaux R[•] (Valko et al., 2006).

➤ Les caroténoïdes (la provitamine A)

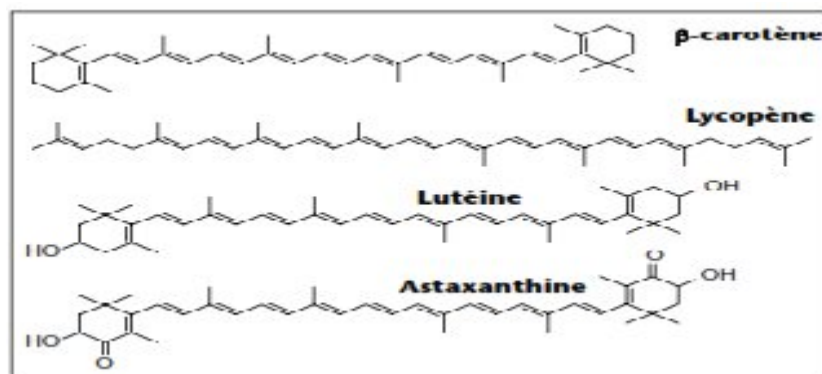
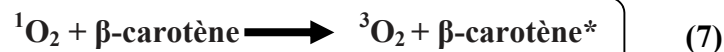


Figure 13 : Principaux caroténoïdes anti-oxydants (Laguerre, 2007).

Les caroténoïdes participent à la protection des tissus contre l'agression radicalaire en bloquant les réactions de peroxydation lipidique en chaîne et empêchent ainsi la propagation de la réaction radicalaire au niveau des membranes cellulaires (Ghisolfi-Marque, 1996). Ce sont, en l'état actuel de nos connaissances, les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène singulet (Gardès-Albert et al., 2003 ; Judde, 2004 ; Laguerre, 2007), Selon la réaction (7) :



II-2-2-2- Les oligoéléments

Les « éléments traces » ou oligoéléments sont des matériaux présents en faible quantité dans un organisme, et sont utiles à son fonctionnement, en raison de leur implication effective dans des

réactions biochimiques ou physico-chimiques (**Khaled et al., 1997**). Des métaux tels que le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et dans certains micro-organismes le nickel (Ni), jouent un rôle important en tant que catalyseurs de la SOD. De la même façon, le Sélénium (Se) est l'élément catalyseur de la GPx (**De Moffarts et al., 2005**).

II-2-2-3- Les composés phénoliques

II-2-2-3-1- Définition

Les phénols sont des composés possédant un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupements hydroxyles, et généralement, ils sont catégorisés en acides phénoliques, flavonoïdes, stilbenes, coumarines et tanins. Ce sont les produits du métabolisme secondaire chez les plantes (**Liu, 2007**).

II-2-2-3-2- Propriétés biologiques des polyphénols

Les polyphénols possèdent une activité anti-oxydante puissante, plus élevée que celle des vitamines anti-oxydantes et des caroténoïdes (**Podsdek, 2007**), prévenant l'oxydation des LDL et ont un effet anti-athérogène (**Curtay et Robin, 2000 ; Negre-Salvayre et Salvayer, 2005**), anti-œdémateuse (**Catier et Roux, 2007**), effets cardioprotecteurs (**Young et Woodside, 2001 ; Heim et al., 2002 ; Saraf et al., 2007**) et des effets vasodilatateurs (**Balasundram et al., 2006**).

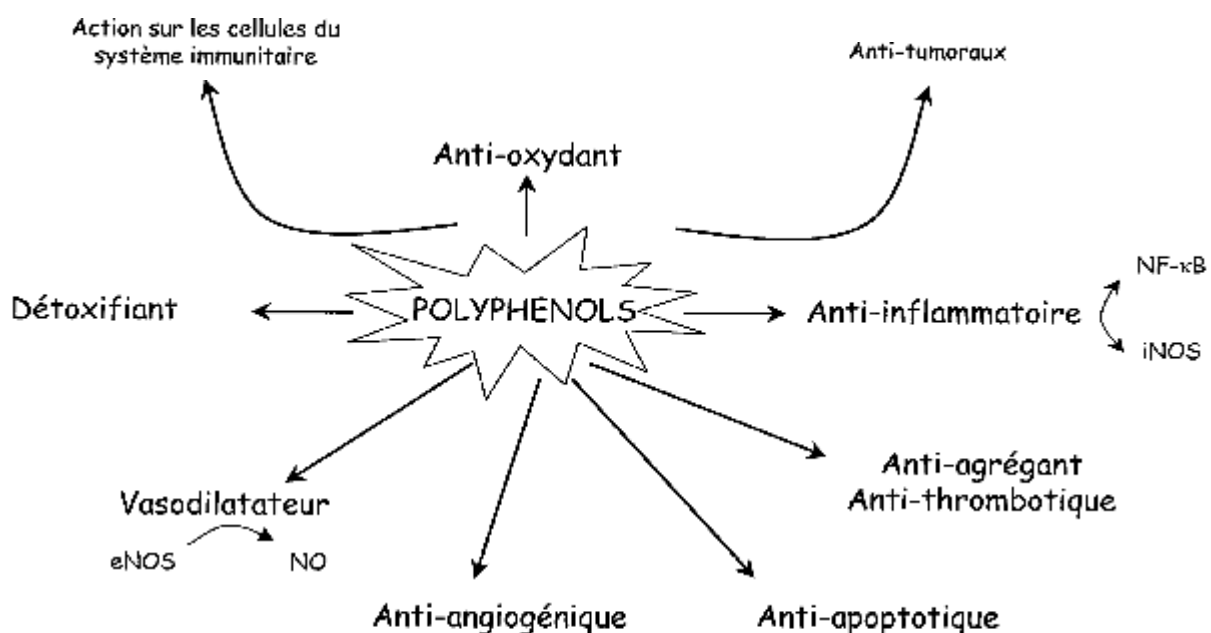


Figure 14 : Effets biologiques des polyphénols (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**)

II-2-2-3-3- Classification

Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tanins (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

II-2-2-3-3-1- Les acides phénoliques

Ils sont subdivisés en deux sous groupes (figure 15), les acides hydroxybenzoïques (de type C6-C1 (Chira et al., 2008)) et les acides hydroxycinnamiques (de base C6-C3, dérivée de celle de l'acide cinnamique (Macheix et al., 2006)) (Bravo, 1998).

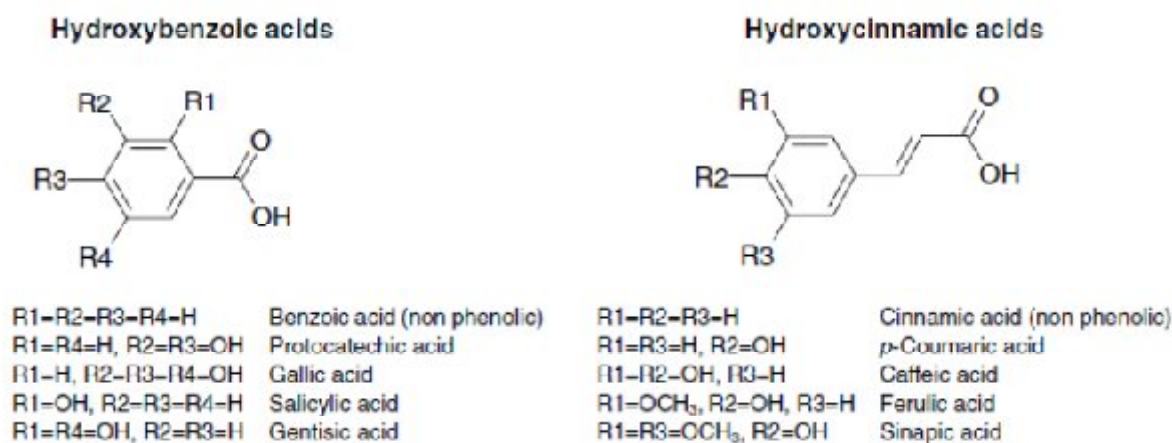


Figure 15 : Structure chimique des acides phénoliques (Laguerre et al., 2007).

II-2-2-3-3-2- Les coumarines

Les coumarines (connus comme 1,2-benzopyrone), contenant des cycles de benzène et de α -pyrone fusionnés, sont un groupe important de phénols de faible poids moléculaire (figure 16) (Lin et al., 2008).

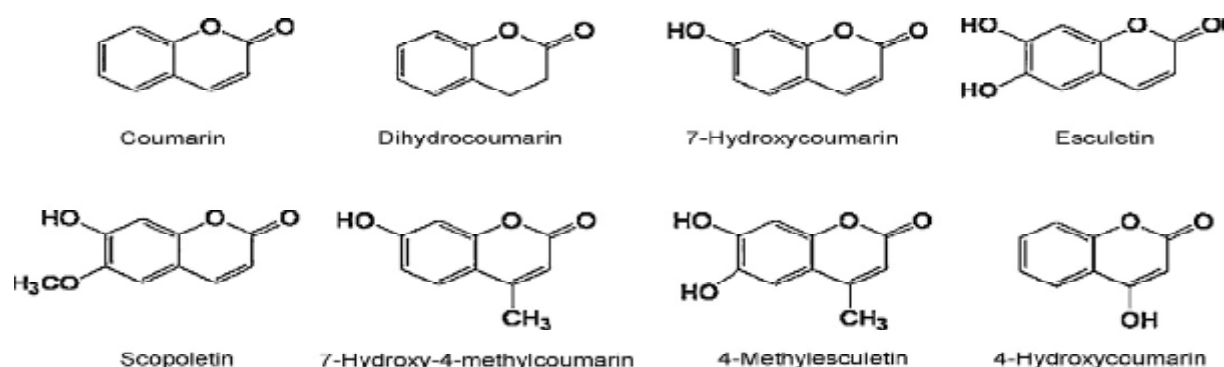


Figure 16: Structures chimiques des dérivés de coumarines (Lin et al., 2008).

II-2-2-3-3-3- Les flavonoïdes

II-2-2-3-3-3-1- Définition

Les flavonoïdes sont composés généralement de deux cycles benzéniques (cycles A et B) liés par un hétérocycle contenant un oxygène (cycle C) sous la configuration C6-C3-C6 (figure 17) (Tsao et Deng, 2004). Ce sont des composés de faible poids moléculaire qui consistent en 15 atomes carboniques (Balasundram *et al.*, 2006).

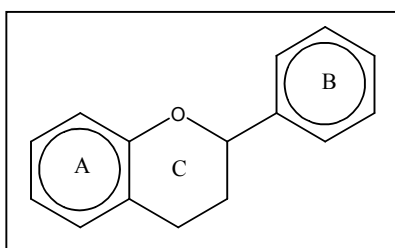


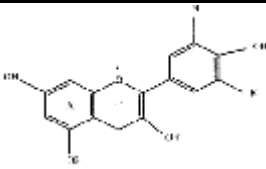
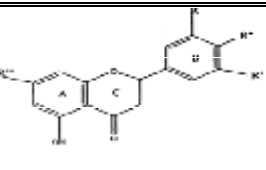
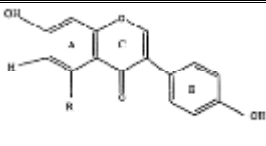
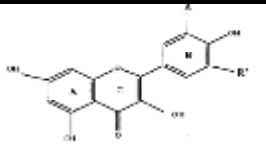
Figure 17: Structure de base des flavonoïdes (Saraf *et al.*, 2007).

II-2-2-3-3-3-2- Classification

Des variations dans des modèles de substitution dans le cycle C a pour résultat les principales classes des flavonoïdes (tableau III). Des substituants des cycles A et B donnent naissance à des composés différents à l'intérieur de chaque classe de flavonoïdes. Ces substitutions peuvent impliquer l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation et la sulfatation (Balasundram *et al.*, 2006).

Tableau III : structures des catégories des flavonoïdes (Balasundram *et al.*, 2006).

Flavonoïdes	
Flavanols	
Flavones	

Anthocyanidines	
Flavanones	
Isoflavones	
Flavonols	

II-2-2-3-3-4- Les tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques de poids moléculaire élevé produits par le métabolisme secondaire des plantes (Bossu *et al.*, 2006). Les tanins sont divisés en tanins condensés et tanins hydrolysables (Cai *et al.*, 2006).

II-2-2-3-3-4-1- Les tanins condensés

Les tanins condensés ou pro-anthocyanidines sont principalement des polymères et oligomères non hydrolysables de flavan-3-ols (figure 18) ; liées par des liaisons C₄-C₆ ou C₄-C₈ (Rahim *et al.*, 2008).

les tanins condensés ne sont pas hydrosolubles mais peuvent être oxydés par des acides forts libérant des anthocyanidines (Guignard, 2002 ; Macheix *et al.*, 2006 ; Bruneton, 2008)

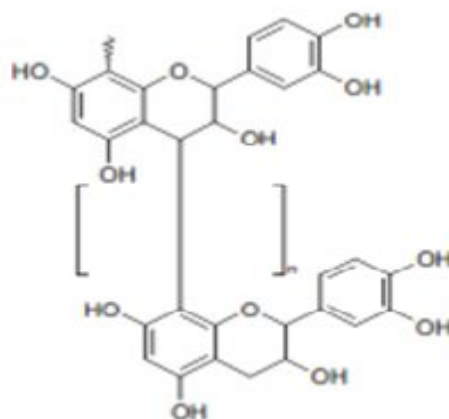


Figure 18 : Structure de base d'un tanins condensé (Naczki *et al.*, 2001).

II-2-2-3-3-4-2- Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont formés par un cœur hydrocarbure, usuellement le D-Glucose, dont les groupements hydroxyles peuvent présenter des liaisons esters avec les groupements phénoliques (figure 19) (Bossu *et al.*, 2006).

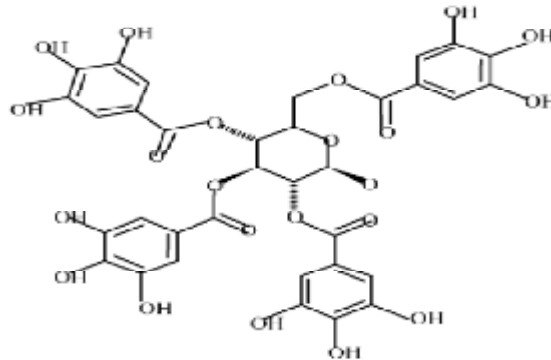


Figure 19 : Structure d'un tanin hydrolysable (krause *et al.*, 2005).

II-2-2-4- Les mécanismes anti-oxydants des flavonoïdes

Les mécanismes d'action d'un anti-oxydant peuvent comprendre :

- 🚫 Le piégeage direct des ERO ;
- 🚫 L'inhibition des enzymes responsables de la production des ERO ;
- 🚫 La chélation des ions métalliques de transition (Halliwell, 1994).

II-2-2-4-1- Piégeage des radicaux libres

Les flavonoïdes sont dotés d'une forte capacité à piéger les RL, cela est probablement lié aux groupements phénoliques hydroxyles attachés aux structures cycliques (Heim *et al.*, 2002 ; wattel *et al.*, 2002), selon la réaction (8)



II-2-2-4-2- Inhibition enzymatique

La capacité de la xanthine oxydase (XO) à générer le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence d'oxygène moléculaire et de l'hypoxanthine ou de la xanthine est bien connue, et cela a conduit au rôle proposé de l'enzyme comme une source d'ERO dans plusieurs situations pathologiques et physiologiques normales (Sanders *et al.*, 1997 ; Vorbach *et al.*, 2003).

La famille des flavonoïdes a montré une inhibition élevée de la XO (**Hoorn et al., 2002**). L'étude de la relation entre la structure et l'activité a révélé plusieurs facteurs importants pour la liaison des flavonoïdes dans le site actif de la XO dont:

- Les oléfines en C₂ et C₃ qui maintiennent une structure plane des flavonoïdes sont essentielles pour une puissante activité inhibitrice de la XO. Les flavonoïdes non planes tels que la naringenine, n'ont exhibé aucune activité inhibitrice de la XO (**Lin et al., 2002**).
- Les groupements hydroxyles en C₇ et C₅ et le groupement carbonyle en C₄ fournissent des liaisons hydrogènes favorables et des interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et le site actif (**Lin et al., 2002**).

II-2-2-4-3-Chélation des métaux de transition

Les flavonoïdes sont des chélateurs de métaux de transition pouvant ainsi prévenir l'oxydation en formant des complexes ou des composés de coordination avec les métaux tels que le Cu²⁺ et le Fe²⁺ (**Curtay et Robin, 2000 ; Cillard et Cillard, 2006 ; Laguerre et al., 2007**). La chélation se fait par les groupements carbonyles et hydroxyles des flavonoïdes (**Saraf et al., 2007 ; Tabassum et al., 2010**).

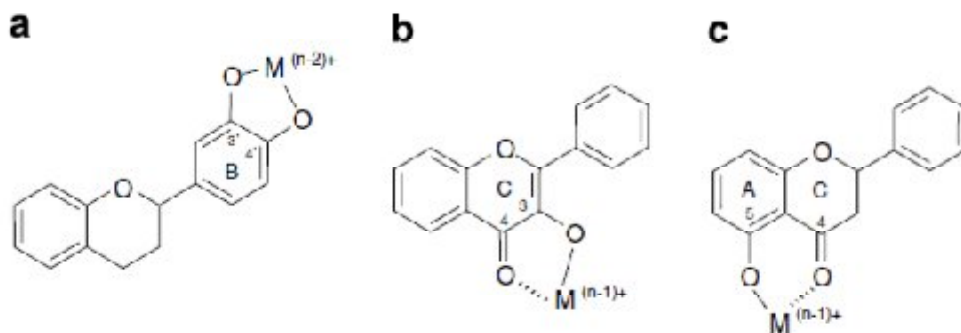


Figure 20 : La complexation de l'ion métallique par les flavonoïdes via le groupement 3'-4'-O- diphenolique dans le cycle B(a) et les structures céto 4-céto, 3-hydroxy dans le cycle C(b) ou bien 4-céto et 5 - hydroxy dans l'anneau le cycle C et A (c) (**Laguerre et al., 2007**).

Partie pratique



*"La santé est la qualité la plus méritoire du corps."
Citation d'Aristote ; Rhétorique, I, 5, 15 - IV^e s. av. J.-C.*

Matériel et méthodes

*" Un peu de thé tous les jours éloigne le médecin pour toujours "
(vieil adage chinois)*



I-Matériel et méthodes

I-1- Cueillette de la plante

Les feuilles de *Camellia sinensis* ont été récoltées en Mars 2012, dans un endroit naturel loin de la pollution situé dans la commune d'Adekar. La plante a été identifiée par M^r BOUADAM Saïd enseignant à la FSNV.

I-2- Séchage et broyage

Les feuilles de *Camellia sinensis* ont été séchées à l'air libre et où la dernière journée de séchage a été réalisée à l'étuve à 30°C. Ensuite, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre très fine.



Figure 21 : Photographie des feuilles séchées de *Camellia sinensis*.



Figure 22 : Photographie de la poudre de *Camellia sinensis*

I-3- Préparation des extraits

Le protocole d'extraction suivi est celui de Chiang et *al.*, (1994), ayant subi quelques modifications. Le principe de cette méthode se base sur l'extraction sélective liquide-solide des composés phénoliques en utilisant trois solvants de différentes polarités : l'éthanol, l'eau et le chloroforme. Les étapes d'extraction qui suivront ont été réalisées à températures ambiantes.

Il s'agit de mettre 50g de poudre des feuilles de *Camellia sinensis* dans 250ml d'éthanol absolu, avec un rapport de 1/5, et de les laisser macérer sous agitation magnétique pendant 24 heures. Après décantation de la suspension pendant 24 heures, l'extrait humide a été prélevé et filtré à travers un filtre en papier puis versé dans un creuset, qui sera réservé pour les tests, et le reste dans

un bécher qui servira pour la deuxième extraction. Finalement, l'extrait humide a été séché à l'étuve à 30°C jusqu'à atteindre un poids constant de l'extrait sec.

La deuxième étape consiste à dissoudre l'extrait sec d'éthanol dans un mélange de solvants : le chloroforme et l'eau (3/1, v/v). Après agitation et décantation pendant 24h, deux phases, organique et aqueuse, ont été observées puis récupérées et séchées.

Il est à noter, qu'après l'extraction, trois extraits ont été obtenus. Le taux d'extraction de chaque extrait sec a été calculé suivant la formule ci-dessous :

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

Où :

P_0 : Poids vide du creuset.

P : poids après évaporation du solvant.

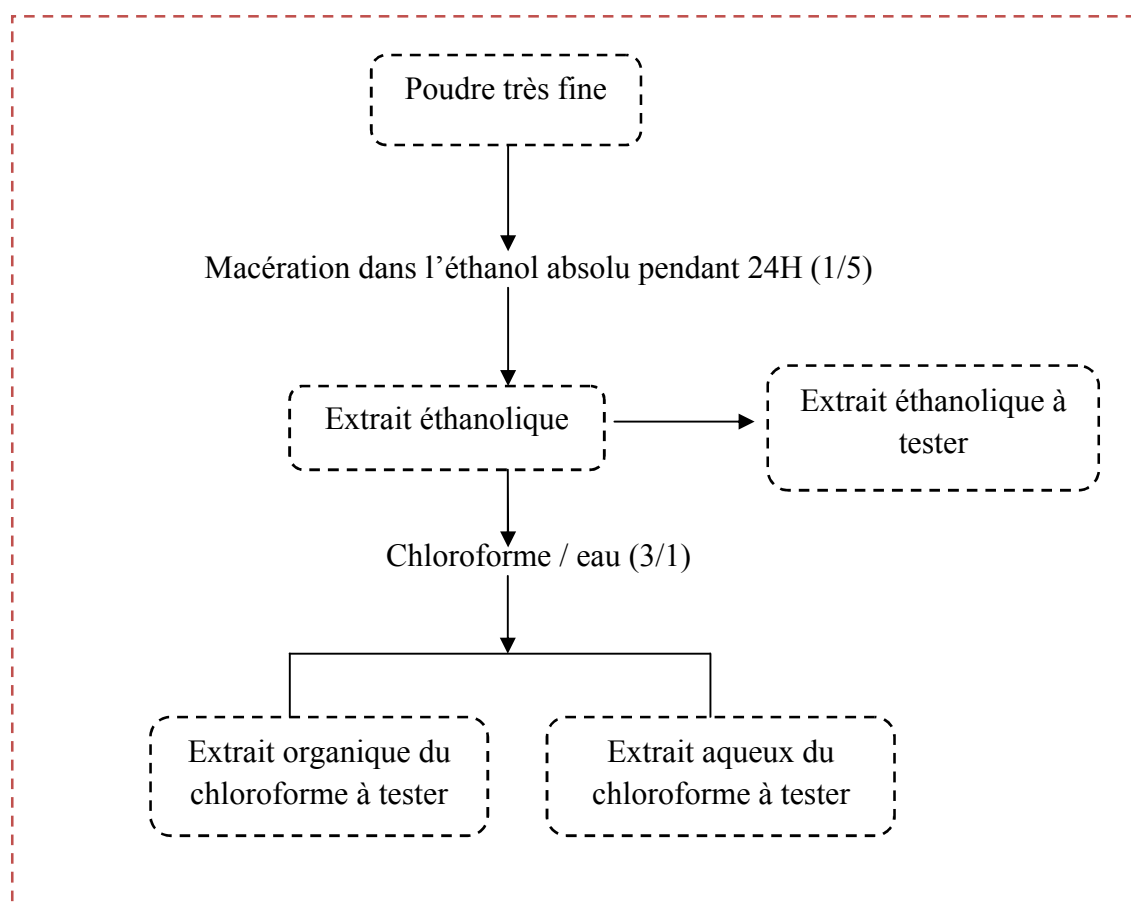


Figure 23 : Schéma d'extraction (Chiang et al., 1994).

I-4- Dosage des composés phénoliques

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

I-4-1- Dosage des phénols totaux

Le contenu en phénols totaux des extraits a été déterminé en utilisant le protocole de Yap et *al.*, (2009), avec quelques modifications. La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphotungstène du réactif de Folin-Ciocalteu vers un complexe de couleur bleu, dans une solution alcaline en présence des composés phénoliques.

Pour cela, on tient à préciser que le réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Boizot et Charpentier, 2006**). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

A 0,3 ml de solution d'extrait (1mg/ml) ont été ajoutés à 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10%, v/v) suivis de 0,2 ml de carbonate de sodium (7,5%, w/v). Le mélange a été bien agité, les tubes à essais ont été incubés à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité ; puis l'absorbance a été mesurée à 765 nm.

Il est à noter qu'un blanc a été préparé en mélangeant 0,3 ml de méthanol avec 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,2 ml de solution de carbonate de sodium.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard afin de déterminer les concentrations en phénols totaux des extraits exprimées en mg équivalent acide gallique /g d'extrait.

I-4-2- Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des extraits ont été mesurées en suivant la méthode de Mimica-Dukic, (1992) in Abdou Bouba et *al.*, (2010), ayant subi quelques modifications.

Cette méthode se base sur le principe suivant : les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium), car ils contiennent des groupements hydroxyles libres (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

2 ml de solution d'extrait (1mg/ml) ont été mélangés avec 1 ml d'une solution d'acétate de sodium et de chlorure d'aluminium (133 mg d' AlCl_3 et 400 mg d'acétate de sodium dans 100 ml d'eau distillée). Après incubation pendant 10 min à température ambiante, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 430 nm.

Un blanc a été préparé en mélangeant 2 ml de solution d'extrait avec 1 ml d'eau distillée.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant la quercétine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent quercétine /g d'extrait.

I-4-3- dosage des tanins condensés (Pro-anthocyanidines)

La teneur en pro-anthocyanidines a été mesurée en suivant le protocole de Sun et *al.*, (1998) in Adedapo et *al.*, (2009).

La méthode utilisée pour doser les pro-anthocyanidines est celle de la vanilline qui consiste à former un complexe de couleur rouge avec les tanins condensés (Schofield et *al.*, 2001).

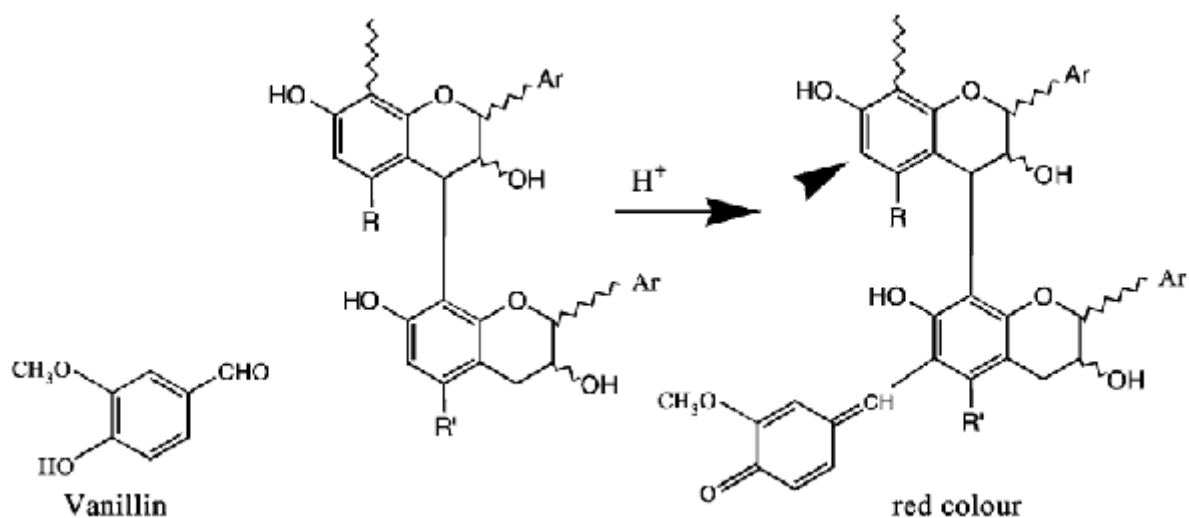


Figure 24 : réaction de la vanilline avec les tanins condensés (Schofield et *al.*, 2001).

Un volume de 0,5 ml de la solution d'extrait (1 mg/ml) a été mélangé avec 3 ml de la solution de vanilline (4%, w/v), préalablement préparée dans du méthanol, et 1,5 ml d'HCl (37%). Le mélange a été bien agité, puis incubé pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 500 nm.

Un blanc a été préparé en mélangeant 0,5 ml d'extrait avec 3 ml de méthanol et 1,5 ml d'HCl.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant la catéchine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent catéchine /g d'extrait.

I-5- Activités anti-oxydantes des extraits

L'activité anti-oxydante a été évaluée en testant l'activité scavenging du radical DPPH, le pouvoir réducteur et en dosant l'activité chélatrice du fer des extraits.

I-5-1- Activité scavenging du radical DPPH

La mesure de l'activité scavenging du radical DPPH a été effectuée en suivant le protocole de Hemalatha *et al.*, (2010). Le 1,1-Diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est un radical libre stable centré sur l'azote, dont la couleur change du violet au jaune après réduction par le processus de donation, soit d'hydrogène ou bien d'électron (**Hinneburg *et al.*, 2006**).

Une solution de DPPH (0,1 mM) a été préparée dans du méthanol, et 1 ml de cette solution a été ajouté à 3 ml de solution d'extrait à différentes concentrations. Après incubation pendant 30 min et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

Le contrôle a été préparé en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol.

Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 1 ml de méthanol avec 3 ml de solution d'extrait.

L'acide ascorbique et la BHA ont été utilisés comme standards et à différentes concentrations.

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging du radical DPPH} = [(Ac - (At - Ae))/Ac] \times 100$$

Où :

Ac : Absorbance du contrôle ; c'est l'absorbance du blanc contenant seulement le DPPH.

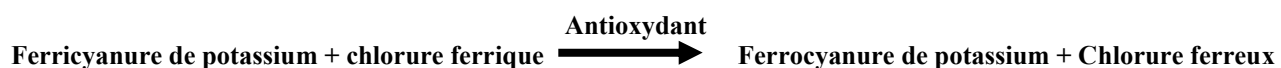
At : Absorbance du test ; c'est l'absorbance de la solution de DPPH contenant l'extrait.

Ae : Absorbance de l'extrait ; c'est l'absorbance de la solution de l'extrait sans le DPPH.

I-5-2- Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits de *Camellia sinensis* a été déterminé selon le protocole d'Oyaizu (1986) in Ogunlana et Ogunlana (2008) avec quelques modifications.

Les extraits qui possèdent un potentiel réducteur réagissent avec le Ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) pour former le Ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}), qui réagit ensuite avec le Chlorure ferrique (FeCl_3) pour donner un complexe ferrique ferreux mesurable à 700 nm (**Jayanthi et Lalitha, 2011**).



(9)

1 ml de solution d'extrait (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a été mélangé avec 2,5 ml de solution tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et 2,5 ml de solution de Ferricyanure de potassium à 1% ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 min, puis les tubes à essais ont été retirés en leur rajoutant 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% (TCA). Ensuite, le mélange a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min.

A 2,5 ml du surnageant ont été ajoutés 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de FeCl_3 à 0,1% et la mesure de l'absorbance a été effectuée à 700 nm.

Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol, et la BHA a été utilisée comme standard. Le pouvoir réducteur des extraits augmente avec l'augmentation de l'absorbance.

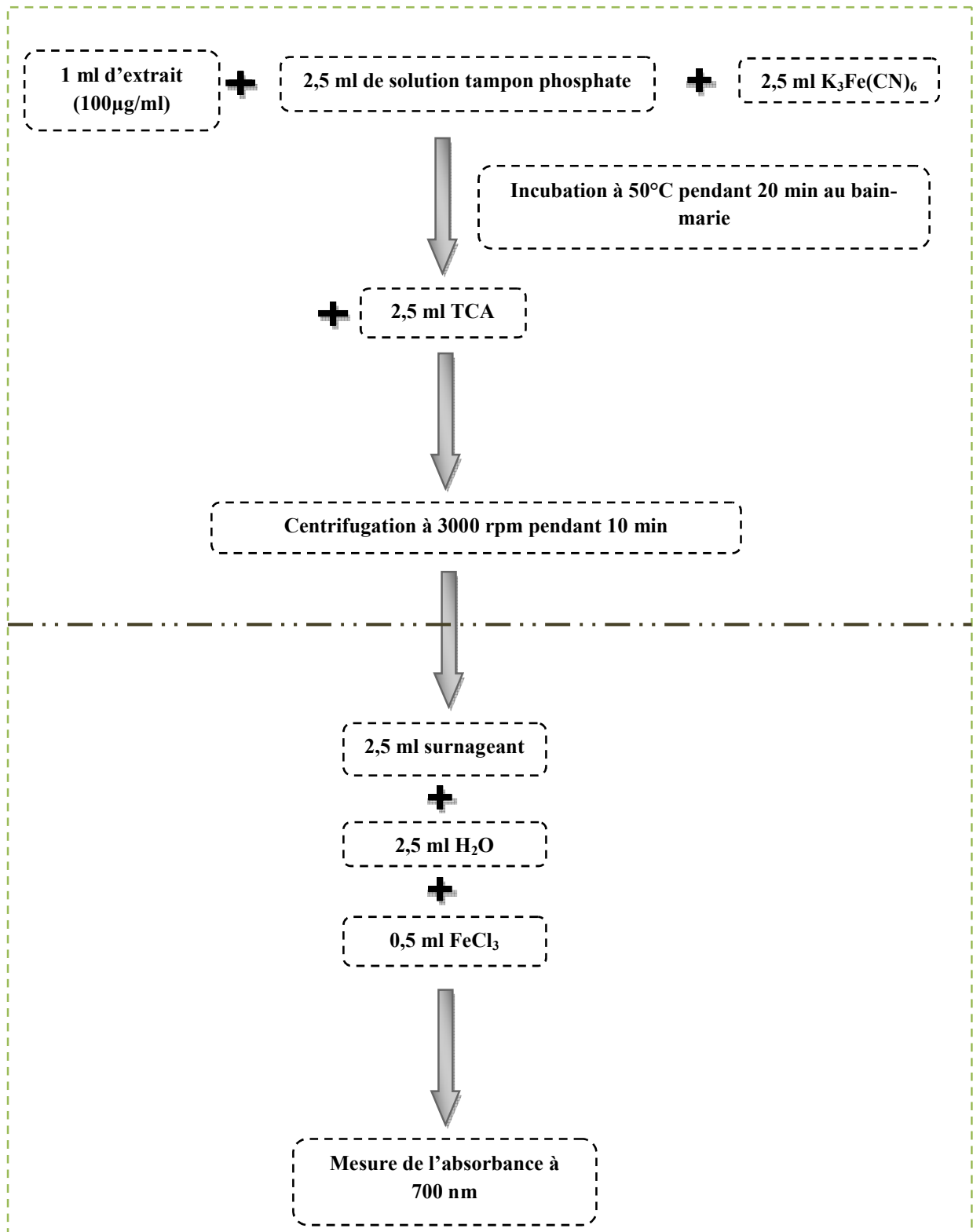


Figure 25 : Schéma du protocole du pouvoir réducteur (Oyaizu, 1986).

I-5-3- L'activité chélatrice du fer

L'activité chélatrice du fer de notre plante a été mesurée selon le protocole de Denis et *al.*, (1994) in Kontoghiorghes, (1995).

La ferrozine forme un complexe violet avec le Fe^{2+} . En présence d'un agent chélateur, la formation du complexe est interrompue, et par conséquent, la couleur violette du complexe diminue (**Hazra et al., 2008**).

A 100 μl d'extrait (100 $\mu\text{g/ml}$) ont été ajoutés 200 μl de Fe Cl_2 (0,2 mM) et 500 μl d'eau distillée. Le mélange a été bien agité, puis 200 μl de ferrozine (5mM) ont été ajoutés. Après agitation et incubation pendant 10 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 562 nm.

Le contrôle a été préparé en utilisant le méthanol à la place de l'extrait et un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 100 μl de la solution d'extrait avec 900 μl d'eau distillée.

Pour le dosage de cette activité chélatrice, l'EDTA a été utilisé comme standard.

Le pourcentage de l'activité chélatrice du fer de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité chélatrice du fer} = \frac{[(\text{Ac} - (\text{At} - \text{Ae})) / \text{Ac}] \times 100}{}$$

Où :

Ac : Absorbance du contrôle ; c'est l'absorbance du blanc contenant seulement les réactifs.

At : Absorbance du test ; c'est l'absorbance de la solution d'extrait et des réactifs.

Ae : Absorbance de l'extrait ; c'est l'absorbance de la solution contenant seulement l'extrait.

I-6- Etude statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne \pm écarts-types. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel STATISTICA (ANOVA/MANOVA). Les différences ont été considérées d'être significatives à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC_{50} ont été calculées en utilisant le logiciel Origin8.



Résultats et discussion



" Etre homme de thé, c'est être le médecin de son esprit "

(vieil adage chinois)

II- Résultats et discussion

II-1- Extraction

Le taux d'extraction des composés phénoliques dépend de la méthode, la nature du solvant, la température et la taille des particules constituant la poudre de la plante (**Chavan et al., 2001 ; Goli et al., 2004 ; Mukhopadhyay et al., 2005**). Dans notre travail, afin d'obtenir des combinaisons phénoliques distinctes, une extraction liquide-solide sélective a été réalisée en utilisant trois solvants de différente polarité, deux solvants polaires : l'éthanol et l'eau et un solvant apolaire : le chloroforme.

D'ailleurs, commencer l'extraction par l'éthanol est intéressant car ce dernier représente un solvant permettant la dissolution de la majorité des composés phénoliques (**Cowan, 1999**).

Une fois les extraits secs, le calcul du taux d'extraction pour chaque extrait a donné les résultats suivants :

Tableau IV : les pourcentages d'extraction des extraits de *Camellia sinensis*.

Extrait	Taux d'extraction
Extrait éthanolique des feuilles	8,74%
Extrait du chloroforme des feuilles	29,31%
Extrait aqueux du chloroforme des feuilles	42,82%

D'après ces résultats, non seulement, le rendement d'extraction de l'extrait éthanolique a donné un taux appréciable (8,74%) en accord avec les travaux menés par Gramza-Michalowska, (2007), sur les extraits des feuilles de *Camellia sinensis*, qui est de 12,61%. mais en plus ça montre à quel point notre plante regorge de métabolites secondaires. Ces composés phytochimiques seraient doués d'activités biologiques et joueraient un rôle clé dans la prévention et le traitement de nombreuses maladies (**Arab et al., 2011**).

Nous constatons aussi que c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a exhibé le taux d'extraction le plus élevé comparé à l'extrait organique du chloroforme. Cela pourrait supposer la richesse des feuilles de *Camellia sinensis* en composés de polarité élevée dont les composés phénoliques, étant donné leur richesse en groupements hydroxyles (**Iris et al., 1999**).

II-2- Dosage des composés phénoliques

II-2-1- Les phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles de *Camellia sinensis*, exprimées en mg équivalent acide gallique/g d'extrait, sont représentées dans la figure ci-dessous :

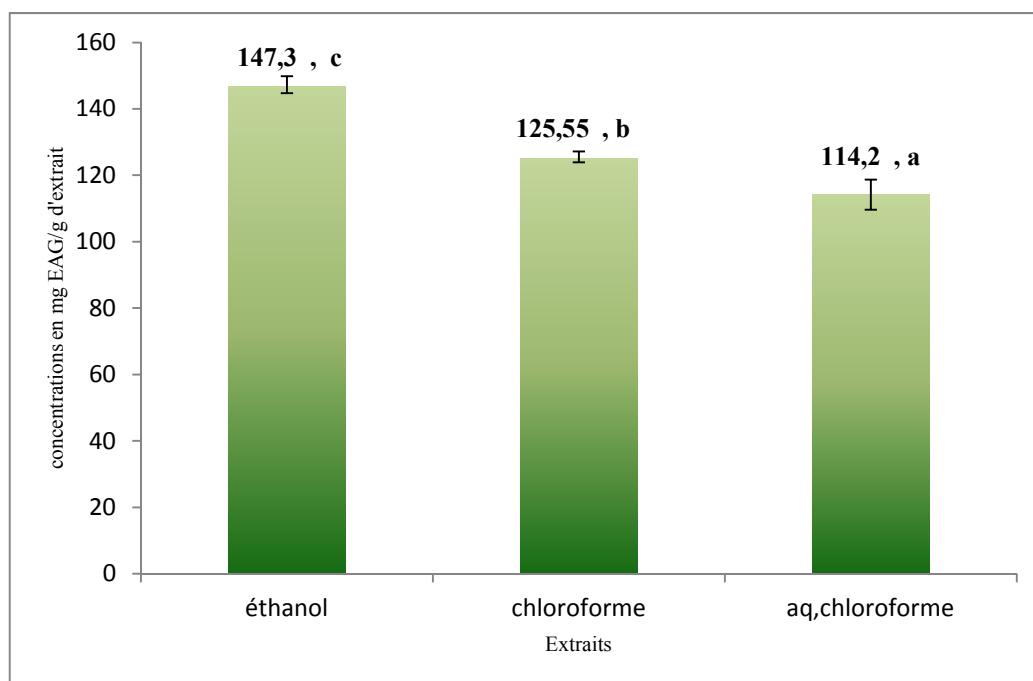


Figure 26 : teneurs en phénols totaux dans les extraits des feuilles de *Camellia sinensis*.

D'un aspect général, on aperçoit que la teneur en phénols totaux varie de ($114,2 \pm 4,52$ à $147,3 \pm 2,54$) mg équivalent acide gallique/g d'extrait, semblable aux résultats obtenus par Hajimahmoodi et al., (2008) sur les extraits des feuilles de *Camellia sinensis*, qui est de $108 \pm 0,07$ mg équivalent acide gallique/g d'extrait, cela confirme la richesse de *Camellia sinensis* en composés phénoliques. En effet, une étude réalisée par Kähkönen et al., (1999) a montré que la quantité en phénols totaux variait beaucoup dans les plantes et que ces dernières pouvaient être regroupées en plusieurs classes qui sont les suivantes :

- Une classe à faible quantité : 0,2 à 1,3 mg EAG/g de poudre de plante.
- Une classe à quantité modérée : 9,1 à 23,1 mg EAG /g de poudre de plante.
- Une classe à quantité élevée : 12,4 à 50,8 mg EAG/g de poudre de plante.
- Une classe à quantité très élevée : 17, 5 à 155,3 mg EAG/g de poudre de plante.

Par conséquent, on pourrait dire que notre plante fait partie de la classe à quantité très élevée.

De plus, il est essentiel de souligner que c'est l'extrait éthanolique qui a donné la concentration en phénols totaux la plus élevée ($147,3 \pm 2,54$) ; cela est évident étant donné que c'est l'extrait brut et

donc le reste des extraits à analyser proviennent de cet extrait initial ; en d'autres termes, c'est le précurseur des autres extraits de plante.

II-2-2- Les flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes des extraits des feuilles de *Camellia sinensis*, exprimé en mg équivalent quercétine/ g d'extrait, figure dans l'histogramme suivant :

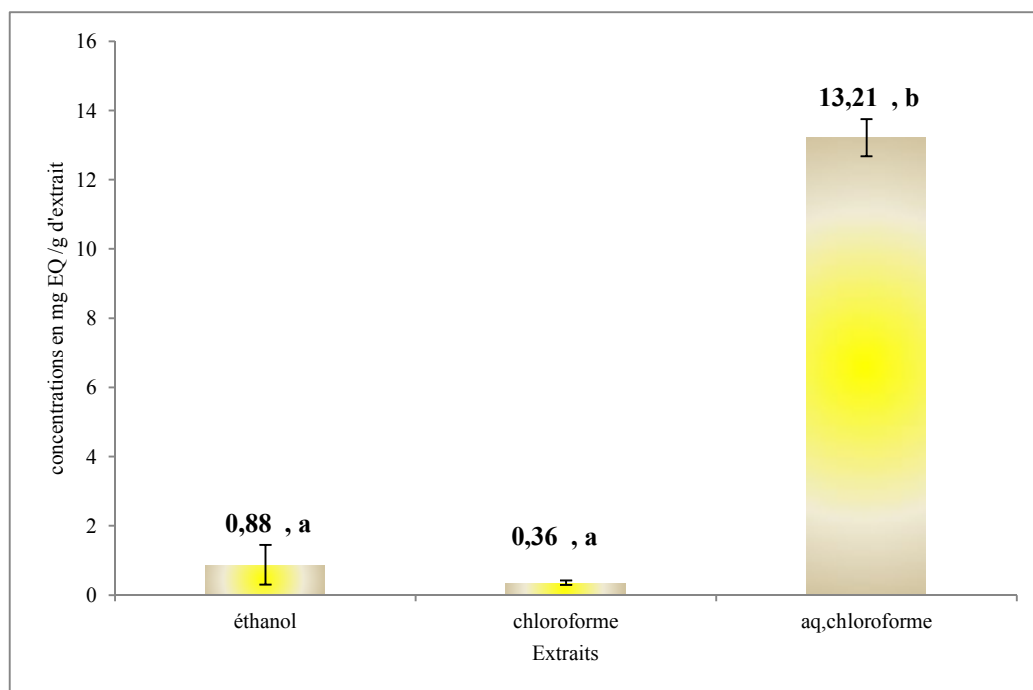


Figure 26 : teneurs en flavonoïdes dans les extraits des feuilles de *Camellia sinensis*.

Une vue d'ensemble de cette représentation graphique, nous montre que l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles de *Camellia sinensis* a présenté la teneur la plus élevée en flavonoïdes qui est de $13,21 \pm 0,53$ mg équivalent quercétine/g d'extrait, contrairement à l'extrait du chloroforme qui a montré la teneur la plus faible ($0,36 \pm 0,06$ mg) ; tous compte fait, ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Hajimahmoodi et al., (2008) qui est de $19,17 \pm 0,22$ mg équivalent quercétine/g d'extrait.

Cela serait dû au fait que les flavonoïdes sont de petites molécules très polaires, résultant de leur abondance en groupements hydroxyles, donc insolubles dans le chloroforme.

Il ne faut pas nier une constatation fulgurante concernant le taux infime de l'extrait éthanolique ($0,88 \pm 0,57$ mg équivalent quercétine/g d'extrait) comparé à celui de l'extrait aqueux du chloroforme. En réalité, bien qu'il soit riche en flavonoïdes ou qu'il en contienne tout simplement la totalité, le réactif révélateur qui est le $AlCl_3$ n'a pas pu les détecter entièrement, on pourrait supposer que cela soit dû au fait que les groupements réagissant avec ce réactif ne soient pas

disponibles dans l'extrait mère de *Camellia sinensis* à cause de l'encombrement stérique engendré, ou bien au fait qu'il se formerait des interactions intermoléculaires entre eux mettant en œuvre ces groupements révélateurs dans divers types de liaisons physico-chimiques.

II-2-3- Les pro-anthocyanidines

Les résultats de dosage des pro-anthocyanidines dans les feuilles de *Camellia sinensis*, exprimés en mg équivalent catéchine/g d'extrait, sont représentés dans la figure suivante :

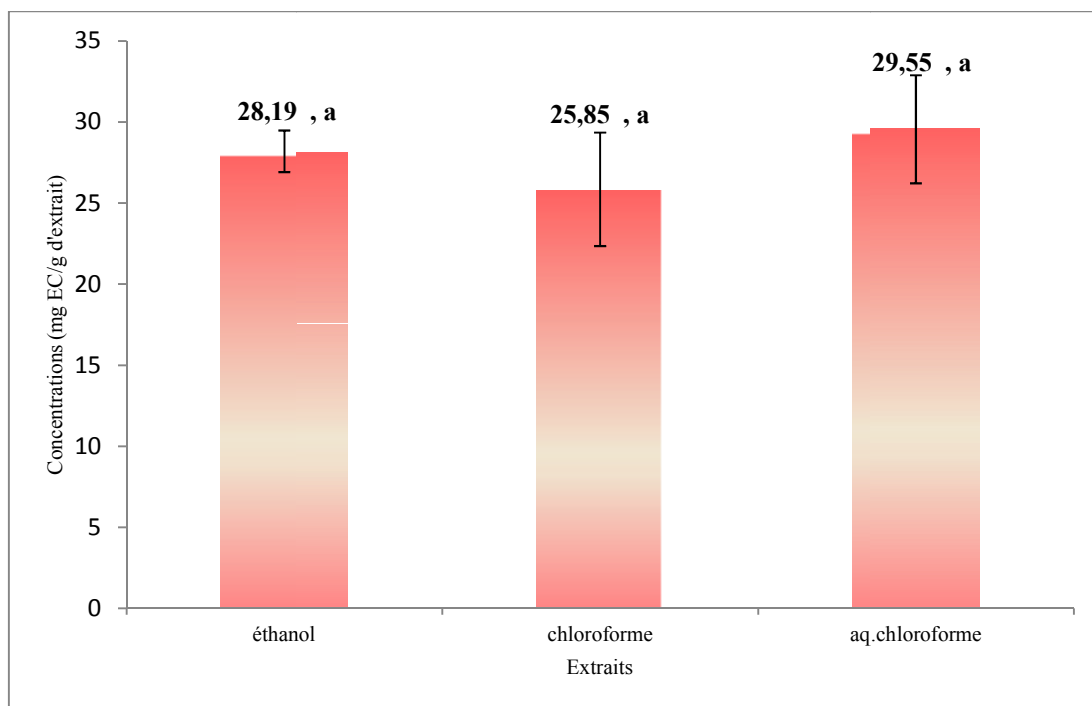


Figure 27 : teneurs en pro-anthocyanidines dans les extraits des feuilles de *Camellia sinensis*.

D'après l'histogramme, notre plante serait riche en pro-anthocyanidines, car les concentrations varient entre $(25,85 \pm 3,50$ à $29,55 \pm 3,33)$ mg équivalent catéchine/g d'extrait avoisinant les 29,62mg correspondant au taux trouvé par Hajimahmoodo et *al.*, (2008).

Nous faisons remarquer également que l'extrait aqueux du chloroforme a donné la teneur la plus élevée $(29,55 \pm 3,33)$ contrairement à l'extrait organique du chloroforme, puisque les pro-anthocyanidines sont des polymères riches en groupements hydroxyles, donc solubles dans les solvants polaires.

Concernant l'extrait éthanolique, on remarque qu'il a montré une portion en tanins condensés $(28,19 \pm 1,28)$ légèrement inférieure à celle de l'extrait aqueux du chloroforme, et cela est dû à l'encombrement stérique engendré par l'accumulation des composés phénoliques étant donné que c'est l'extrait initial

II-3- L'activité anti-oxydante

II-3-1- L'activité scavenging du radical DPPH

L'étude de l'activité scavenging du radical DPPH selon le protocole de Hemalatha et *al.*, (2010), nous a fourni les résultats exprimés dans la figure suivante :

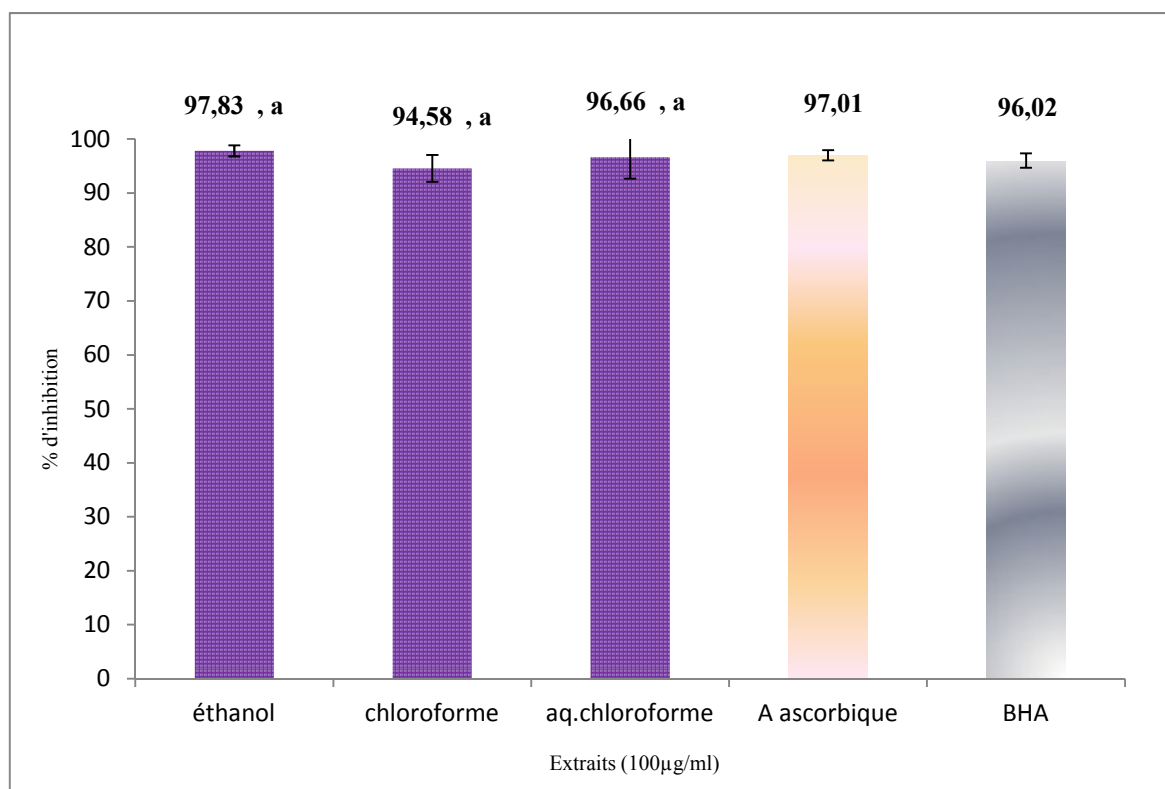


Figure 28 : les pourcentages de l'activité scavenging du radical DPPH des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et des standards.

A partir de cette figure, nous constatons que tous les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* ont dévoilé une très forte activité scavenging du radical DPPH, allant de 94,58% \pm 2,50 à 97,83% \pm 1,02 comparativement aux standards utilisés : l'acide ascorbique et la BHA qui ont donné des pourcentages d'inhibition de 97,01 % \pm 0,95 et 96,02% \pm 1,33 respectivement (à 100µg/ml).

Ces valeurs sont en étroites accord avec l'étude réalisée par Markowicz Bastos et *al.*, (2007), avec une teneur de 92,20% \pm 0,52 pour le potentiel scavenging du radical DPPH.

Au terme de l'analyse, il semblerait que les résultats obtenus dans l'activité scavenging du radical DPPH sont en corrélation avec les taux en phénols totaux ($R = 0,52$), et plus précisément avec les pro-anthocyanidines ($R = 0,74$) qui constituent de puissants agents antioxydants, étant donné leur richesse en groupements hydroxyles. Or, c'est l'extrait éthanolique qui a exhibé le pourcentage

scavenging du radical DPPH le plus élevé ($IC_{50} = 3,94$) étant donné qu'il est le précurseur, donc englobe la totalité des composés phénoliques, suivi de près par l'extrait aqueux du chloroforme puisqu'il renferme les teneurs en flavonoïdes et en pro-anthocyanidines les plus élevées, sachant que ces derniers constituent de puissants antioxydants (Iris *et al.*, 1999), contrairement à l'extrait organique du chloroforme.

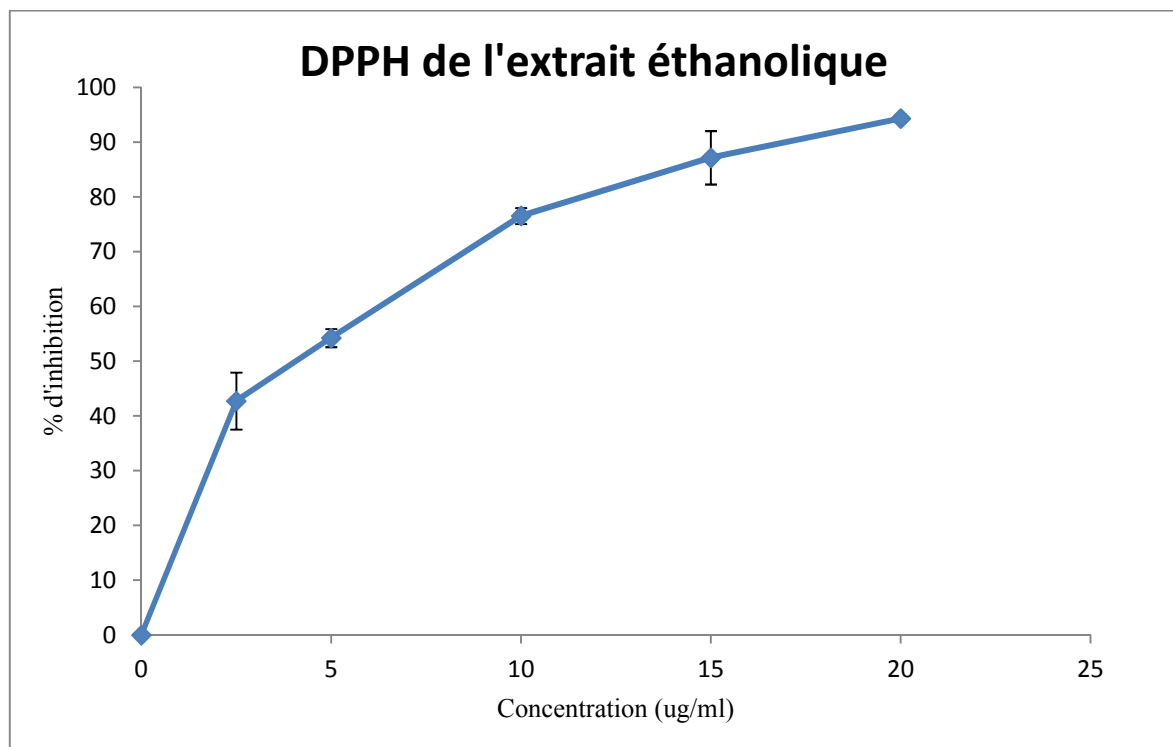


Figure 29 : activité scavenging du radical DPPH des différentes concentrations de l'extrait éthanolique des feuilles de *Camellia sinensis*.

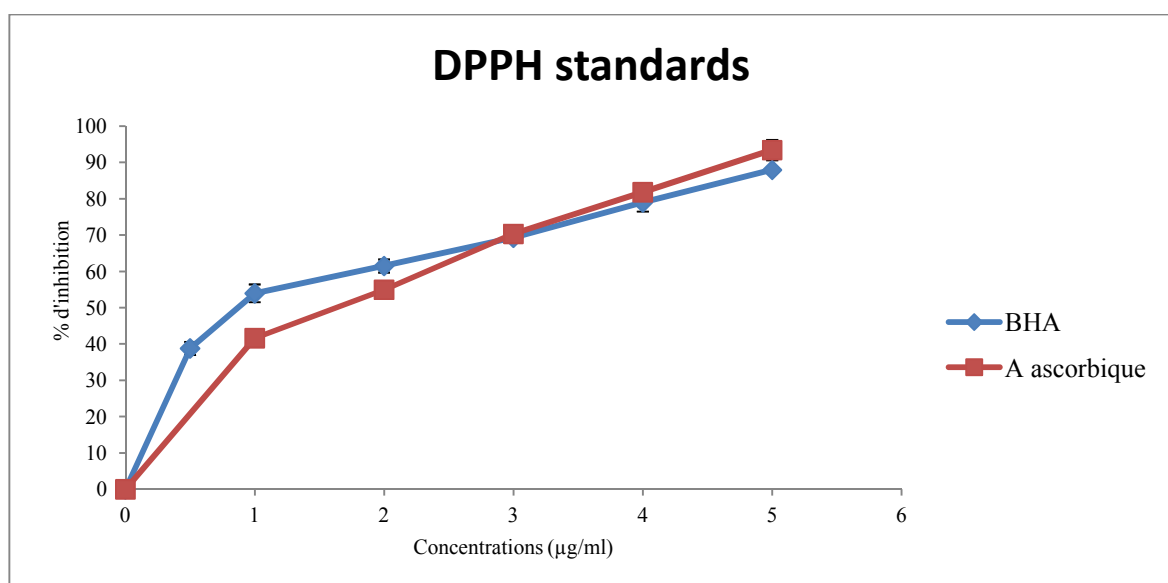


Figure 30 : activité scavenging du radical DPPH des différentes concentrations des standards (BHA et Acide ascorbique)

A partir de la figure, on constate que le pourcentage d'inhibition de l'activité scavenging du radical DPPH dépend de la concentration de l'extrait éthanolique des feuilles de *Camellia sinensis* qui a montré une IC_{50} de $3,94\mu\text{g/ml}$, cette dernière est voisine de celle retrouvée par Khalaf et *al.*, (2008) qui est de $6,7\mu\text{g/ml}$.

Il est important de noter que l'activité scavenging du radical DPPH dépend de la concentration des extraits, plus la concentration est élevée plus le pourcentage d'inhibition augmente et l' IC_{50} de l'extrait éthanolique des feuilles a été de $9.24\mu\text{g/ml}$ légèrement supérieure à celles des standards utilisés la BHA et l'acide ascorbique qui sont respectivement de $IC_{50} = 0.98\mu\text{g/ml}$ et $IC_{50} = 1,61\mu\text{g/ml}$.

II-3-2- Le pouvoir réducteur

Les absorbances proportionnelles à la réduction de l'ion ferrique Fe^{3+} en ion ferreux Fe^{2+} dans le test du pouvoir réducteur des extraits, sont regroupées dans la figure suivante :

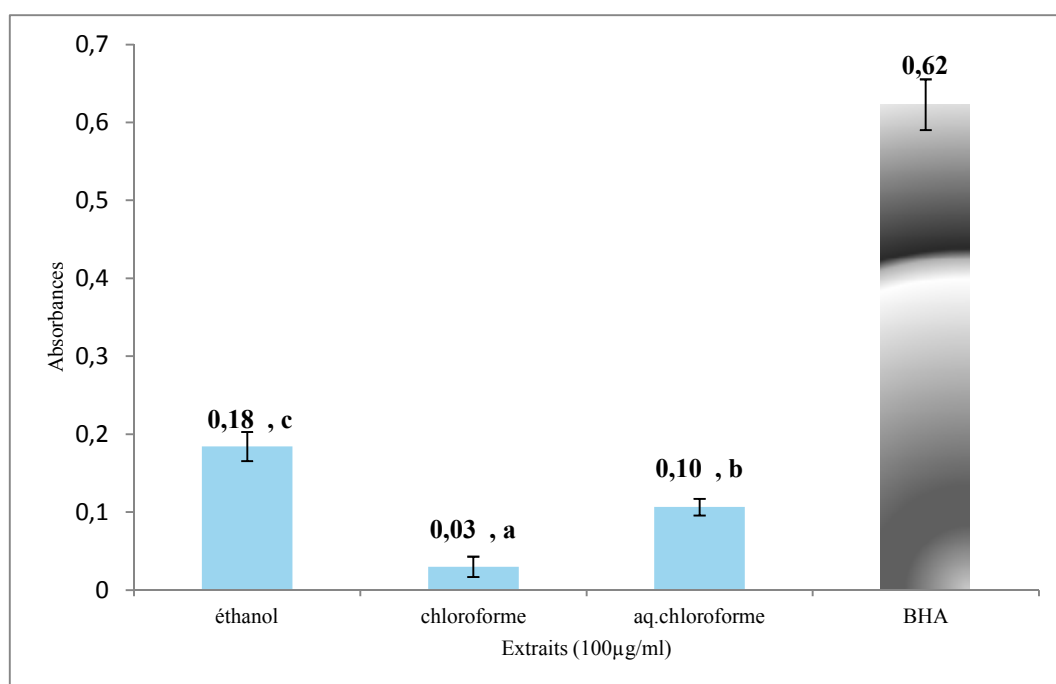


Figure 31 : Représentation graphique de l'absorbance de l'ion ferreux (Fe^{2+}) du pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *Camellia sinensis*.

A partir de cet histogramme, on remarque en premier lieu que les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* ne possèdent pas un fort pouvoir réducteur (de $0,03 \pm 0,013$ à $0,18 \pm 0,018$) comparativement à la BHA ($0,62 \pm 0,03$).

L'extrait éthanolique nous confère la plus grande absorbance ($0,18 \pm 0,018$) ; étant donné que c'est l'extrait brut. L'extrait organique du chloroforme a donné un pouvoir réducteur plus faible

($0,03 \pm 0,01$) que celui de l'extrait aqueux du chloroforme ($0,10 \pm 0,013$), vu la richesse de ce dernier en flavonoïdes et en pro-anthocyanidines caractérisés par leur abondance en groupements hydroxyles donneurs d'électrons et d'hydrogène.

Nous déduisons également que le pouvoir réducteur des extraits est en parfaite corrélation avec les teneurs en phénols totaux ($R = 0,65$) et en pro-anthocyanidines ($R = 0,62$).

Bien que nos extraits soient riches en flavonoïdes, nous constatons qu'il n'y a pas une corrélation ($R = 0,03$) entre les teneurs en flavonoïdes et le pouvoir réducteur ; cela pourrait bien s'expliquer par le fait que le pouvoir réducteur de nos extraits est indépendant de la quantité en flavonoïdes mais plutôt de la nature biochimique de ces composés.

II-3-3- La chélation du fer

Les pourcentages de l'activité chélatrice du fer sont représentés dans l'histogramme suivant :

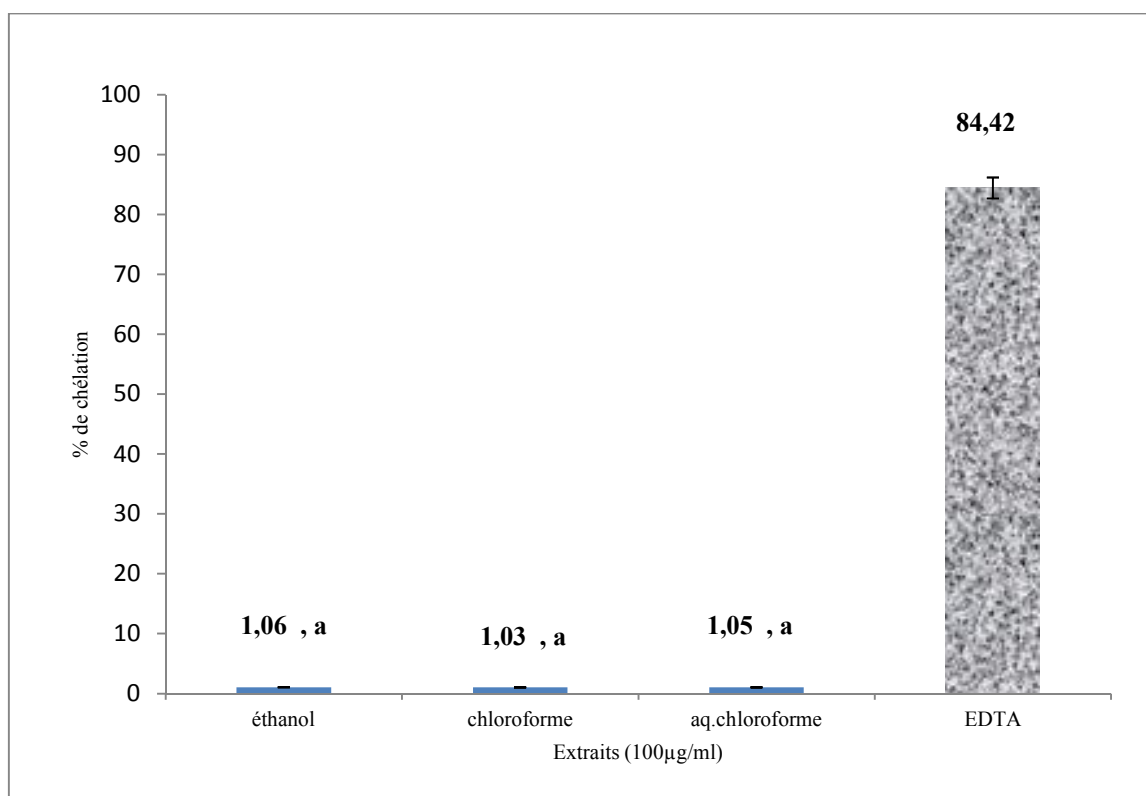


Figure 32 : Représentation graphique du pourcentage de l'activité chélatrice du fer des extraits des feuilles de *Camellia sinensis*.

Une vue générale nous permet de conclure que les extraits présentent une très faible activité chélatrice du fer allons de $1,03\% \pm 0,003$ à $1,06\% \pm 0,03$, comparée au standard utilisé qui est l'EDTA ($84,42\% \pm 1,74$).

Quoique, ces valeurs s'inclinent largement devant celles retrouvées par Gramza-Michalowska, (2007) qui sont de 15,38% à 23,52%. Cela serait dû probablement aux différences de la qualité du thé, son degré de fermentation, la région géographique de la croissance, le temps de l'année où les feuilles ont été récoltés et à la variation de condition de stockage.

Malgré que la chélation du fer ait montré une parfaite corrélation avec les teneurs en proanthocyanidines ($R = 0,78$), cela n'a pas été le cas quant aux flavonoïdes qui ont donné une faible corrélation ($R = 0,24$). Cette contradiction pourrait être dû au fait que la chélation du fer dépendrait de la nature physico-chimique des composés phénoliques et non pas de la quantité de ces derniers.

Le pourcentage de l'activité chélatrice du fer ne dépend pas des différentes concentrations des extraits, c'est pour cela les IC_{50} n'ont pas été déterminées.



Conclusion et perspectives



"Que ton aliment soit ta seule médecine".

Hippocrate Père fondateur de la médecine Occidentale

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours une source fiable de principes actifs, dont *Camellia sinensis* (thé vert) serait considérée comme la panacée des temps, étant dotée de vertus thérapeutiques remarquables. Cette plante ne cessera jamais de nous surprendre avec sa fabuleuse panoplie d'activités biologiques surtout en ce qui concerne ses effets neurologiques en particulier stimulants.

Ainsi, notre étude réalisée sur les extraits des feuilles de *Camellia sinensis*, nous a permis d'émettre les résultats suivants :

- Le taux d'extraction obtenu montre que *Camellia sinensis* serait plus riche en composés phytochimiques polaires que apolaires d'où l'intérêt peut être de leur incorporation dans les aliments hydrophiles, dans l'industrie alimentaire.
- L'évaluation du contenu en phénols totaux en adoptant la méthode de Folin ciocalteu révélerait des teneurs importantes en composés phénoliques.
- Le dosage des flavonoïdes par la méthode de Mimica-Dukic (1992), nous a mené à conclure que la plante contiendrait des taux considérables en flavonoïdes.
- Quant aux proanthocyanidines, la méthode de la vanilline nous a révélée des concentrations modérées.
- Le potentiel anti-radicalaire des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* a été déterminé par la mesure de l'activité scavenging du radical DPPH, et les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité ($IC_{50} = 3,94 \mu\text{g/ml}$).
- Le pouvoir réducteur de notre plante a été déterminé par le concept de réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) ; les absorbances ont montré que nos extraits possèdent un faible pouvoir réducteur.
- L'activité chélatrice du fer des extraits des feuilles de *Camellia sinensis*, mesurée par le protocole de Denis (1994), a présenté des pourcentages faibles comparés à celui du standard utilisé (EDTA).
- Finalement, vue les corrélations existantes entre les activités anti-oxydantes testées et les composés phénoliques, cela suggérerait que les composés phénoliques seraient probablement responsables de ces activités.

Perspectives

Notre pays possède une biodiversité immense en plantes médicinales caractérisées par un taux élevé en métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent à être exploitées par les recherches ; de ce fait et comme perspectives on propose et on espère:

- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pouvant répondre aux différents problèmes de la santé et être une alternative aux médicaments synthétiques.
- Développer des médicaments anti-radicalaires à base de plantes, doués d'une activité antioxydante.
- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation d'études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante des composés phénoliques.
- Aller au-delà des tests des extraits bruts, et tenter d'isoler, de purifier et d'identifier d'autres constituants biochimiques et de réaliser des tests *in vivo* pour s'assurer de l'efficacité antiradicalaire et de la non toxicité de ces composés.
- Encourager l'utilisation des constituants de *Camellia sinensis* comme principes actifs dans les traitements préventifs des maladies neurodégénératives (Alzheimer) et l'amélioration du développement et du fonctionnement cérébrale dans le cas de la trisomie 21.

Références



*Les excès ruinent plus de santés que la médecine ne saurait en rétablir."
Citation d'Axel Oxenstiern ; Réflexions et maximes - 1645.*

Références bibliographique

- Abdou Bouba A., Njintang Y.N., Scher J. et Mbofung C.M.F. (2010). Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices. *Agriculture and Biology Journal of North America*, **1**(3): 213-224.
- Adedapo A. A., Jimoh F. O., Afolayan A. J. et Masika P. J. (2009). Antioxidant Properties of the Methanol Extracts of the Leaves and Stems of *Celtis Africana*. *Rec. Nat. Prod*, **3** (1): 23-31.
- Adrian J., Potus J. et Frangne R. (1995). La science alimentaire de A à Z. 2^{ème} édition. *Ed Tec & Doc*, p: 32.
- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. et Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l’oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, **74**: 636–643.
- Arab H., Maroofian A., Golestani S., Shafae H., Sohrabi K. et Forouzanfar A. (2011). Review of The therapeutic effects of *Camellia sinensis* (green tea) on oral and periodontal health. *Journal of Medicinal Plants Research*, **5**(23): 5465-5469.
- Arnal-Schnebelen B., Goetz P., Paris M., Grassart E., Hunin M., Iserin P., Jacquemin M., Lejeune R. et Leroux J. (2008). Les plantes médicinales. 2^{ème} édition. *Ed Selection du Reader’s Digest*, p: 214.
- Aubert L. (2009). Les catéchines : entre promesses et réalité. *Haute école de santé Genève*.
- Balasundram N., Sundram K. et Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**: 191–203.
- Barouki R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine Sciences*, **22** (3): 266-272.
- Baudin B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*, **2** (1): 43-52.
- Beani J.C. (1999). La photoprotection. *Expansion Scientifique Publications*, **39**(4) : 311-323.
- Beaudeau J. L., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A., Peynet J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l’athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, **21**: 144–150.
- Berger M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20**: 48–53.

- Boizot N. et Charpentier J. P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. p: 79- 82.
- Bonnefont-Rousselot D., Peynet J., Beaudoux J. L., Thérond P., Legrand A. et Delattre J. (2002). Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**: 260–267.
- Bossu C. M., Ferreira E. C., Chaves F. S., Menezes E. A. et Nogueira A. R. A. (2006). Flow injection system for hydrolysable tannin determination. *Microchemical Journal*, **84**: 88-92.
- Bravo L. (1998). Polyphenols : chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56** (11): 317-330.
- Bruneton J. (2008). Pharmacognosie: phytochimie, plantes medicales. *Edition Tec et Doc*, p: 199- 339.
- Cai Y.Z., Sun M., Xing J., Luo Q. et Corke H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, **78**: 2872-2888.
- Catier O. et Roux D. (2007). Botanique pharmacognosie phytothérapie. 3^{ème} édition. *Wolters*
- Chavan U. D., Shahidi F. et Naczk M. (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus L.*) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, **75**: 509-512.
- Chira K., Suh J.H. et Teissedre P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, **6**: 75-82.
- Cillard J. et Cillard P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **13** (1): 24-29.
- Coene I. (2004). Les antioxydants et l'alimentation. *Nutritionniste, Nutrition Information Center NICE Nutrinews*, **4**.
- Cowan M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, p: 564-582.
- Curtay J. P. et Robin J. M. (2000). Interet des complexes antioxydants. *Centre d'étude et de développement de la nutrithérapie*.
- Curtin J.F., Donovan M. et Cotter T.G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*, **265**: 49-72.
- Cuvelier C., Dotreppe O. et Istasse L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vét.*, **147**: 315-324.
- De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J. et Lekeux P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Ann. Méd. Vét.*, **149**: 1-9.

- Debuigue G. et Couplan F. (2009). Petit larousse des plantes medicinales. *Larousse Paris*, p: 258.
- Durand T., Cracowski J. L. et Berdeaux O. (2005). Les isoprostanes, biomarqueurs de peroxydation lipidique chez l'homme. Partie 1. Nomenclature et synthèse. *Pathologie Biologie*, **53**: 349–355.
- Duranteau J., Chandel N. S., Kulisz A., Shao Z. et Schumacker P. T. (1997). Les radicaux libres : Messagers intracellulaires au cours de l'hypoxie. *40^{ème} congrès de la SFAR, R512*, p: 1068.
- Etiemble J. (2007). Maladie d'Alzheimer : enjeux scientifique, médicaux et sociétaux. *Edition Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale)*, p: 672.
- Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*, p: 108-115.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003). Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *l'actualité chimique*, p: 91-96.
- Ghibu S., Richard C., Delemasure S., Vergely C., Mogosana C. et Muresan A. (2008). Un dithiol endogène aux propriétés antioxydantes : l'acide alpha lipoïque, utilisation potentielle dans les pathologies cardiovasculaires. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, **57**: 161–165.
- Ghisolfi-Marque A., Boyer M.J., Vellas B., Thouvenot J.P., Albarède J.L. et Ghisolfi J. (1996). Activité antioxydante, lipoperoxydation et vieillissement chez l'homme. *Nutr. Clin. Métabol.*, **10**: 151- 160.
- Goli A. H., Barzegar M. et Sahari M. A. (2004). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, **92**: 521-525.
- Goudable J. et Favier A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr. Clin. Métabol.*, **11**: 115-120.
- Gramza-Michalowska A. (2007). Antioxidant potential and radical scavenging activity of different fermentation degree tea leaves extracts. *The Agricultural University of August Cieszkowski, Wojska Polskiego*, **31**: 60-624.
- Groussard C. (2006). Stress oxydatif et exercice anaérobie. *Science & Sport*, **21**: 62-67.
- Guignard J. L. (2002). Biochimie végétale. 2^{ème} édition. *Ed Dunod, paris*, p: 169.
- Hajimahmoodi M., Hanifeh M., Oveisi M. R., Sadeghi N. et Jannat B. (2008). Determination of total antioxidant capacity of green teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, **5** (3):167-172.

- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, **52**: 253-265.
- Hazra B., Biswas S. et Mandal N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **8**: 63.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R. et Bobilya D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**: 572-584.
- Hemalatha S., Lalitha P. et Arulpriya P. (2010). Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothos aurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, **2** (6): 84-89.
- Hinnebeurg I., Damier-Dorman H. J. et Hiltunen R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, **97**: 122- 129.
- Holgrem A. (2003). Redox regulation of genes and cell function in Critical review of oxidative stress and aging. *RG Cutler and H Rodriguez Eds. World Scientific*, **2**: 102-111.
- Hoorn D. E. C. V., Nijveldt R. J., Leeuwen P. A. M. V., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D. B. A. et Norren K. V. (2002). Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*, **451**: 111-118.
- Huet O. et Duranteau J. (2008). Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres. *Réanimation*, **17**: 387- 392.
- Iris F., Benzie F. et Szeto Y. T. (1999). Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem*, **47**: 633-636.
- Iserin P., Masson M., Restellini J.P., De La Rocque R. et De La Roque O. (2007). Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. *Ed Larousse, Paris*.
- Jadot G. (1988). Les superoxide-dismutases: biochimie, pharmacologie, thérapeutique. *Masson, paris*, **1**: 224.
- Jaulin B. (2011). La vogue du thé vert. *Tutélaire*, N° 248.
- Jayanthi P. et Lalitha P. (2011). Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia Crassipes* (MART.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **3** (3).
- Judde A. (2004). Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications? *OCL*, **11** (6): 414- 418.
- Jungbluth G. (2008). Les espèces réactives de l'oxygène et leurs principales implications dans la phosphopathologie canine. *Thèse de doctorat a l'université claud-Bernard-Lyon I*.

- Kähkönen M. P., Hopta A. I., Vuorela H. J., Rauha J. P., Pihlaja K., Kujala T. S. et Heinonen M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47** (10): 3954-3962.
- Kassab A., Laradi S., Ferchichi S., Omezzine A., Charfeddine B., Ammar H., Chaieb L. et Miled A. (2003). Paramètres du stress oxydant dans le diabète de type 2. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, **18**: 79- 85.
- Khalaf N.A., Shakya A.K., Al-othman A., El-agbar Z. et Farah H. (2008). Antioxidant Activity of Some Common Plants. *Turk J Biol*, **32**: 51-55.
- Khaled S., Brun J. F., Bardet L. et Cassanas G. (1997). Importance physiologique du zinc dans l'activité physique. *Science et sports*, **12**: 179- 191.
- Kim Y., Goodner K.L., Park J.D., Choi J., Talcott S.T. (2011). Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation. *Food Chemistry*, **129**:1331–1342.
- Kimura K., Ozeki M., Juneja L.R. et Ohira H. (2007). L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses. *Biol Psychol*, **74**(1):39-45.
Kluwer, France.
- Koechlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, **20**: 165–177.
- Kontoghiorghes G. J. et Weinberg E. D. (1995). Iron : Mammalian defense systems, mechanisms of diseases, and chelation therapy approaches. *Blood Reviews*, **9** (1): 33- 45.
- Krause D. O., Smith W. J. M., Brooker J. D. et McSweeney C. S. (2005). Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed Science and Technology*, **121**: 59–75.
- L'hénaff M. (2006). Stress oxydatif et VIH: les antioxydants qui déroutent. *Le journal du sida*, p: 188.
- Laguerre M., Lecomte J. et Villeneuve P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, **46**: 244–282.
- Laguerre M., López-giraldo L. J., Lecomte J., Pina M. et Villeneuve P. (2007). Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *OCL*, **14** (5): 278- 292.
- Lin C. M., Chen C. S., Chen C. T., Liang Y. C. et Lin J. K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**: 167-172.

- Lin H. C., Tsai S. H., Chen C. S., Chang Y. C., Lee C. M., Lai Z. Y. et Lin C. M. (2008). Structure–activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical pharmacology*, **75**: 1416- 1425.
- Liu R.H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, **46**: 207–219.
- Macheix J. J., Fleuriet A. et Sanni-Manchado P. (2006). Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, réparation et rôle *in* les polyphénols en agroalimentaire. *Edition Technologie et document, paris*, p: 380- 398.
- Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. *Thèse de l'université de Limoges*.
- Margail I., Plotkine M. et Lerouet D. (2005). Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, **39**: 429- 443.
- Markowicz Bastos D. H., Saldanha L. A., Catharino R. R., Sawaya A. C. H. F., Cunha I. B. S., Carvalho P. O. et Eberlin M. N. (2007). Phenolic antioxidants identified by ESI- MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Molecules*, **12**: 423- 432.
- Martin S. et Andriantsitohaina R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, **51**: 304–315.
- Maulice (2010). De l'étiquette à l'assiette : comprendre ce que l'on mange. *Au cœur de la science*.
- Mercan D. (2010). Le stress oxydatif in A. R. L. *Lausanne*, p: 1- 53.
- Monteil C., Mulder P. et Thuillez C., (2004). Stress oxydant et insuffisance cardiaque : une cible thérapeutique utopique ? *Médecine thérapeutique Cardiologie*, **2** (2): 78-85.
- Mukhopadhyay S., Luthria D. L. et Robbins R. (2005). Optimisation of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86** (1): 156-162.
- Naczki M., Amarwicz R., Zadernowski R. et Shahidi F. (2001). Protein precipitating capacity of condensed tannins of beach pea, canola hulls, evening primrose and fababean. *Food chemistry*, **73**: 467-471.
- Negre-salvayre A. et Salvayre R. (2005). Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : Implication en physiopathologie vasculaire. *OCL.*, **12**(5-6): 433-438.
- Nicholls P. (2012). Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics in press*.

- Ogunlana O.E. et Ogunlana O.O. (2008). *In vitro* assessment of antioxidant activity of *Newbouldia laevis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, **2**(8): 176-179.
- Owuor E. D. et Kong A. N. (2002). Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*, **64**: 765-770.
- Parihar A., Parihar M. S., Milner S. et Bhat S. (2008). Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*, **34**: 6-17.
- Peyrin-Biroulet L., Barraud H., Petit-Laurent F., Ancel D., Watelel J., Chone L., Hudziak H., Bigard M.A. et Bronowicki J.P. (2004). Hépatotoxicité de la phytothérapie: données cliniques, biologiques, histologiques et mécanismes en cause pour quelques exemples caractéristiques. *Gastroenterol Clin Biol*, **28**: 540-50.
- Peyrin-Biroulet L., Petitpain N., Kalt P., Ancel D., Petit-Laurent F. et Trechot P. (2004). Hépatotoxicité probable du gallate d'épigallocatechol utilisé en phytothérapie. *Gastroenterol Clin Biol*, **28**: 404-6.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. et Defraigne J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**: 233-239.
- Pincemail J., Defraigne J. O., Meurisse M. et Limet R. (1998). Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires, 2ème partie: la vitamine E. *Medi Sphere*.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J. O. (1999). Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Cœurs, Poumons*, **4**(4).
- Podsedek A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*, **40**: 1-11.
- Rachidi W. (2012). Lésions de l'ADN et maladie d'Alzheimer. *Santé*.
- Rahim A. A., Rocca E., Steinmetz J., Kassim M. J., Ibrahim M. S. et Osman H. (2008). Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. *Food Chemistry*, **107**: 200-207.
- Ravanat J.L. (2001). Oxydation singulière bien marquée. *Département de recherche fondamentale sur la matière condensée, SCIB, N°477*.
- Ré D. B., Nafia I., Nieoullon A., Le Goff L. K. et Had-Aissouni L. (2005). Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, **24**: 502-509.
- Ribéreau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. *Dunod, paris*.

- Rose P. A. (2001). Superoxide. 125 B chemistry Building. Department of chemical and biochemical engineering. *University of Iowa. Iowa City*, p:1- 9.
- Roy M. (2008). Etude des superoxyde dismutases (SOD) dans l'oviducte bovin. *Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie-endocrinologie pour l'obtention du grade de Maître es sciences (M.Sc.)*.
- Ruth J. (2006). Alzheimer: ce qui tue les neurones. *Illustrations A D E A R*.
- Sanders S. A., Eisenthal R. et Harrison R. (1997). NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase. Generation of superoxide anion. *European Journal of Biochemistry*, **245**: 541- 548.
- Saraf S., Ashawat M.S. et Saraf S. (2007). Flavonoids: A Nutritional Protection against oxidative and UV induced cellular damages. *Pharmacognosy Reviews*, **1**(1): 30- 40.
- Scharbert S. et Hofmann T. (2005). Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *J Agric Food Chem*, **53**:5377-84.
- Schofield P., Mbugua D.M. et Pell A.N. (2001). Analysis tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, **91**: 21- 40.
- Servais S. (2004). Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'Ozone: effet de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon I*.
- Tabassum I., Siddiqui Z. N. et Rizvi S. J. (2010). Protective effect of *Ocimum sanctum* and *Camellia sinensis* on stress-induced oxidative damage in the central nervous system of *Rattus norvegicus*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **1** (4): 120- 134.
- Tessier F., Marconnet P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercices. *Science & Sport*, **10**: 1- 13.
- Tsao R. et Deng Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, **812**: 85- 99.
- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**: 1–40.
- Vorbach C., Harrison R. et Capecchi M. R. (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology*, **24** (9): 512- 517.

- Wattel A., Kamel S., Mentaverri R., Lorget F., Prouillet C., Petit J. P., Fardelonne P. et Brazier M. (2002). Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kampferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology*, **65**: 35- 42.
- Wilkinson I. M. S. (2002). Neurologie. 3^{ème} édition de Boeck universite, chapitre 14 p: 240.
- Yap C. F., Ho C. W., Wan Aida W. M., Chan S. W., Lee C. Y. et Leong Y. S. (2009). Optimazation of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoa carambola* L.) residues. *Sains Malaysiana*, **38** (4): 511- 520.
- Young I. S. et Woodside J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, **54**: 176–186.
- Zazzo J. F. (2002). Stress oxydant au cours des états inflammatoires aigus et des états d'agression : implications pour la pratique clinique. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16** : 268- 274.
- (1): en.wikipedia.org/wiki/Camellia-sinensis.
- (2): www.sciencephoto.com/media/41023/enlarge.
- (3): www.google/image/Camellia sinensis.

Annexes

Annexe N° 01 : Courbes d'étalonnages utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et proanthocyanidines :

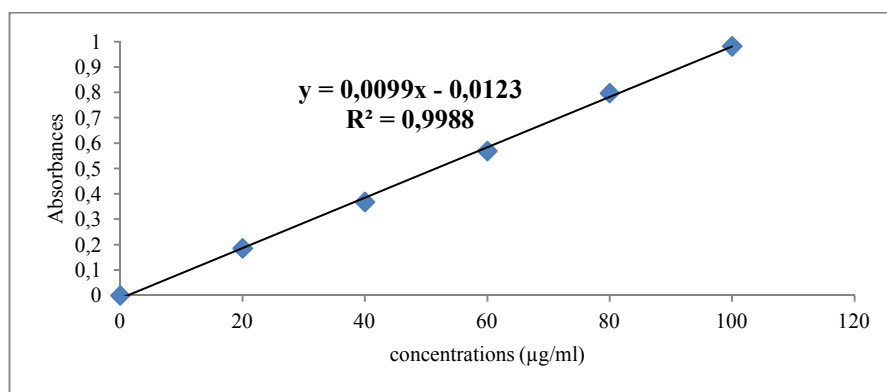


Figure 01 : Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ($\lambda = 765$ nm).

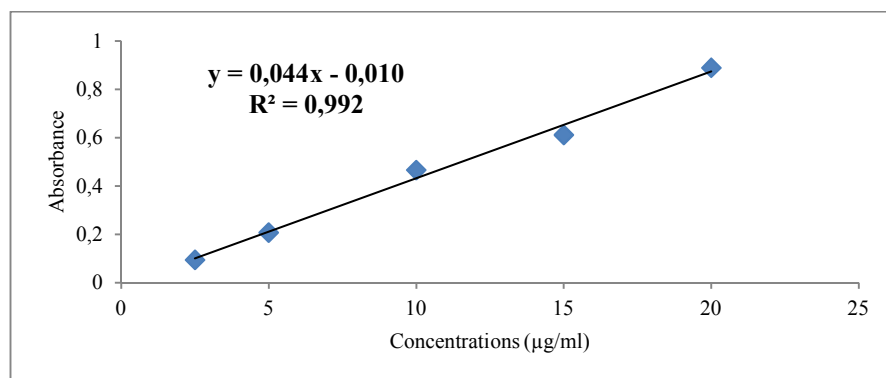


Figure 02 : Courbe d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes ($\lambda = 430$ nm).

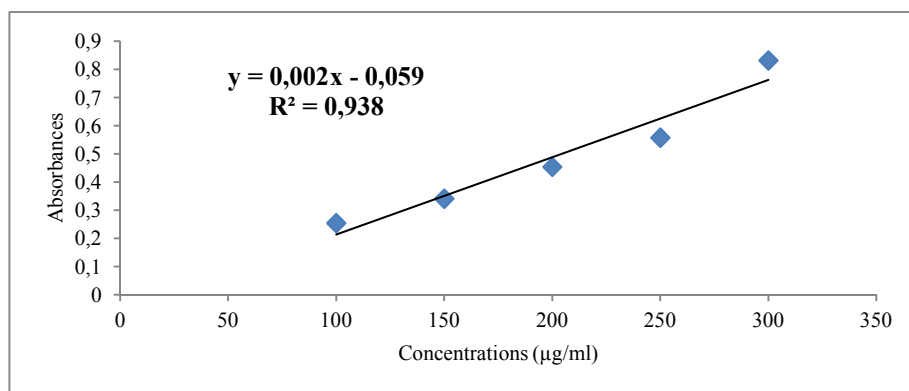


Figure 03 : Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des proanthocyanidines ($\lambda = 500$ nm).

Annexe N° 02 : Courbes de corrélation des différentes activités anti-oxydantes avec les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés :

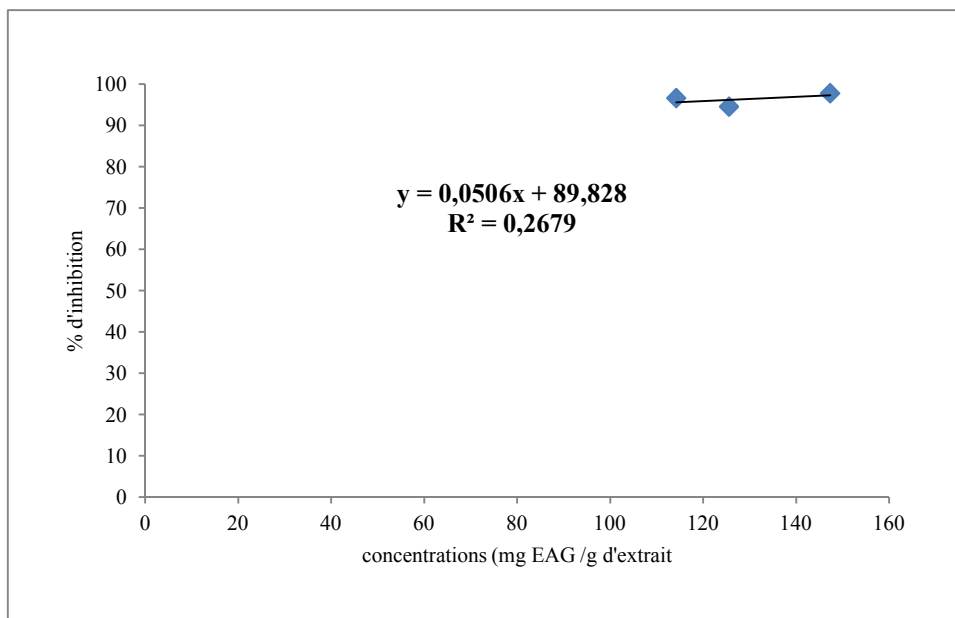


Figure 04 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH avec la teneur en phénols totaux de *Camellia sinensis*.

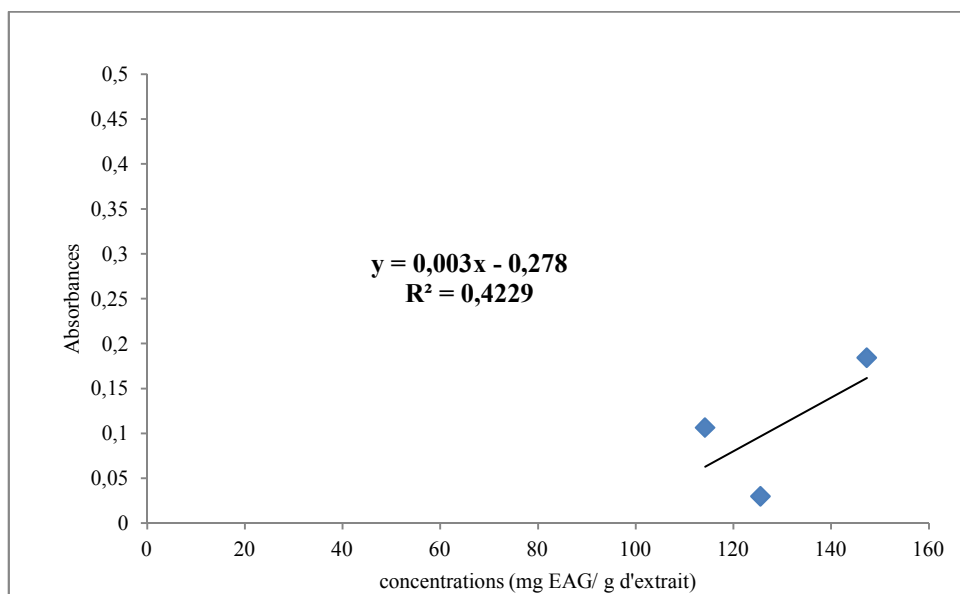


Figure 05 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur réducteur avec la teneur en phénols totaux de *Camellia sinensis*.

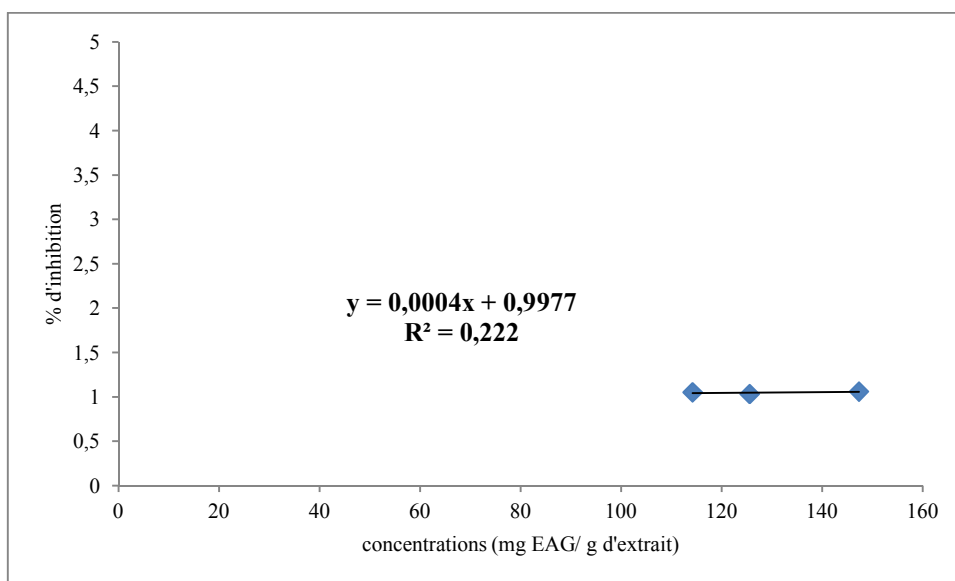


Figure 06 : Courbe de corrélation entre l'activité chélatrice du fer avec la teneur en phénols totaux de *Camellia sinensis*.

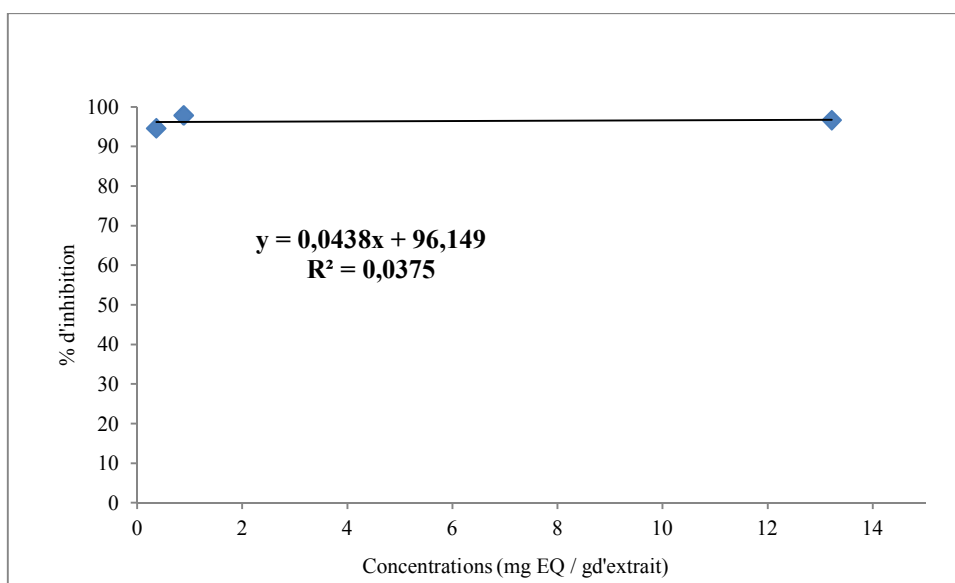


Figure 07 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH avec la teneur en flavonoïdes de *Camellia sinensis*.

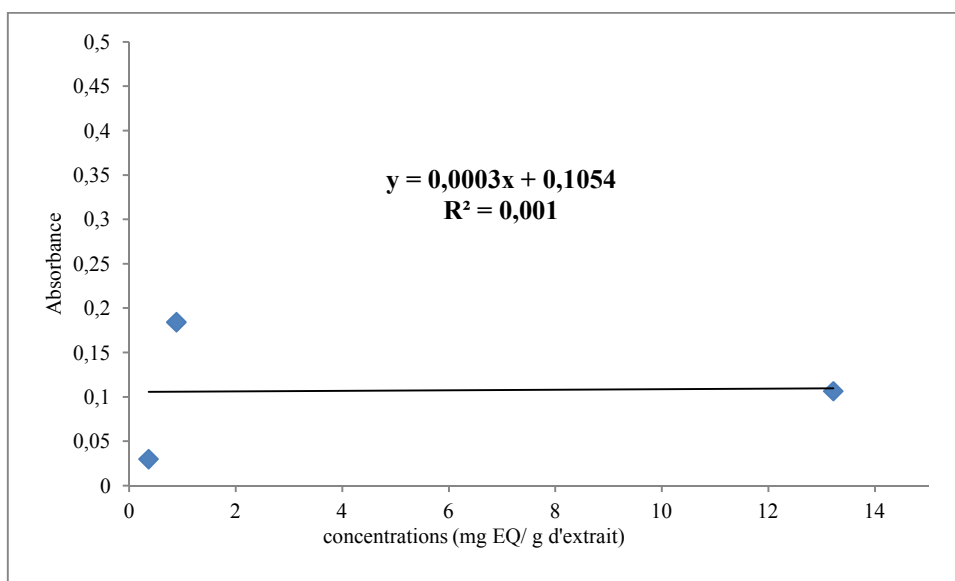


Figure 08 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur avec la teneur en flavonoïdes de *Camellia sinensis*.

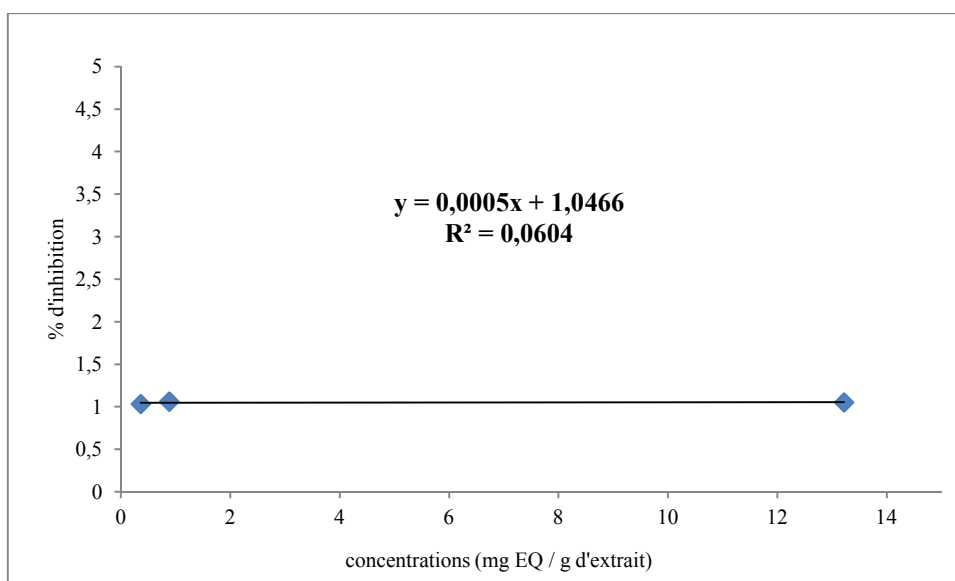


Figure 09 : Courbe de corrélation entre l'activité chélatrice du fer avec la teneur en flavonoïdes de *Camellia sinensis*.

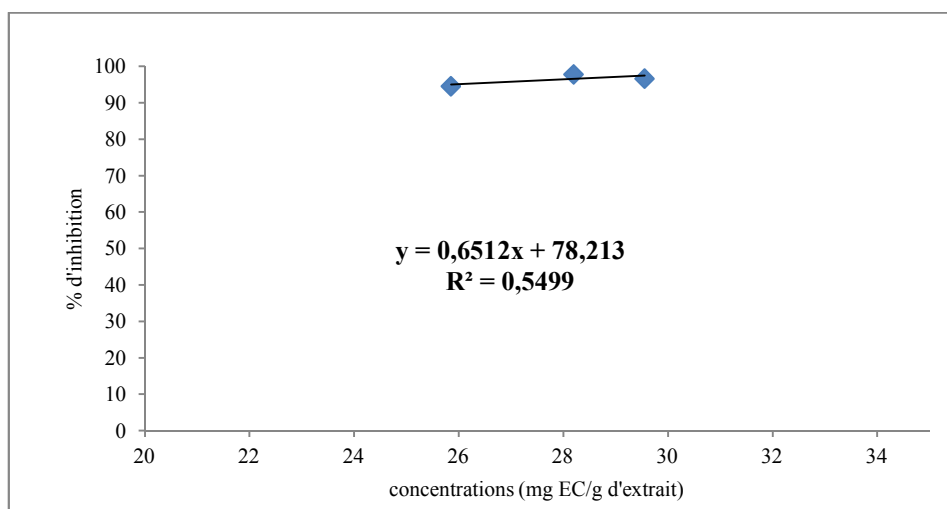


Figure 10 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en proanthocyanidines de *Camellia sinensis*.

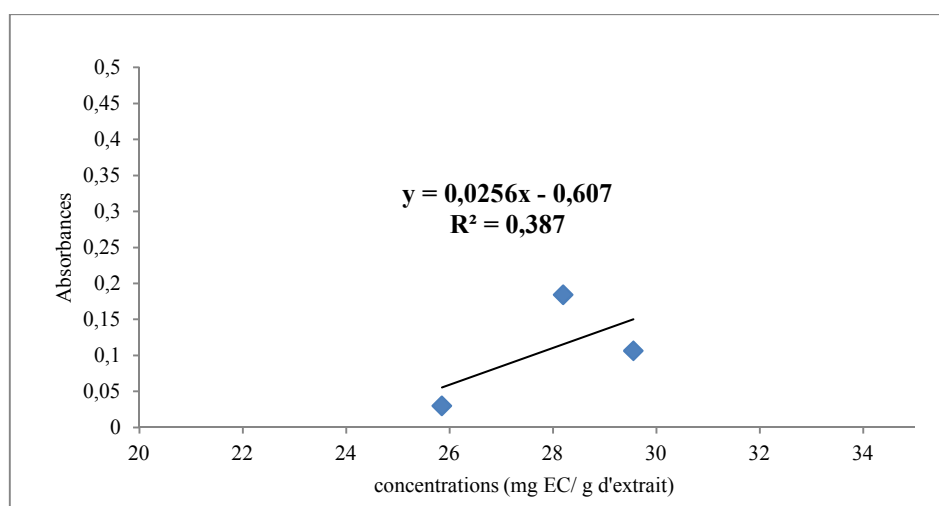


Figure 11 : Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur avec la teneur en proanthocyanidines de *Camellia sinensis*.

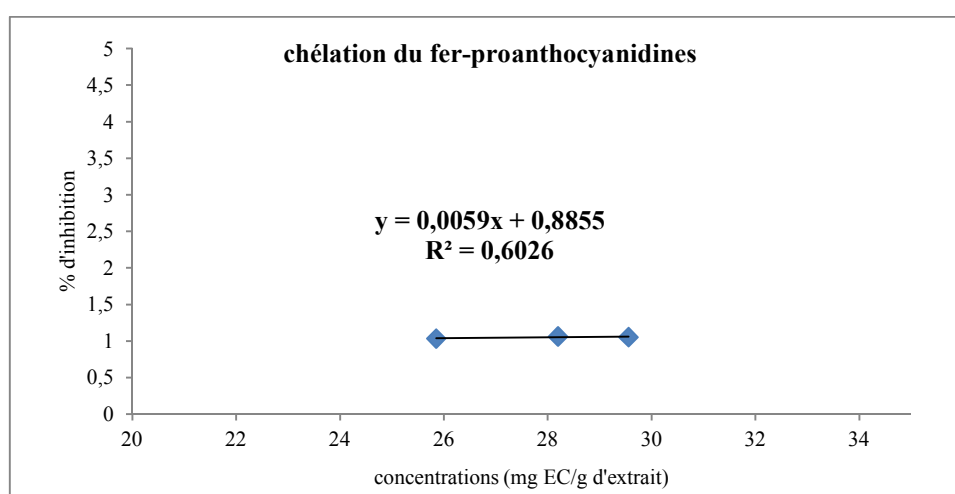


Figure 12 : Courbe de corrélation entre l'activité chélatrice du fer et la teneur en proanthocyanidines de *Camellia sinensis*.

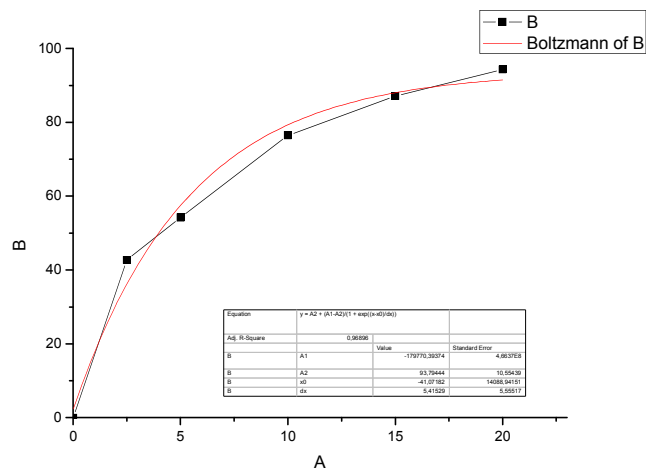
Annexe N° 03 : Courbes obtenue par origin 8 pour le calcul des IC₅₀

Figure 13 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique des feuilles de *Camellia sinensis* dans l'activité scavenging du DPPH.

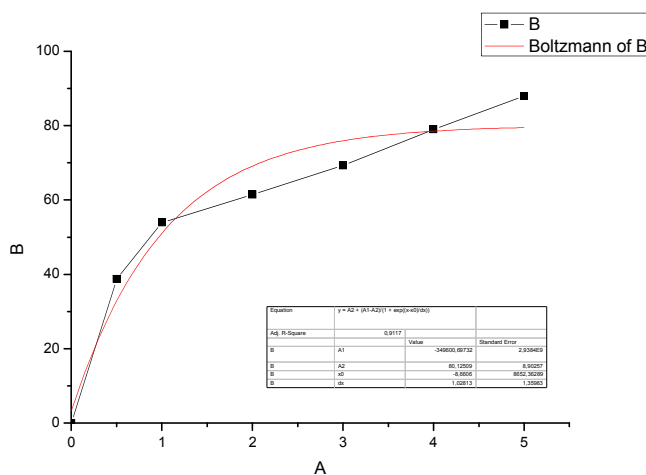


Figure 14 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de la BHA dans l'activité scavenging du DPPH.

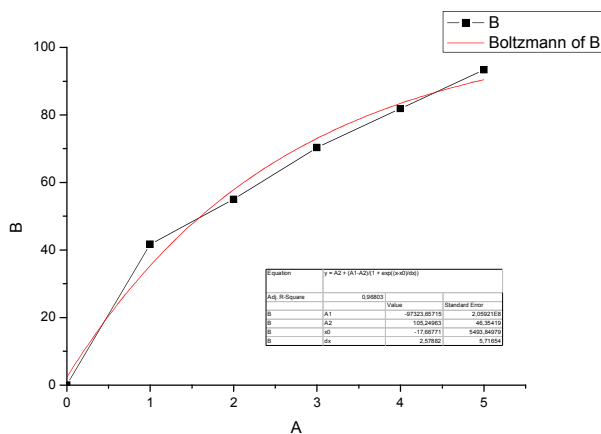


Figure 15 : courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'acide ascorbique dans l'activité scavenging du DPPH.