



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université ABOU BEKR BELKAID DE TLEMCCEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE- SCIENCES DE LA TERRE
ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire :

En vue l'obtention du diplôme de master en biologie

Option : infectiologie

Thème :

Evaluation de l'activité antioxydante des fruits de l'arbousier

Arbutus unedo L

Présentée par :

✚ M^{elle} BELKADI Soumia

Soutenues devant le Jury :

- ✓ **Président :** GHANEMI F.Z.
- ✓ **Examineur :** M^r AZZI R.
- ✓ **Encadreur :** M^{me} BELAID MEDJDOUB H.
- ✓ **Co-encadreur :** M^{me} LALLAM MEKAOUI S.

M.C.B. Tlemcen
M.C.A. Tlemcen
M.C.B Tlemcen
M.A.A Tlemcen

Année universitaire : 2017-2018

Dédicace

*A l'aide d'Allah, le tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,
j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma
vie, ma mère qui m'a apporté son appui durant toutes mes années
d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance,
courage et sécurité.*

*A mon cher père qui m'a appris le sens de la persévérance tout au
long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses
encouragements.*

A mes très chères sœurs : Souad, Zahira et Amina et leurs enfants

A mon frère : Mohammed

A mes amies et sœurs Faiza Bentrar et Fayza Djedoui

A toute la famille Belkadi et Zekri

A mes amis de l'université et d'ailleurs

Soumia

Remerciement

J'exprime d'abord mes profonds remerciements, ma vive reconnaissance et ma sincère gratitude à M^{me} MEDJDOUB H., maitre de conférences B, Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaid d'avoir accepté de m'encadrer et de diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique et pour ses conseils et ses précieuses orientations qu'elle n'a cessé de m'apporter tout au long de ce travail.

Mes remerciements vont également à M^{me} GHANEMI F.Z., maitre de conférences B, département d'agronomie, université de Tlemcen de m'avoir honoré en présidant le jury de ma soutenance.

Je tiens à remercier aussi M^r AZZI R., maitre de conférences A, université de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner ce travail

J'adresse mes remerciements aussi à M^{me} LALLAM MEKAOUI S., maitre-assistante A, département de Mathématiques, faculté des sciences, université de Tlemcen.

Mes sincères remerciements vont également à mes chères amies Amina et Touria pour leur encouragement tout au long de la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous les membres de laboratoire LASNABIO particulièrement M^{me} MEHYAOUI K., ingénieure de laboratoire, qui nous a offert des conditions de travail favorable.

Résumé :

L'arbousier est un arbuste de la famille des Ericacées qui se pousse dans les régions au climat doux. Il est cultivé au jardin pour ses qualités ornementales et pour ses fruits comestibles. Aussi il est utilisé dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies telles que les infections urinaires.

L'objectif de notre travail est porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante des fruits de l'arbousier par trois techniques (test de DPPH, réduction de fer FRAP et blanchissement de β -carotène). Les fruits ont été soumis à une extraction sous reflux dans eau- acétone (30/70) (V/ V) suivi d'un fractionnement liquide-liquide par l'acétate d'éthyle.

Les tests phytochimique ont montré que les fruits de notre plante sont très riches en sucres, polyphénols et flavonoïdes.

Parallèlement, l'évaluation de pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage de radical DPPH et la réduction de fer FRAP a révélé que la fraction organique présente une meilleure activité par rapport à l'extrait brut et à la fraction aqueuse.

Pour le test de blanchissement de β -carotène la fraction aqueuse a montré une activité très élevée suivi par l'extrait brut et la fraction organique avec des IC_{50} de 5,95 ; 6,94 et 9,84 mg/ml, respectivement.

A la lumière de ce modeste travail nous pouvons constater une richesse en composés phénoliques, polyphénols et flavonoïdes.

Le fruit de l'arbousier est doué d'une activité antioxydante très remarquable.

Mots clés : *Arbutus unedo* L, polyphénols, flavonoïdes, DPPH, FRAP, blanchissement de β -carotène.

الملخص:

شجرة القطلب هي شجيرة من عائلة Ericacées التي تحب العيش في المناطق ذات المناخ المعتدل. يزرع في الحديقة لخصائص التزيينية ولثماره الصالحة للأكل. بالإضافة الى انه يستخدم في الطب التقليدي لعلاج العديد من الأمراض مثل التهابات المسالك البولية.

الهدف من عملنا هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة لفاكهة القطلب من خلال ثلاث تقنيات (اختبار DPPH، وارجاع الحديد FRAP وتبييض β -carotène)، تم استخلاص الثمار بالحرارة في محلول الماء والأسيتون (70/30) (ح/ح) يليه تجزئة السائل مع أسيتات الإيثيل.

وقد كشفت الاختبارات الكيميائية أن ثمار نباتنا غنية جدا بالسكريات والبوليفينول والفلافونويد.

في الوقت نفسه، أظهر تقييم مضادات الأكسدة بواسطة طريقة DPPH و ارجاع الحديد FRAP أن الجزء العضوي له نشاط أفضل مقارنة بالمستخلص الخام والجزء المائي.

بالنسبة لاختبار التبييض β -carotène أظهر الجزء المائي أعلى نشاط يليه المستخلص الخام والجزء العضوي مع IC_{50} تساوي 5,95؛ 6,94 و 9,84 ملغم / مل على التوالي.

في ضوء هذا العمل المتواضع، يمكننا أن نرى ثروة من المركبات الفينولية، بوليفينول وفلافونويد.

فاكهة القطلب تز هو بنشاط مضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: القطلب، بوليفينول ، فلافونويد ، DPPH ، FRAP ، تبييض β -carotène.

Abstract :

The arbutus unedo is a shrub of the Ericaceae family which grows in region with a mild climate. It is grown in the garden for its ornamental qualities. In addition it is used in traditional medicine to treat many diseases such as urinary infections.

The objective of our work is to evaluate the antioxidant activity of strawberry fruit by three techniques (DPPH test, FRAP iron reduction and β -carotene bleaching). The fruits were extracted under reflux in water-acetone (30/70) (V / V) followed by liquid-liquid fractionation with ethyl acetate.

Phytochemical tests have shown that the fruits of our plant are very rich in sugars, polyphenols and flavonoids.

In parallel, the evaluation of antioxidant power by the DPPH radical scavenging method and the FRAP iron reduction revealed that the organic fraction has a better activity compared to the water-acetone extract and the aqueous fraction.

For the β -carotene bleaching test the aqueous fraction showed a very high activity followed by the water-acetone extract and the organic fraction with IC₅₀ of 5.95; 6.94 and 9.84 mg/ml, respectively.

In the light of this modest work we can see a wealth of phenolic compounds, polyphenols and flavonoids.

The arbutus fruit is endowed with a very remarkable antioxidant activity.

Key words: *Arbutus unedo* L, polyphenols, flavonoids, DPPH, FRAP, β -carotene bleaching.

Liste des abréviations

ABTS* : Sel d'ammonium de l'acide 2, 2'-azinobis-3-ethylbenzothiozoline-6-sulfonique.

ADN : L'acide désoxyribonucléique.

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium.

BHA : Butylhydroxyanisole.

BHT : Butylhydroxytoluène.

CoQ10 : Ubiquinone.

Cu²⁺ : Ion cuivre.

DPPH : Radical 2.2 diphényle-1-picrylhydrazyl.

EBV : mononucléose virale.

EC : Equivalent de Catéchine.

ERO : Espèce réactif de l'oxygène.

Fe²⁺ : Fer ferreuse.

Fe³⁺ : Fer ferrique.

FeCl₃ : Chlorure ferrique.

FRAP : Ferric reducing antioxidant power.

GP_x : Glutathion peroxydase.

GSSG : Glutathion disulfide.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H₃POM₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdène.

$H_3PWOM_{12}O_{40}$: Acide phosphotungstique.

HCl : L'acide chlorhydrique.

HVB : Hépatite B virale.

IC₅₀ : Concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH.

$K_3Fe(CN)_6$: Ferricyanure de potassium.

LDL : Lipoprotéine de basse densité.

MO_8O_{13} : Molybdène.

Na_2HPO_4 : Phosphate de Sodium dibasique.

$NaCO_3$: Carbonate de sodium.

NaH_2PO_4 : Phosphate de Sodium monobasique.

$NaNO_2$: Nitrate de sodium.

NK : Natural killer.

$O_2^{\cdot-}$: Le radical superoxyde.

O_2^1 : Oxygène singulier.

OH^{\cdot} : Le radical hydroxyle.

$ONOO^{\cdot}$: peroxydinitrite.

ORAC : Oxygen radical absorbance Capacity.

ROO^{\cdot} : Radical peroxyde.

SOD : Super oxyde dismutase.

UV : Ultra-violet.

Liste des figures

Figure 01 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatique antioxydants et leur facteurs métalliques.....	05
Figure 02 : Structure chimique de l'acide ascorbique.....	10
Figure 03 : Structure chimique de la vitamine E.....	10
Figure 04 : Structure chimique de la quinine.....	13
Figure 05 : Squelette de base des flavonoïdes.....	14
Figure 06 : Structure chimique de l'acide gallique.....	15
Figure 07 : Structure chimique de la coumarine.....	15
Figure 08 : <i>Rumus vesicarius</i>	16
Figure 09 : Le chardon marie.....	16
Figure 10 : Le cumin.....	17
Figure 11 : <i>Cerduus atlantica</i>	18
Figure 12 : Fruit de l'arbousier.....	19
Figure 13 : Tronc de l'arbousier.....	19
Figure 14 : Feuille d' <i>Arbutus unedo</i>	20
Figure 15 : Inflorescence de l'arbousier.....	20
Figure 16 : Fruit de l'arbousier.....	21
Figure 17 : Matériel végétal séché.....	24
Figure 18 : Montage d'extraction sous-reflux.....	25
Figure 19 : Filtration.....	25

Figure 20 : Fraction organique.....	25
Figure 21 : Fraction aqueuse.....	25
Figure 22 : Protocol expérimentale.....	26
Figure 23 : Courbe d'étalonnage de glucose pour le dosage des sucres.....	35
Figure 24 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoides.....	36
Figure 25 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.....	37
Figure 26 : Pourcentage de réduction du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique	38
Figure 27 : Pourcentage de réduction du radical DPPH en fonction des concentrations de l'extrait brut.....	39
Figure 28 : Pourcentage de réduction du radical DPPH en fonction des concentrations de la fraction aqueuse	40
Figure 29 : Pourcentage de réduction du radical DPPH en fonction des concentrations de la fraction organique.....	40
Figure 30 : Réduction de fer par les extraits de l'arbousier et l'acide gallique.....	41
Figure 31 : Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène en fonction des concentration de BHT	42
Figure 32 : Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène en fonction des concentration de l'extrait brut	43
Figure 32 : Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène en fonction des concentration de la fraction organique	43
Figure 33 : Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène en fonction des concentration de la fraction aqueuse.....	44

Liste des tableaux

Tableau 01 : Relation entre les maladies et le stress oxydant.....	07
Tableau 02 : Résultat des reactions de caractérisation des différentes groupes chimique recherchés dans les fruits de l'arbousier.....	34
Tableau 03 : Pourcentage des sucres des extraits des fruits de l'arbousier.....	35
Tableau 04 : Pourcentage des flavonoïdes des extraits des fruits de l'arbousier.....	36
Tableau 05 : Pourcentage des polyphénols des extraits des fruits de l'arbousier.....	37
Tableau 06 : Valeur d'IC ₅₀ des extraits des fruits de l'arbousier et de l'acide ascorbique	41
Tableau 07 : Valeur d'IC ₅₀ des extraits des fruits de l'arbousier et de BHT.....	44

Table de matière

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

1^{er} partie : la synthèse bibliographique

Chapitre I

Le stress oxydant

1. Le stress oxydant.....	03
2. Les radicaux libres.....	03
2.1. Radical superoxyde.....	03
2.2. H ₂ O ₂ : peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée.....	04
2.3. L'oxygène singulier.....	04
2.4. Radical hydroxyle.....	04
3. Conséquences de stress oxydant.....	05
4. Les cibles biologiques des ERO.....	05
4.1. Les lipides.....	05
4.2. Les protéine.....	06
4.3. L'ADN.....	06
5. Les maladies liées au stress oxydant.....	06
6. Les antioxydants.....	08
6.1. Les antioxydants enzymatiques.....	08
6.1.1. Les glutathions peroxydases.....	08

6.1.2. La catalase.....	08
6.1.3. Les superoxydes dismutases.....	09
6.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	09
6.2.1. La vitamine C.....	09
6.2.2. La vitamine E.....	10
6.2.3. Les polyphénols.....	10
6.2.4. Les caroténoïdes.....	11
6.3. Les oligo-éléments.....	11
6.3.1. Le zinc.....	11
6.3.2. Le cuivre.....	12
6.3.3. Le sélénium.....	12
6.4. Les antioxydants synthétiques.....	12

Chapitre II

Plante et métabolites secondaires

1. Métabolites secondaires.....	13
1.2. Les alcaloïdes.....	13
1.3. Les composés phénoliques.....	14
1.3.1. Les flavonoïdes.....	14
1.3.2. Les tanins.....	15
1.3.3. Les coumarines.....	15

2. Quelques plantes à activité antioxydants.....	16
2.1. <i>Rumex vesicarius</i>	16
2.2. Le chardon marie.....	16
2.3. Le cumin.....	17
2.4. Arz El Atlas.....	18
3. L'arbousier.....	19
3.1. Morphologie de l'arbousier.....	19
a. Racine.....	19
b. Tronc.....	19
c. Feuilles.....	20
d. Fleurs.....	20
e. Fruits.....	21
3.2. Les principaux constituants de l'arbousier.....	21
a. Les feuilles.....	21
b. Les fruits.....	21
3.3. Usage et tradition.....	21
3.4. Propriétés médicinales de l'arbousier.....	22
a. Utilisation externe.....	22
b. Utilisation interne.....	22
3.5. Répartition géographique.....	22

3.6. Valeurs nutritives des fruits de l'arbousier.....	23
3.7. Toxicité.....	23

2^{ème} partie : Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Le matériel végétal.....	24
2. Objectif.....	24
3. L'extraction.....	24
3.1. Préparation de l'extrait eau-acétone.....	24
4. Tests phytochimiques.....	27
a. Flavonoïdes.....	27
b. Tanins.....	27
c. Acides aminés.....	27
5. Tests de caractérisation.....	27
5.1. Dosage des sucres.....	27
a. Principe.....	27
b. Dosage.....	27
5.2. Dosage des flavonoïdes.....	28
a. Principe.....	28
b. Dosage.....	28
5.3. Dosages des polyphénols.....	28

a. Principe.....	28
b. Dosage.....	29
6. Le pouvoir antioxydant des extraits des fruits de l'arbousier.....	29
6.1. Test du radical libre DPPH.....	29
a. Principe.....	29
b. Mode opératoire.....	30
c. Calcule de pourcentage d'inhibition.....	31
d. Calcule des IC ₅₀	31
6.2. Réduction de fer FRAP.....	31
a. Principe.....	31
b. Solution à préparer.....	31
c. Préparation de solution tampon.....	31
d. Mode opératoire.....	32
6.3. Test de blanchissement de β –carotène.....	32
a. Principe.....	32
b. Mode opératoire.....	32
c. Expression des résultats.....	33

Résultats et interprétation

1. Extraction.....	34
2. Les tests phytochimiques.....	34

3. Dosage des sucres.....	35
4. dosage des flavonoïdes.....	36
5. Dosage des polyphénols.....	37
6. Evaluation de l'activité antioxydants.....	38
6.1. Piégeage de radical libre DPPH.....	38
6.2. Reduction de fer (FRAP).....	41
6.3. Blanchissement de β -carotène.....	42
Discussion.....	45
Conclusion.....	49
Références bibliographiques.....	51

Introduction générale

Les plantes médicinales ont été utilisées comme une source de composés naturels qui présentent une grande diversité structurale et peuvent ainsi constituer un réservoir de molécules de vertus thérapeutiques (Oubre *et al.*, 1997). Ces plantes représentent une origine importante de médicaments pour des milliers d'années de l'histoire humaine et même aujourd'hui, elles constituent la base de pratique systématique de médecine traditionnelle pendant plusieurs siècles dans le monde entier (Pan *et al.*, 2009).

La formation de radicaux libres (superoxyde et hydroxyle par exemple) est une conséquence normale du métabolisme aérobie chez l'homme. Toutefois, un déséquilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes de défense antioxydante conduit à un stress oxydatif pouvant entraîner des altérations moléculaires et cellulaires. Les lipides et l'ADN sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux libres (Goudable et Favier, 1997).

Le stress oxydant est la cause initiale essentielle de plusieurs maladies telle que le cancer et la cataracte (Pryor, 1987). Le stress oxydant sera aussi un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Montagnier *et al.*, 1998).

Pour se protéger des effets nuisibles des espèces réactifs de l'oxygène notre corps a besoin de sources d'antioxydants qui sont trouvés dans l'alimentation (Iserin *et al.*, 2001). Ces derniers renferment des métabolites secondaires d'intérêt thérapeutique et aux propriétés antioxydantes telle que : les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes et les coumarines (Chouikhi, 2013).

Arbutus unedo L est un arbuste indigène méditerranéen, utilisé depuis longtemps en médecine populaire et qui se développe surtout sur le pourtour du bassin méditerranéen (Torres *et al.*, 2002). Cette plante joue aussi un rôle essentiel dans la médecine traditionnelle grâce à son emploi thérapeutique et sa commercialisation (Bouزيد *et al.*, 2017).

Les feuilles de cet arbuste sont antiseptiques, astringentes et diurétiques (Couplan et Styner, 1994). L'arbousier est un antiseptique naturel pour lutter contre les infections urinaires comme l'urétrite (Iserin *et al.*, 2001). Il présente des propriétés diurétiques, purgatives, astringentes et anti-inflammatoires. Les racines de l'arbousier sont hypotensives conseillés pour diminuer l'hypertension artérielle (Debuigne et Couplan, 2009).

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'effet antioxydant de l'extrait brut hydroacétonique et ses fractions, aqueuse et organique, des fruits d'*Arbutus unedo* L ; à savoir la réduction du DPPH, le pouvoir réducteur du fer (FRAP), et le test de blanchissement du β -carotène. De plus les taux de polyphénols et flavonoïdes sont estimés.

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de recherche sur les substances naturelles et bioactives LASNABIO.

Première partie :
Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Stress oxydant

1. Le stress oxydant :

Le stress oxydatif encore appelé stress oxydant est un déséquilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant en faveur des pro-oxydants qui entraîne les dommages oxydatifs des biomolécules (Cillard, 2011) et implique la production d'espèces réactives de l'oxygène(ERO) (Pelletier *et al.*, 2004). Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des ERO dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardiovasculaires (Haleng *et al.*, 2007)

2. Les radicaux libres :

Un radical libre est une espèce chimique, molécule morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataire (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Halliwell, 1996).

La réactivité chimique des radicaux libres de l'oxygène est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres entrant dans les processus physiopathologiques humains sont les radicaux superoxydes et hydroxyles, mais d'autres dérivés de l'oxygène jouent également un rôle important dans le stress oxydant, en particulier le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote. C'est pourquoi le terme d'espèces réactives de l'oxygène est préféré à celui de radicaux libres puisque le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre (Puppo *et Halliwell.*, 1988).

Parmi les EROs, on peut distinguer quatre espèces principales : radical superoxyde, peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulier et le radical hydroxyle.

2.1. Radical superoxyde : $O_2^{\cdot -}$:

Le radical superoxyde est produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes, macrophages), et il participe à l'inactivation des virus et bactéries (Nohl, 1994). Cependant, stimulées de façon excessive ou

inappropriée, ces cellules sont sources d'une importante quantité de radicaux libres et susceptibles d'entraîner des lésions tissulaires sévères

2.2. H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée :

Il est produit en grande partie à partir du radical superoxyde en présence de superoxyde dismutase qui catalyse la réaction. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires. Il est potentiellement toxique pour la cellule (Barouki, 2006).

2.3. L'oxygène singulier (O₂[·]) :

Est la forme diamagnétique de l'oxygène est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (Choe *et* Min, 2005 ; Hennebelle, 2006). L'O₂¹ est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène (Rezaire, 2012). De plus, il peut être produit dans la membrane plasmique de cellules immunitaires comme les globules blancs et participer ainsi à la phagocytose (lors des réactions inflammatoires) (Badouard, 2006).

2.4. Radical hydroxyle OH[·] :

La réduction monoélectronique du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ donne naissance au radical hydroxyle OH[·] (Rezaire, 2012), qui est l'oxydant le plus puissant de l'organisme (Badouard, 2006), et joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique. La durée de vie d'OH[·] est très courte (moins de 1nanoseconde) ce qui fait qu'il réagira avec les molécules environnantes et non pas à distance. L'OH[·] peut-être généré de plusieurs manières différentes : coupure homolytique de H₂O₂ sous l'influence de rayonnements UV, réactions de l'acide hypochloreux avec O₂^{·-}, décomposition des ions peroxydites (ONOO⁻) (Hennebelle, 2006).

3. Conséquence de stress oxydant :

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (Favier, 2003).

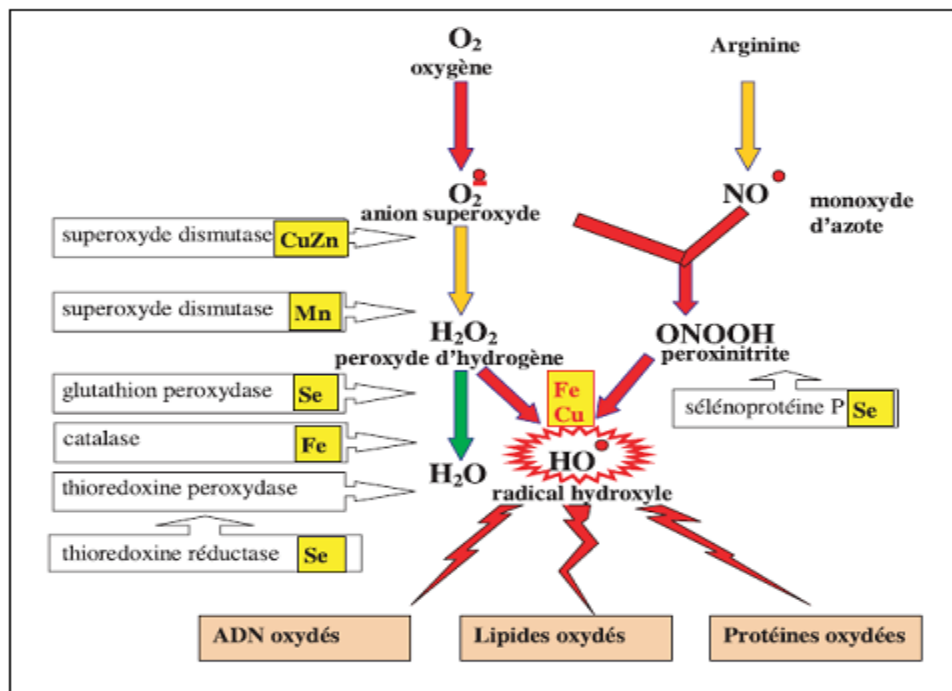


Figure 01 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.

4. Les cibles biologiques des EOR :

Lors d'un stress oxydant, les EOR non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules directement à leur contact, contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (Christelle, 2006).

4.1. Les lipides :

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires induit des processus de peroxydations en cascade aboutissant à la désorganisation complète de

la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (Davies, 2000).

4.2. Les protéines :

Les ERO sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également 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^{\bullet} s'additionne, modifiant la conformation de la protéine (Dean, 1997). Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les ERO sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques. Par ailleurs, le radical OH^{\bullet} , mais aussi l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, s'attaquent également aux protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif. L'oxydation de ces acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique (Shanlin *et al.*, 1997)

4.3. L'ADN :

L'ADN (ADN), qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des ERO. Les radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ et OH^{\bullet} provoquent des lésions de l'ADN. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Hartmann, 2000).

5. Les maladies liées au stress antioxydant :

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Sohal *et al.*, 2002).

Par la création de molécules biologiques chimiquement et irréversiblement anormales et la surexpression de certains gènes, le stress oxydant sera la cause initiale essentielle de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse pulmonaire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré et autres (tableau 01). Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites ; les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant les antioncogènes comme la protéine p53 (Pryor, 1987). Par contre, à un stade plus avancé d'évolution de la carcinogenèse, les radicaux libres serviront inversement pour les NK (Natural Killer) lymphocytes à tuer les cellules tumorales.

Le stress oxydant sera aussi un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. Par exemple, dans la genèse de la plaque d'athérome, l'oxydation des LDL est un des phénomènes clefs transformant les monocytes en cellules spumeuses. Le rôle du stress oxydant dans la mise en route d'autres facteurs de risque est loin d'être négligeable où on peut citer l'augmentation de la résistance à l'insuline, l'activation des cellules endothéliales libérant des médiateurs pro-oxydants (prostacycline, cytokines, facteurs de fibrinolyse, superoxydes, NO), l'augmentation de la prolifération des fibres lisses (Montagnier *et al.*, 1998).

L'augmentation de l'apport nutritionnel en antioxydants est donc essentielle pour prévenir ces maladies (Favier, 2003).

Tableau 01 : Relations entre les maladies et le stress oxydant (Pryor, 1987).

<i>Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale</i>	<i>Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs</i>	<i>Maladies entraînant un stress oxydant secondaire</i>
<ul style="list-style-type: none"> •Cancers • Auto-immunité • Cataracte • Dégénérescence maculaire • Photo-veillissement cutané • Photosensibilisation • Irradiation • • Hémochromatose 	<ul style="list-style-type: none"> •Maladie d'Alzheimer • Stérilités masculines • Maladies virales : EBV, HVB • Rhumatismes • Athérome • Asthme • Insuffisance respiratoire 	<ul style="list-style-type: none"> •Diabète • Insuffisance rénale • Mucoviscidose • Sida • Choc septique • Infarctus du myocarde • Ischémies • Parkinson

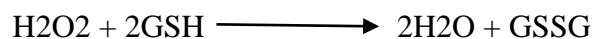
6. Les antioxydants :

6.1. Les antioxydants enzymatiques :

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO principalement superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (Garait, 2006).

6.1.1. Les glutathions peroxydases :

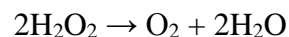
Les glutathions peroxydases sont présentes dans le cytoplasme où elles jouent un rôle majeur dans la régulation de l'état d'oxydoréduction intracellulaire dans les cellules vasculaires (Wassmann *et al.*, 2000). Ce sont des enzymes à sélénium de structure très proche, ayant la propriété de catalyser la réduction des hydroperoxydes (H₂O₂).



Les différentes isoformes de la glutathion peroxydase varient selon leur localisation dans l'organisme (Richard, 1997). Ces enzymes sont impliquées dans la défense de l'organisme contre les ERO et elles constituent la majeure voie de dégradation du H₂O₂ dans la plupart des cellules et des compartiments subcellulaires (Wassmann *et al.*, 2000 et Richard, 1997).

6.1.2. La catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire de l'hème qui catalyse la réaction de détoxification du H₂O₂ (généralement produit par les SOD) selon la réaction suivante :



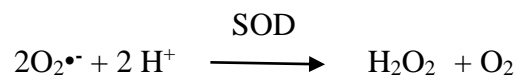
La catalase se retrouve normalement dans les peroxysomes, mais pour les cellules ne possédant pas cette organelle (ex : les érythrocytes) l'enzyme se situe dans le cytoplasme (Wassmann *et al.*, 2000). La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable.

La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif dans le

développement d'une tolérance au stress oxydatif dans la réponse adaptative des cellules (Reynaert *et al.*, 2007).

6.1.3. Les superoxydes dismutases (SOD) :

Les SOD éliminent les radicaux superoxydes par dismutation du radical en H₂O₂ et en OH⁺ et OH⁻ (Mn SOD dans la mitochondrie, CuZn SOD dans le cytosol et les érythrocytes) (Mc Cord et Fridovich, 1988). Elles permettent d'éliminer les radicaux superoxydes mais provoquent l'apparition de peroxyde d'hydrogène diffusible et dangereux à distance (Nelson *et al.*, 1994). La synthèse des SOD subit un rétrocontrôle négatif par les fortes concentrations de peroxyde d'hydrogène. L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc.



6.2. Les antioxydants non enzymatiques :

Contrairement aux antioxydants enzymatiques, la plupart des antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie, nous retrouvons les oligoéléments (le cuivre, le fer, le manganèse, le sélénium et le zinc), l'ubiquinone (CoQ10), l'acide ascorbique (vitamine C), α tocophérol (vitamine E) et les caroténoïdes et les polyphénols (Vertuani *et al.*, 2004).

6.2.1. Vitamine C :

La vitamine C est, avant tout, un excellent piègeur des ERO (HO[•] ou O₂^{•-}). Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques. Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (Haleng *et al.*, 2007).

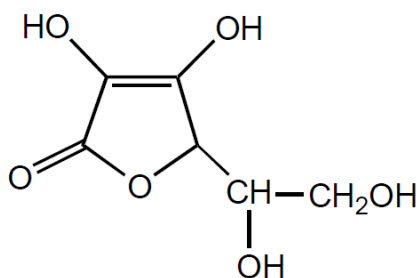


Figure 02 : structure chimique de l'acide ascorbique (Diallo, 2005)

6.2.2. Vitamine E :

Ce terme désigne un ensemble d'isomères, les tocophérols (constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone) et les tocotriénols (qui diffèrent des tocols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne latérale). D'un point de vue biologique, deux isomères sont particulièrement intéressants, l' α - et le γ -tocophérol. Leur caractère hydrophobe leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxydes ($\text{ROO}\cdot$) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique. Si l' α -tocophérol est le plus abondant, il semble que le γ -tocophérol soit le plus efficace à ce niveau. Les apports journaliers d' α -tocophérol sont de l'ordre de 10 mg (Haleng *et al.*, 2007).

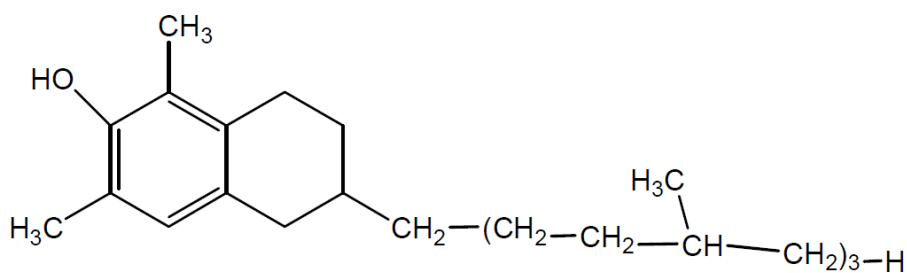
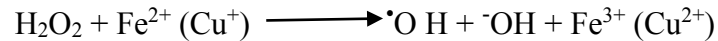


Figure 03 : structure chimique de la vitamine E (Diallo, 2005)

6.2.3. Les polyphénols :

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme

d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes (Achat, 2013). Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des ERO et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Pietta, 2000)



6.2.4. Les caroténoïdes :

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, les caroténoïdes dérivent d'une structure linéaire ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) avec de nombreuses doubles liaisons (Haleng *et al* 2007). Ce sont des piègeurs de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), et peuvent également neutraliser les radicaux libres. Le lycopène piège les radicaux libres avec de ($^1\text{O}_2$) dans les tissus rétiniens, prévenant la dégénérescence, qui est la première cause de cécité chez la personne âgée (Landrum *et al.*, 1997 et Blumberg, 2007).

6.3. Les oligo-éléments :

6.3.1. Le zinc :

Le zinc joue un rôle de cofacteur pour de nombreux enzymes et intervient ainsi dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des nucléotides, la synthèse des prostaglandines, le fonctionnement de l'anhydrase carbonique. Comme le cuivre, le zinc est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège également les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation d'ERO induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre. Le rapport Cu / Zn, (normalement inférieur à 1,5) sera un excellent indicateur de l'état de stress oxydant d'un individu. Les aliments les plus riches en zinc sont les viandes et les poissons, les céréales complètes et les légumes secs ; les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 20 mg (Haleng *et al.*, 2007).

5.3.2. Le cuivre :

Le cuivre est largement distribué dans la nature et c'est un élément essentiel à la vie. Le corps humain adulte en contient 80 mg. Il intervient, à l'état physiologique, dans les défenses antioxydantes par l'intermédiaire des enzymes telles : la superoxyde dismutase à cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD) cytoplasmique (Bielski 1995 et Halliwell et Gutteridge 1984), Il possède deux

degrés d'oxydation +I et +II. La forme Cu^{2+} , est la plus stable et le pouvoir prooxydant du couple $\text{Cu}^+ / \text{Cu}^{2+}$ est utilisé dans divers réactions d'oxydo-réduction (Nzengue, 2008).

6.3.3. Le sélénium :

Le sélénium n'est pas un anti-oxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la glutathion peroxydase GPx. Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique, lié à un acide aminé, la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé. La dose journalière recommandée est de 50-70 $\mu\text{g}/\text{jour}$. Les aliments riches en sélénium sont, notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail... (Arteel et Sies, 2001).

6.4. Les antioxydants synthétiques :

Les antioxydants synthétiques sont généralement préparés en laboratoire, et principalement à partir de composants chimiques. Dans l'industrie alimentaire, l'ajout d'antioxydants naturels dans les aliments est une technique complètement nouvelle. Depuis à peu près 1980, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants, ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs. Toutefois, le fait de trouver communément une substance dans un aliment ne constitue pas une garantie de son absence totale de toxicité (Pelli et Lyly, 2003).

Chapitre II :
Plante et métabolites
secondaire

1. Métabolites secondaires :

Métabolites secondaires des plantes sont un groupe diversifié des produits naturels qui ne possèdent pas généralement une fonction principale dans la croissance des cellules végétales.

Ils sont synthétisés par les plantes en réponse à des stimuli externes et souvent jouer une fonction régulatrice dans une cascade de réactions métaboliques et physiologiques du stress ou d'attaques de ravageurs (Benbrook, 2005).

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques variés (alcaloïdes et composés azotés, terpènes, composés phénoliques...) (Macheix *et al.*, 2005)

1.1. Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées basiques pouvant avoir une activité pharmacologique. Ce sont des dérivés des acides aminés. Les alcaloïdes sont employés en médecine pour leur propriétés analgésiques comme (la morphine, la codéine) dans des cadres de protocoles de sédation (anesthésie souvent accompagnés d'hypnotiques ou comme agent antipaludéen (quinine, chloroquine) ou agent anticancéreux (Lomani, 2005).

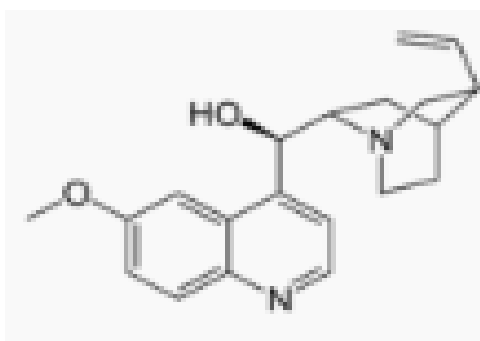


Figure 04 : Structure chimique de la quinine (Manasse, 2015)

1.2. Terpène et stérols :

Les terpènes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux, notamment les plantes supérieures. Ils sont également rencontrés dans les autres types d'organismes vivants (algues, mousses, champignons,...).

Tout terpène est construit par un assemblage d'un nombre variable d'unités isopréniques C_5H_8 (2-méthylbuta-1,3-diène). Les différentes classes de molécules terpéniques sont nommées selon le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette :

- Les monoterpènes qui comptent deux unités isoprènes (10 atomes de C).
- Les sesquiterpènes avec 3 unités isoprènes (15 atomes de C).
- Les diterpènes : 4 C_5 (20 atomes de C).
- Les sesterpènes : 5 C_5 (25 atomes de C).
- Les triterpènes : 30 atomes de C.
- Les tétraterpènes : 40 atomes de C (Dehak, 2013)

1.3. Les composées phénoliques :

Les polyphénols sont des groupes de molécules de structures variées (Richter, 1993). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Bruneton, 1999).

1.3.1. Les flavonoïdes :

Sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils peuvent agir comme chélateurs de métaux (quercétine, catéchine) ou comme capteurs de radicaux libres (quercétine, rutine, kaempférol). Les flavonoïdes peuvent être pro oxydants sur les protéines, sur la peroxydation des lipides et sur l'ADN. Les flavonoïdes présentent de nombreuses activités telles que les activités anti-inflammatoires, antihépatotoxiques, antibactériennes et antivirales (Diallo, 2005)

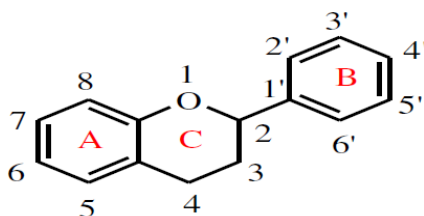


Figure 05 : Squelette de base des flavonoïdes (Crozier, 2003)

1.3.2. Les tanins :

Sont des substances polyphénoliques possédant surtout des propriétés antimicrobiennes, antivirales et hypoglycémiantes (Paris, 1981).

Ils agissent comme des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques lors de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation (Cavin, 2000).

Ils sont classiquement répartis en deux groupes :

- Les tanins condensés au catéchiqiques. Ils sont très résistants à l'hydrolyse.
- Les tanins hydrolysables qui sont des esters du glucose (ou des composés apparentés) et d'acides phénoliques qui peuvent être : l'acide gallique. On parle ainsi des tanins galliques. (Makambo, 2007).

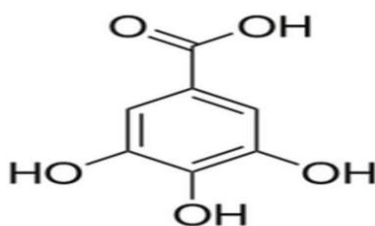


Figure 06 : structure chimique de l'acide gallique (Diallo, 2005)

1.3.3. Les coumarines :

Les coumarines eux même sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, peroxydes. Cela est dû à leurs propriétés structurales qui sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Diallo, 2005).

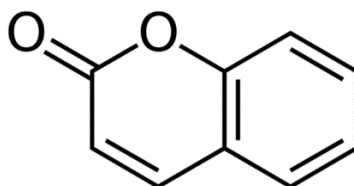


Figure 07 : structure chimique des coumarines (Diallo, 2005)

2. Quelques plantes à activité antioxydante :

2.1. *Rumex vesicarius* :

C'est une plante herbacée annuelle ou vivace, buissonnante, rhizomateuse, atteignant 50 cm de haut fortement ramifiée à partir de la base.

En Afrique, on trouve *Rumex vesicarius* dans les régions sèches de la Mauritanie et du Mali jusqu'au Soudan, l'Ethiopie et la Somalie. En dehors de l'Afrique il est présent de la méditerranée jusqu'en Inde. (Chauvet et Siemonsma, 2004).



Figure 08 : *Rumex vesicarius* (anonyme1)

Selon les résultats obtenus par une étude de l'université Kasdi Marbah Ouargla, *Rumex vesicarius* est riche en phénols totaux surtout la fraction acétate d'éthyle (452 mg GAE/100 g) et riche aussi en flavonoïdes (25,2mg QE/g) dans la même fraction. Les extraits montrent une bonne activité antioxydante soit une capacité de piégeage de radicaux libres ou une réduction de fer intéressante par rapport aux BHA et BHT. L'activité antioxydante de la plante (les deux fractions) est 55 fois supérieure à celle du BHA et du BHT (Bouras et Houchi, 2013).

2.2. Le chardon Marie (*Silybum marianum L*) :

Le chardon Marie est originaire des régions méditerranéennes. C'est une plante annuelle ou bisannuelle qui atteint 1,5 mètre de haut. On remarque ses feuilles brillantes et vertes. Les tiges ramifiées à leur extrémité portent des touffes bien fournies de fleurs tubulaires. Les fruits sont oviformes, de couleur beige ou brune. La floraison a lieu de juin à septembre.

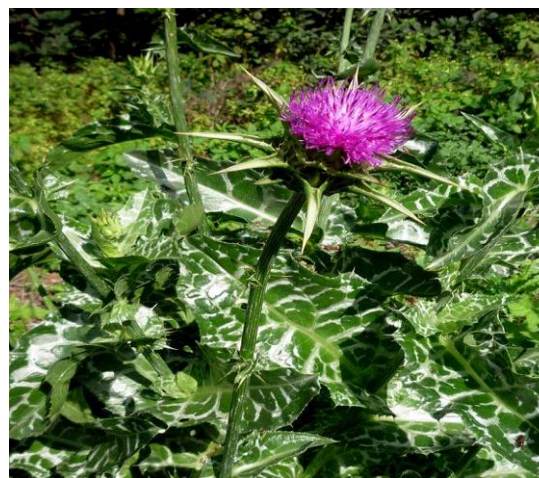


Figure 09 : Le chardon Marie (anonyme2)

L'activité antioxydante de quatre extraits obtenus à partir de graines de chardon marie par la technique de réduction du DPPH a révélé un grand pouvoir antioxydant, en particulier pour l'extrait acétate d'éthyle avec une IC_{50} de 0,20 mg/ml. Les extraits de chloroforme et de butanol possèdent une capacité antioxydante modérée IC_{50} de 0,97 mg/ml et IC_{50} de 1,04 mg/ml respectivement. Cependant le résidu d'extrait aqueux est le moins actif IC_{50} de 5,64 mg/ml. La chromatographie sur couche mince a confirmé la présence de flavonoïdes où l'analyse quantitative a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus riche en flavonoïdes avec des teneurs d'environ 39,64 μ g équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (Bessam *et al.*, 2017).

2.3. Le cumin (*Cuminum cyminum* L) :

Le cumin (*Cuminum cyminum* L) est une petite plante herbacée de la famille des ombellifères (Apiacées) (Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1986), d'une hauteur de 30 cm (Vican, 2001), à feuilles parfumées, finement divisées. Ses petites fleurs blanches ou roses en ombelles fleurissent en été (Bremness, 2002). Le cumin est utilisé généralement comme additif (Saiedirad *et al.*, 2008), mais également il a une variété de propriétés médicinales connues depuis l'antiquité telle que diurétiques, antioxydante, astringentes et hypoglycémiantes (Dhandapani *et al.*, 2002).



Figure 10 : le cumin (anonyme3)

L'activité antioxydante de *Cuminum cyminum* L est évaluée par deux méthodes, le blanchissement du β -carotène et la réduction du DPPH. Dans le premier test, l'extrait n-butanol du cumin a montré l'activité antioxydante la plus élevée (36,56%). De même dans le test au DPPH avec une activité anti-radicalaire (94,55%) plus élevée que celle du BHT (92,91%) (Athamena *et al.*, 2010).

2.4. Arz el atlas (*Cedrus atlantica*) :

Le cèdre de l'atlas, Arz el atlas en arabe est une espèce endémique en Afrique du nord (TARRIER et DELACRE, 2006). Le cèdre de l'atlas est une essence caractéristique de l'Afrique du Nord et plus précisément du Maroc et d'Algérie (BOUDY, 1950).

L'huile essentielle de *Cedrus atlantica* possède des propriétés anti-inflammatoires (SUGITA *et al.*, 2004) et antimicrobiennes (HAMMER *et al.*, 1999).

L'huile est également utile dans le traitement de la perte de cheveux dans une combinaison d'huiles d'aromathérapie (ORMEROD *et al.*, 2000). Aussi la cellulose et ses dérivées extraites de l'écorce sont utilisées dans le traitement des bronchites, de la toux et des indigestions...ect (RACHED, 2009).



Figure 11 : *Cedrus atlantica* (anonyme4)

L'étude phytochimique des tiges de cèdre de l'atlas montre que la fraction acétate d'éthyles est très riche en polyphénols et flavonoïdes avec des teneurs de $636,25 \pm 49,88$ mgEAG/gE et $20,75 \pm 0,58$ mgEAG/gE, respectivement.

Une relation linéaire a été établie entre l'activité antioxydante des échantillons testés et le contenu en polyphénols. Les échantillons les plus riches en polyphénols totaux sont les plus actives (CHEMALI et BELKACEM, 2017).

3. L'arbousier :

L'arbousier ou *Arbutus unedo* L est un arbuste sauvage qui se développe dans les régions méditerranéennes et connu en Algérie sous le nom vulgaire de « Lendj » (Isérin, 2001). Il est très répondeu en raison de sa capacité à se régénérer les forêts incendiées (Espírito Santo *et al.*, 2012).



Figure 12 : fruit de l'arbousier (Reille, 2015)

3.1. Morphologie d'*Arbutus unedo* L :

a. Racines :

L'arbousier comme tous les Ericaceae, a des racines pivotantes dont la racine principale peut atteindre plusieurs dizaine de mètres. Cette racine se développe et se ramifie en racines latérales d'ordres inférieurs (Bontineau, 2010).

b. Tronc :

Le tronc est rugueux, de couleur brun-rouge et desquamant de fissures gris-brunâtre. Le bois est très dur (Kremer, 2011).

L'écorce fine, gris à la base, devient rougeâtre à la partie supérieure, se détachant facilement en lanière (Couplan et Styner, 1994).



Figure 13 : tronc d'arbousier (anonyme)

c. Feuilles :

Les feuilles de l'arbousier mesurent entre 5 et 10 cm de long, sont de forme elliptique allongées à bordures dentées en scie, aigus aux deux extrémités (Godet, 2004).

Les feuilles sont de couleur vert foncé luisant au-dessus et vert pale en dessous (Clintock et Fitter, 1986).



Figure 14 : feuille d'*Arbutus unedo* (anonyme).

d. Fleurs :

La floraison de l'arbousier s'étale en Algérie d'Octobre à Janvier (Beniston et Beniston, 1984).

Les fleurs blanc-verdâtre d'environ 1 cm de long, composées de 5 pétales soudés et 5 sépales libres de couleur verte et de 10 étamines à filet blanc-velu donc la formule florale de l'arbousier est : $5S+ (5P) +10E+ (5C)$. À maturité les anthères libèrent le pollen par un pore terminal (Polunin et Huxley, 1987).



Figure 15 : inflorescence de l'arbousier (anonyme)

e. Fruit :

C'est un fruit comestible qui mûr en hiver, très riche en vitamine C et de goût très prononcé à saveur fade (Hampikian, 2010), et de couleur rouge orangé à maturité de forme sphérique de 2 cm de diamètre, à peau rugueuse couverte de petit pointes coniques (Clinkton et Filtter, 1986).



Figure 16 : fruit d'*Arbutus unedo* (anonyme).

3.2. Les principaux constituants de l'arbousier :**a. Les feuilles :**

37 constituants ont été déterminés dans l'huile essentielle des feuilles dont les principaux sont (E)-2-decenal (12,0%), l'alpha-terpinéol (8,8%), l'acide hexadécanonique (5,1%) et le (E)-2-undecenal (4,8%). Les feuilles d'*Arbutus unedo* sont très riches en tanins (36-37%) (Avramov, 2003).

b. Les fruits :

Selon Avramov (2003), le pigment responsable de la coloration rouge est la 3-glucosylcyanidine. Les fruits contiennent principalement de la vitamine C, la riboflavine, la thiamine, des sucres de la pectine du carotène et du nicotinamide.

3.3. Usages et traditions :

En raison de sa forte teneur en sucre le fruit a été traditionnellement utilisé pour obtenir des boissons alcoolisées. L'activité la plus importante associée à cette espèce est la production de vin (Correira et Oliveira, 2002).

Il est rarement utilisé comme fruit frais mais en raison de sa richesse en pectine (Tardio *et al.*, 2002), l'arbose est aussi utilisé dans la production de gelées, confiture, des yaourt et autres dessert traditionnels (Pawlowska *et al.*, 2006 et Pallauf *et al.*, 2008).

Les feuilles de l'arbousier sont antiseptiques, astringentes et diurétiques (Couplan et Styner., 1994).

3.4. Propriétés médicinales de l'arbousier :

a. Utilisation externe :

Grace à la présence de polyphénols, tanins et catéchine, l'extrait d'arbousier favorise une relaxation aortique (Debuigne et Couplan, 2009). Il soulage les maux de gorge est utilisé en gargarisme (Iserin *et al.*, 2001)

b. Utilisation interne :

C'est un antiseptique naturel pour lutter contre les infections urinaires comme l'urétrite (Iserin *et al.*, 2001). Il présente des propriétés diurétiques, purgatives, astringentes et anti-inflammatoires. Les racines de l'arbousier sont hypotensives conseillés pour diminuer l'hypertension artérielle (Debuigne et Couplan, 2009).

Il aussi conseillé pour traiter les diarrhées et les spasmes digestifs (Debuigne et Couplan., 2009). Il est également utilisé pour traiter les pathologies cardio-vasculaires, le diabète et les pathologies inflammatoires (El Hoaouari *et al.*, 2007)..

3.5. Répartition géographique :

Arbutus unedo L. souvent appelé arbre aux fraise, se trouve dans l'ouest, le centre et le sud de l'Europe, au Nord-Est de l'Afrique, les îles Canaries et en Asie occidentale. La distribution de l'arbousier s'aperçoit, principalement dans les zones côtières et intérieures avec climats doux et sécheresse estivale (Torres *et al.*, 2002).

L'arbousier en Algérie, est bien représenté dans le tell Algérien (Aksil, 2015), surtout dans les forêts de chêne liège (des régions de Skikda, Jijel et El Taref). *Arbutus unedo* L. préfère les substrat siliceux, décarbonatés (Torres *et al.*, 2002 et Godinho-Ferreira *et al.*, 2005) et les sols alcalins relativement acides (Celikel *et al.*, 2008).

3.6. Valeur nutritives de fruit de l'arbousier :

La composition chimique des baies d'arbose varie en fonction de nombreux facteurs ; variété, condition climatique, année de prélèvement... Le fruit est particulièrement riche en vitamine C, la matière organique est constituées par des protéines (en faible quantité), des lipides (en quantité réduite aussi), des sucres, des polymères phénoliques et de fibres en particuliers (Aksil, 2015)

3.7. Toxicité :

A forte dose, la toxicité est modérée. L'arbousier est narcotique et stupéfiant. Toutes les parties sont dangereuses surtout les feuilles. Ces plantes contiennent une toxine, l'andromédotoxine (diterpène tetracyclique), responsable de vomissements et de baisse de tension et pouvant entraîner la mort si elle est absorbée en doses importantes.

La consommation en grande quantité des baies provoque des coliques et des effets proches de l'ébriété (les fruits trop murs contiennent une quantité non négligeable d'alcool) (Samia, 2010).

Deuxième partie :
Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Le matériel végétal :

Dans notre travail nous nous intéressons à l'étude de l'activité antioxydante des fruits de l'arbousier, récoltés en décembre 2017, de la commune de Ain Fezza (Tizi) wilaya de Tlemcen, les fruits sont séchés à l'ombre et à température ambiante.

2. Objectif :

L'objectif de notre étude est l'évaluation de l'activité antioxydants de l'extrait hydro acétonique des fruits de l'arbousier in vitro, en utilisant les tests suivants : la réduction de fer FRAP, le piégeage des radicaux libre DPPH et le test de blanchissement de β -carotène.

3. L'extraction :

Dans un premier temps, un extrait brut a été préparé. Ce dernier subit une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle.

3.1. Préparation de l'extrait eau-acétone :

- 60g de matière végétale sèche sont mélangés au 600 ml de solvant eau-acétone 30 :70 (v/v)



Figure 17 : matériel végétal séché

- Le mélange est porté à l'ébullition sous reflux pendant 30 min (extraction par décoction)

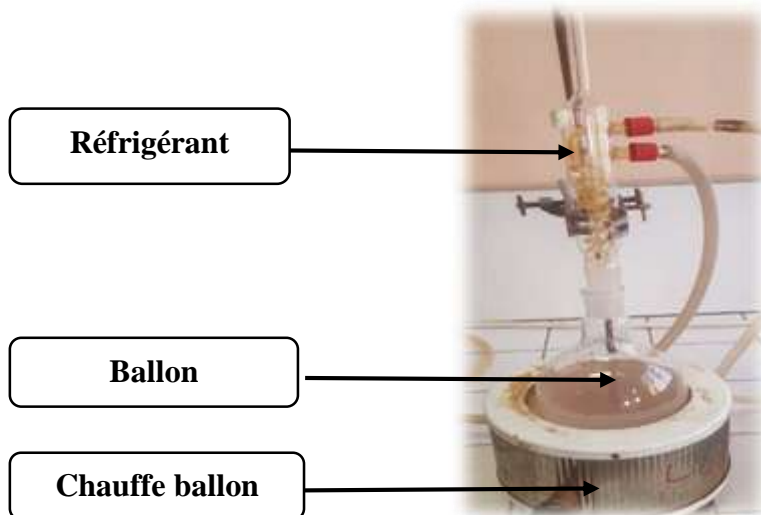


Figure 18 : Montage d'extraction sous-reflux

- L'extrait est refroidi ensuite filtré sur papier filtre



Figure 19 : filtration

- Après filtration une partie du filtrat est séchée à l'étuve à 50°C pendant 24h pour donner l'extrait brut, et l'autre subit une extraction liquide- liquide (V/V) par l'acétate d'éthyle pour donner deux fractions organique et aqueuse. Fraction organique évaporé à sec l'aide de rota-vapour à 50°C et la fraction aqueuse séché à l'étuve dans les mêmes conditions.



Figure 20 : Fraction organique



Figure 21 : Fraction aqueuse

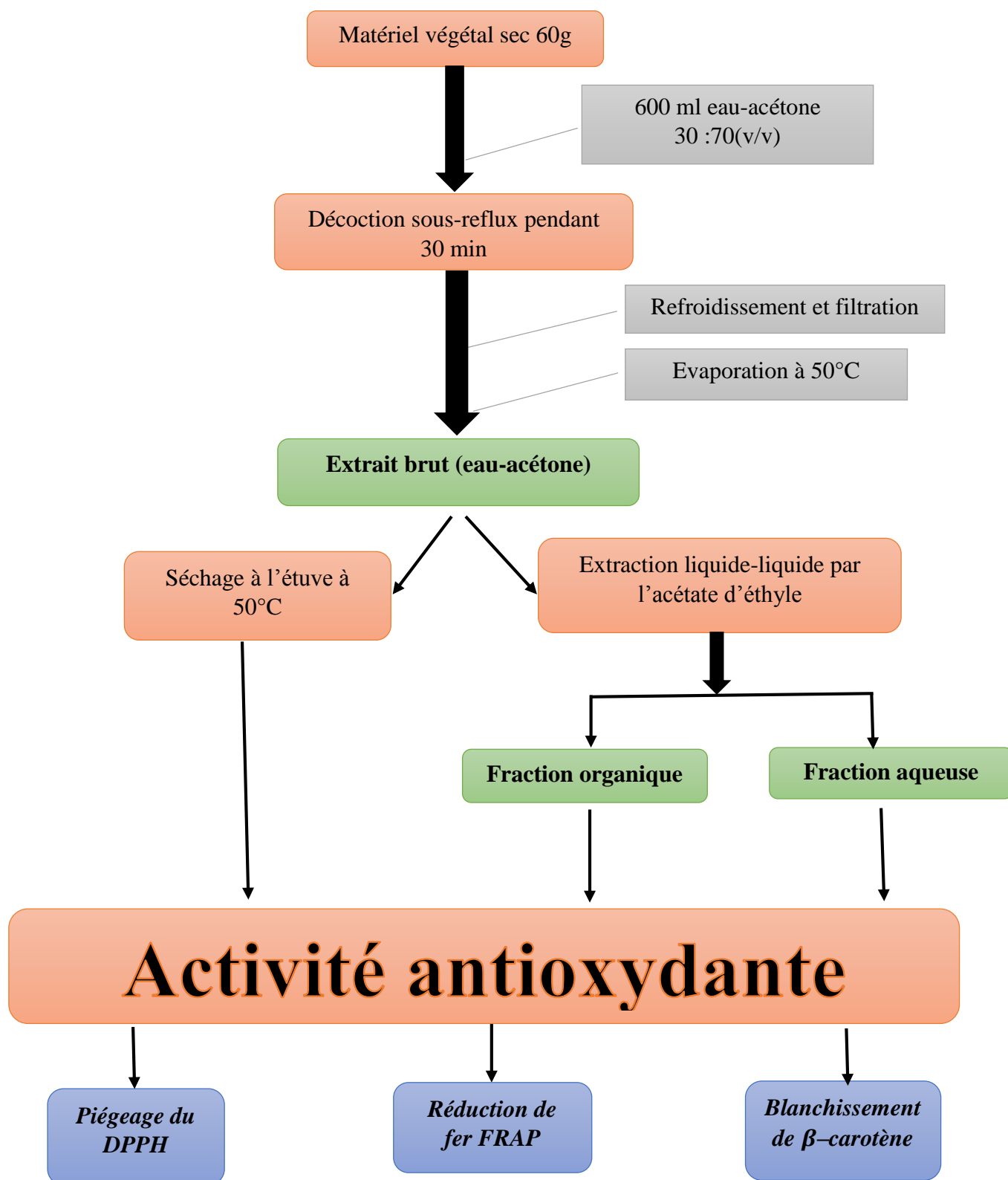


Figure 22 : protocole expérimentale

4. Tests phytochimiques :

a. Flavonoïdes :

Mélanger 5 ml de chaque extrait (brut, fractions aqueuse et organique) avec des gouttes de HCl concentré. Puis, ajouter une quantité de tournures de magnésium et laisser le mélange agir. La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge orange (Karumi *et al.*, 2004)

b. Tanins :

Ajouter 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 (2%) à 2ml de chaque solution testée et laisser reposer quelques minutes. La présence de tanins donne une coloration bleue-noire et un précipité (Karumi *et al.*, 2004).

c. Acides aminés :

A 1ml d'extrait à tester ajouter 1ml de la solution de ninhydrine préparée dans l'acétone ou l'éthanol dont la concentration est de 1% ; chauffer dans le bain marie et observer le changement de couleur. La présence des acides aminés donne une couleur violette (Harbone, 1998).

5. Tests de caractérisation :

5.1. Dosage des sucres :

a. Principe :

Le dosage des sucres est effectué par la méthode de Dubois *et al* (1956) dont le principe repose sur la réaction entre phénol 5% et acide sulfurique concentré. A ce moment-là, se forment des chromophores de couleur jaune-orange dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides, la densité optique est déterminée entre 450 à 550 nm.

b. Dosage :

Le mode d'extraction consiste à solubiliser les extraits obtenus dans de l'eau. Mélanger 1ml de la solution obtenue avec 1ml de phénol à 5% et 5ml d'acide sulfurique. Laisser agir pendant 30mn et lire l'absorbance à 490nm devant un blanc contenant 1ml d'eau distillée et

1ml de phénol avec 5ml d'acide sulfurique. Une droite d'étalonnage de glucose est tracée afin d'estimer les concentrations des sucres dans les extraits analysés.

5.2. Dosage des flavonoïdes :

a. Principe :

La quantification du contenu flavonoïdes des fruits de l'arbousier est estimée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Swain. et Hillis. ,1959). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par ce réactif (AlCl_3), elle entraîne la formation d'un complexe brunâtre qui absorbe à 510 nm. La comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon de catéchine de concentration connue permet d'évaluer la teneur totale en flavonoïdes.

b. Dosage :

Le dosage des flavonoïdes s'effectue par la méthode suivante :

500 μl d'extrait préparé à 1mg/ml sont mélangés avec 2ml d'eau distillée et 150 μl de nitrate de sodium (NaNO_2) à 15%, nous laissons reposer le mélange 6 min à température ambiante. Ce mélange est ensuite additionné à 150 μl de trichlorure d'aluminium 10% (AlCl_3 , $6\text{H}_2\text{O}$); après un repos de 6 min à température ambiante ; 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 % et 200 μl d'eau distillée sont ajoutés pour ajuster le volume final à 5 ml. Le mélange est soumis à une agitation et incubation pendant 15 min, la densité optique est lue au spectrophotomètre UV à une longueur d'onde (λ) de 510 nm.

Une courbe d'étalonnage réalisée par un standard étalon (la catéchine) à différentes concentrations (0,1 ; 0,08 ; 0,06 ; 0,04 ; 0,02 mg/ml) est pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons servira à la quantification des flavonoïdes.

5.3. Dosage des polyphénols :

Principe :

Le principe de dosage des polyphénols repose sur les capacités réductrices des complexes ioniques polymériques formés à partir des acides phosphomolybdiques ($\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$) et phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) (réactif de Folin-

Ciocalteu) par les composés phénoliques (Swain et Hillis ,1959) L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}) et qui est stabilisé par l'addition de carbonate de sodium ($NaCO_3$).

Dosage :

0.1 ml à 1mg/ml de l'extrait à analyser est ajouté à 2 ml de carbonate de sodium 2%, ensuite on incube le mélange pendant 5 min. après incubation 100 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu à 0,2N est ajouté au mélange. Ce dernier est incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est lue au spectrophotomètre UV à une longueur d'onde (λ) de 765 nm.

Nous réalisons une gamme étalon avec un polyphénol témoin de l'acide gallique à différentes concentrations (0,1 ; 0,08 ; 0,06 ; 0,04 ; 0.02 mg/ml) comme control positif et dans les mêmes conditions opératoire.

Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme (μ g EAG/mgE) de l'extrait en utilisant la formule suivante :

$$\%CP = \frac{C.V}{P} \times 100$$

C : Concentration déterminé de la droite (mg/ml).

V : Volume de l'eau distillée (ml).

P : Pris d'essai (mg).

6. Le pouvoir antioxydant des extraits des fruits de l'arbousier :

6.1. Test du radical libre DPPH :

a. Principe :

Le DPPH (Diphenylpicrilhydrazyl) est, pratiquement, le radical libre le plus stable. En solution dans le méthanol, le DPPH est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm. En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle. Ce passage, de la première forme à la deuxième, est

accompagné d'une diminution de l'absorbance qui peut exprimer le pourcentage de réduction de DPPH (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

Cette méthode est basée sur la mesure de pouvoir des antioxydants à piéger le radical DPPH. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ DPPH réduit} = [(A1 - A2)/A1] \times 100$$

A1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A2 : absorbance en présence d'extrait.

b. Mode opératoire :

1 ml de solution méthanolique des extraits (E. brut, F. Organique et F. aqueuse) à différentes concentrations (0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 ; 0,03125 mg/ml) sont ajoutés à 1 ml de solution méthanolique de DPPH à (0.12g/l), parallèlement un control négatif est préparé en mélangeant 1 ml de méthanol avec 1 ml de solution méthanolique de DPPH, le blanc est le méthanol

La lecture de l'absorbance se fait à 517nm après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique à différents concentration (0,001 ; 0,0005 ; 0,00025 ; 0,0000125 ; 0.0000625 mg/ml) dont l'effet antioxydant est testé sur le DPPH dans les mêmes conditions.

Pour chaque concentration le test est répété 3 fois et les résultats sont exprimés en calculant pourcentage d'inhibition.

c.Calcul des pourcentages d'inhibition :

Les pourcentages d'inhibition de DPPH sont calculés en utilisant la formule suivante :

$$I\% = ((Ac - At) / Ac) \times 100$$

Ac : absorbance de contrôle négatif

At : absorbance du test effectué

d. Calcul des concentrations efficaces IC₅₀ :

La IC₅₀ ou concentration qui réduit 50% (aussi appelée EC₅₀ pour efficient concentration 50), est la concentration de l'acide ascorbique ou l'extrait qui peut réduire 50% du DPPH. Ce paramètre est déterminé graphiquement en suivant la variation des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentration des extraits testés (Samarth *et al.*, 2008).

6.2. Réduction de fer FRAP :

a. Principe :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe³⁺) présent dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺) (Oyaizu ., 1986)

b. Solutions à préparer :

- Solution tampon de phosphate 0.2M ; pH= 6,6
- Solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%
- Solution de de l'acide trichloracétique TCA à 10%
- Solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl₃ à 0.1%

c. Préparation de solution tampon de phosphate (0.2M, pH=6.6) :

On prépare la solution tampon à partir d'une solution (A) monobasique (NaH₂PO₄) (M=119,98 g/mole) et la solution (B) dibasique (Na₂HPO₄) (M=141,96 g/mole). Ensuite, on mélange les deux solutions (A) et (B) pour avoir une concentration de 0,2 M et un pH=6,6.

$$n = \frac{m}{M} \rightarrow m(A) = n \times M = 119,98 \times 0,2 = 23,996 \text{ g}$$

$$n = \frac{m}{M} \rightarrow m(B) = n \times M = 141,96 \times 0,2 = 28,392 \text{ g}$$

23,996 g du composé (A) ajustés avec l'eau distillée jusqu'à 1L.

24,392 g du composé (B) ajustés avec l'eau distillée jusqu'à 1L

d. Mode opératoire :

1 ml des extraits à différentes concentrations (0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 mg/ml) solubilisées dans l'eau distillée est mélangée avec 2.5 ml de solution tampon phosphate (0.2M ; pH=6.6) et 2,5 ml de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le mélange est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 min. Après on additionne 2.5 ml de l'acide trichloracétique (10%).

On prélève 2.5 ml de solution obtenue et on ajoute 2.5 ml d'eau distillé et 0.5 ml de $FeCl_3$ (0.1%).

La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc déjà préparé en remplaçant l'extrait par l'eau distillé. L'acide gallique est utilisé comme contrôle positif.

6.3. Test de blanchissement de β -carotène :

a. Principe :

Dans le test de blanchissement du β - carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres due à l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylène de l'acide linoléique (Kumaran et Karunakaran, 2006). Puis le radical libre va oxyder le β -carotène hautement insaturé et entraînant la disparition de sa couleur rouge (blanchissement ou décoloration de β -carotène). La présence des antioxydants dans l'extrait permet de minimiser l'oxydation du β -carotène par les hydro-peroxydes qui sont neutralisés (Mariod *et al*, 2009).

b. Mode opératoire :

a) Préparation des dilutions des extraits éthanolique à différentes concentration : (0,09375 ; 0,1875 ; 0,375 ; 0,75 ; 1,25 ; 2.5 mg/ml).

b) Préparation de blanc : 200mg de Tween 40 et 20 mg de l'acide linoléique sont dissous dans 50 ml d'eau distillé saturé en oxygène.

c) Préparation de l'émulsion : 2 mg de β - carotène sont solubilisés dans 10 ml de chloroforme, 1 ml de solution obtenue est introduit dans un bécher contenant 200 mg de Tween

40 et 20 mg de l'acide linoléique. Après évaporation de chloroforme au bain marie à 40°C un volume de 50 ml d'eau distillé saturée en oxygène est ajouté au mélange.

2 ml de l'émulsion est mélangé avec 100 µl de la solution des extraits, la lecture se fait à 470 nm contre le blanc préparé après 120 min d'incubation au bain marie, le control négatif est représenté par une solution contenant 2 ml de l'émulsion et 100 µl de l'éthanol la lecture de l'absorbance se fait à T₀ et à T₁₂₀.

- d) Préparation de mélange : émulsion/ extrait.
- e) Préparation de control négatif : (émulsion/ éthanol).
- f) La lecture de DO de control à T₀ (470nm).
- g) Incubation au bain marie à 50°C pendant 120 min
- h) La lecture de l'absorbance de tous les tubes à T₁₂₀.

Le control positif est représenté par un antioxydant de synthèse BHT à différentes concentrations : (0,09675 ; 0,1875 ; 0,375 ; 1,25 ; 2.5 mg/ml)

Tous les essais sont répétés 3 fois.

d.Expression des résultats :

L'activité antioxydants des extraits est estimée en termes de blanchissement ou décoloration de β- carotène et les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition en appliquant la formule suivante :

$$I\% = [(A_T - C_T) / (C_0 - C_T)] \times 100$$

I% : Pourcentage d'inhibition.

A_T : Absorbance des échantillons après incubation de 120 min.

C_T : Absorbance de control négatif après incubation de 120 min.

C₀ : Absorbance de control négatif à T₀.

Résultats et interprétation

1. Extraction :

La figure ci-dessous montre les aspects des extraits obtenus. L'extrait eau-acétone est de couleur brune et d'un aspect pâteux alors que la fraction aqueuse est rougeâtre légèrement pâteuse. La fraction organique est de couleur marron claire ayant l'aspect d'une poudre.



2. Les tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les différents extraits préparés à partir des fruits de l'arbousier. Ces tests ont permis de mettre en évidence la présence de trois familles de composés chimiques.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés mentionnés dans le tableau 02, montrent la présence des flavonoïdes et des tanins dans les trois extraits (brut, fractions aqueuse et organique), la présence des acides aminés dans l'extrait brut et la fraction organique contrairement à la fraction aqueuse où ils sont absents.

Tableau 02 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les fruits de l'arbousier :

<i>Tests réalisés</i>	<i>Extrait brut</i>	<i>Fraction organique</i>	<i>Fraction aqueuse</i>
<i>Flavonoïdes</i>	+	+	+
<i>Tanins</i>	+	+	+
<i>Acides aminés</i>	+	+	-

3. Dosage des sucres :

Le dosage des sucres a été réalisé par la méthode de Dubois pour déterminer la teneur des sucres au niveau des fruits de l'arbousier. Le glucose est considéré comme molécule de référence pour réaliser une courbe d'étalonnage.

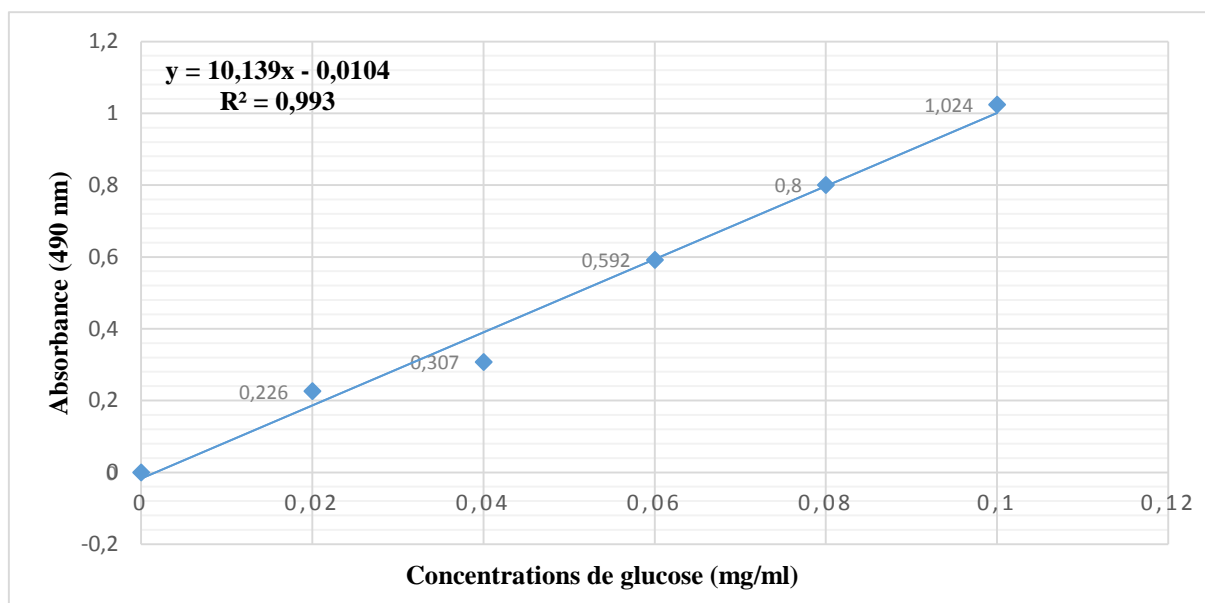


Figure 23 : Courbe d'étalonnage de glucose pour le dosage des sucres.

D'après le tableau 03 qui représente les résultats de dosage des sucres des fruits de l'arbousier, nous remarquons que les teneurs en sucre sont variables entre les différents extraits ; l'extrait brut contient plus de sucres par rapport aux autres extraits suivi par la fraction organique puis la fraction aqueuse.

Tableau 03 : pourcentage des sucres des extraits des fruits de l'arbousier.

extraits	Extrait eau-acétone	Fraction organique	Fraction aqueuse
% de sucre	73,2	26	21,4

4. Dosage des flavonoïdes :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé pour déterminer la teneur des flavonoïdes au niveau des trois extraits de la plante. La catéchine considérée comme molécule de référence a permis de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes qui est exprimé en mg équivalent de catéchine (EC) par gramme de matière végétale sèche.

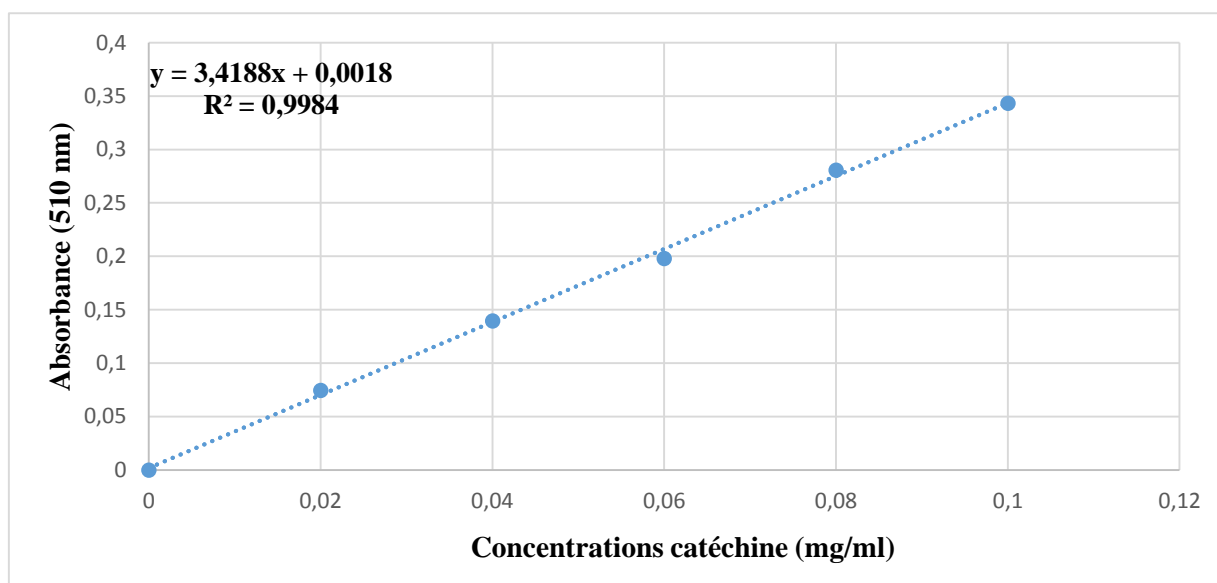


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Le tableau 04 résume les différents pourcentages obtenus en flavonoïdes. On observe des teneurs faibles dans l'extrait eau-acétone et la fraction organique. La fraction aqueuse contient une forte concentration en flavonoïdes.

Tableau 04 : pourcentage des flavonoïdes des extraits de l'arbousier.

extraits	Extrait eau-acétone	Fraction organique	Fraction aqueuse
% de flavonoïdes	2,3	2,1	5,6

5. Dosages des polyphénols :

Le dosage des polyphénols a été effectué par une méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

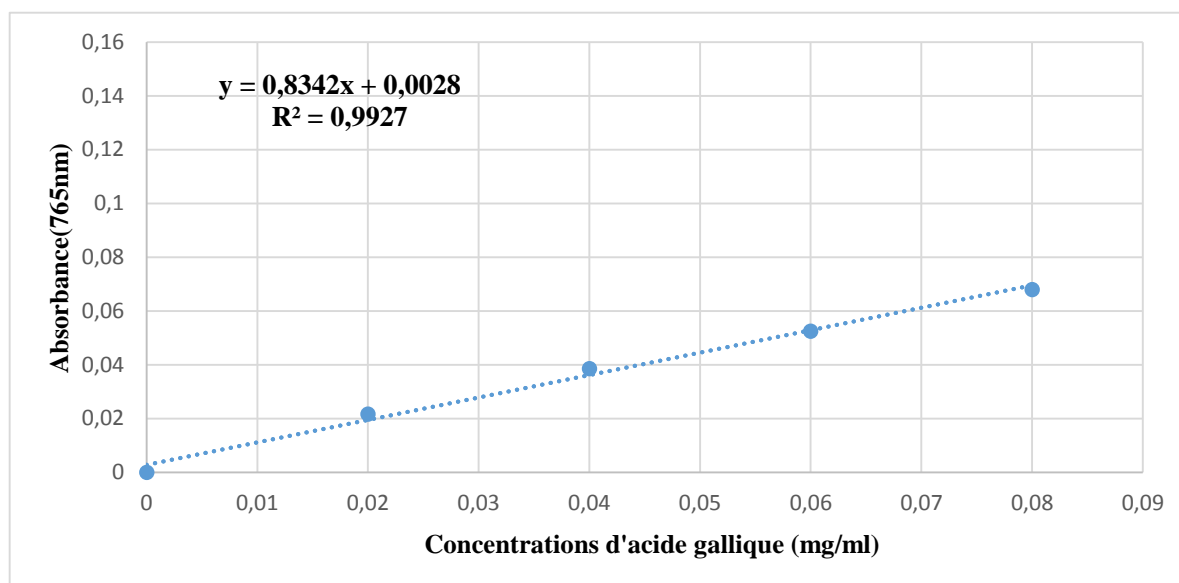


Figure 25 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols

Pour les trois extraits de la plante étudiée nous avons remarqué une variabilité des teneurs en polyphénols (Tableau 05). La teneur la plus élevée est constatée dans la fraction organique, elle est de l'ordre de 26,1 % suivi par la fraction aqueuse (21,3 %) ensuite l'extrait brut (14,6 %).

Tableau 05 : pourcentage des polyphénols des extraits de l'arbousier.

Extraits	Extrait brut	Fraction organique	Fraction aqueuse
% des polyphénols	14,6	26,1	21,3

6. Evaluation de l'activité antioxydante :

6.1. Piégeage de radical libre DPPH :

Le radical DPPH est largement utilisé pour l'étude de l'activité antiradicalaire des différents extraits végétaux. Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de réduction du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits ou de l'acide ascorbique utilisé comme molécule de référence.

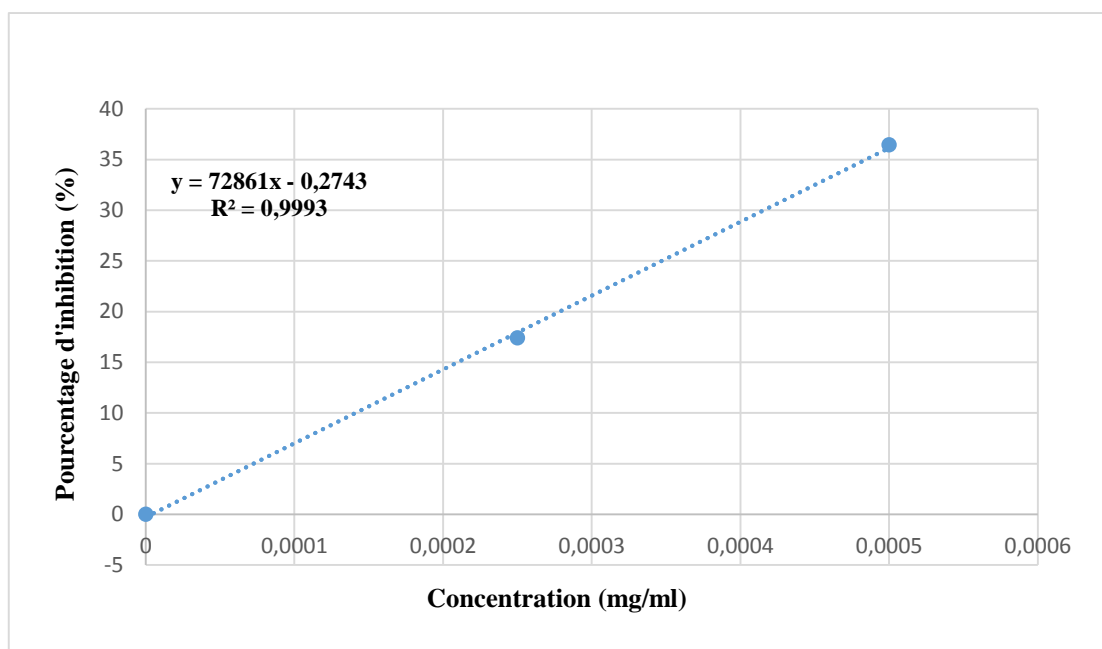


Figure 26 : Pourcentage de réduction du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique

La figure n° 27 : illustre la variation des pourcentages de réduction du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique. On peut constater que cette molécule antioxydante présente une activité très élevée. On enregistre une réduction de l'ordre de 35% pour une concentration de 0,5 µg/ml.

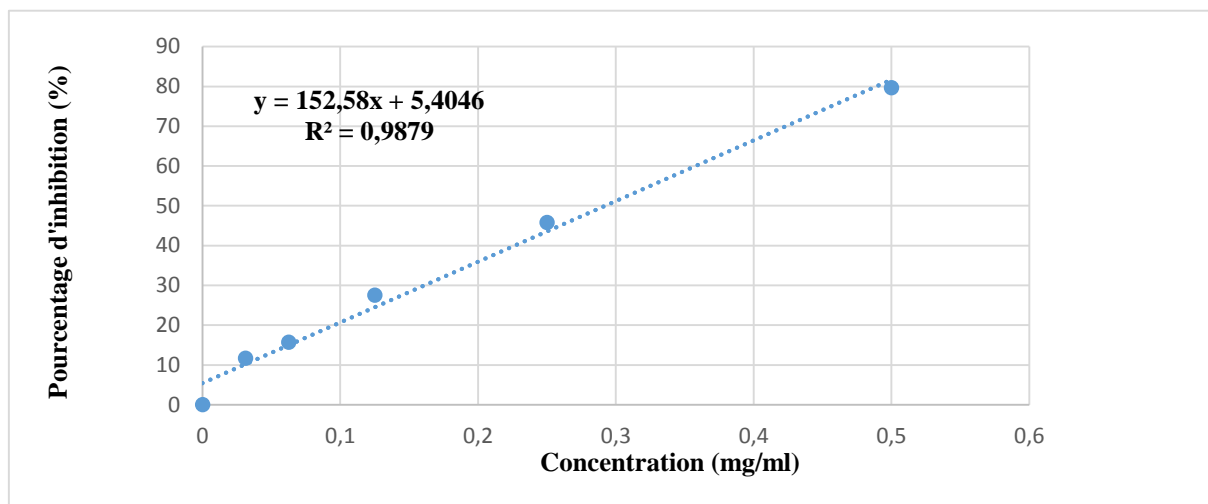


Figure 27 : pourcentage de réduction du radical DPPH en fonction des concentrations d'extrait brut.

Selon les résultats obtenus on note une augmentation de l'activité antiradicalaire proportionnelle à l'augmentation de la concentration des extraits. La fraction organique (figure 30) a montré l'activité la plus élevée par rapport à l'extrait brut (figure 28) et la fraction aqueuse (figure 29). Pour une concentration de 0,125mg/ml, la fraction organique atteint un pourcentage d'inhibition de 50,28%. A cette même concentration, l'extrait brut et la fraction aqueuse présentent un pourcentage d'inhibition de 27,48% et 21,17%, respectivement.

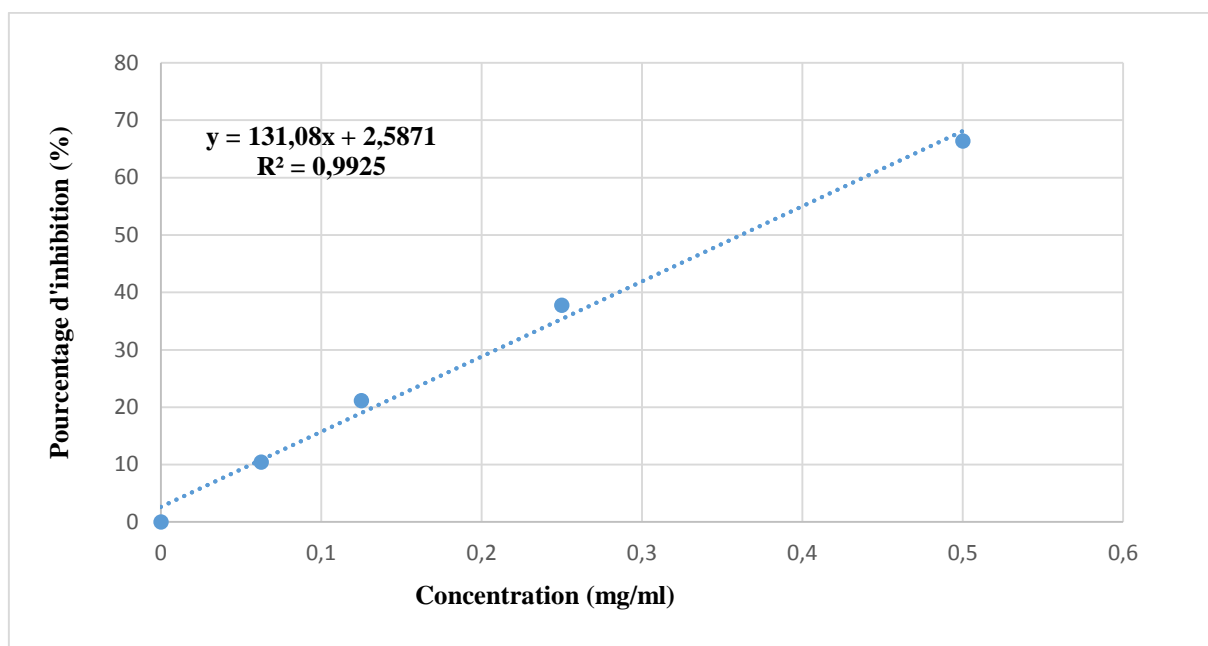


Figure 28 : pourcentage de réduction du radical DPPH en fonction des concentrations de la fraction aqueuse

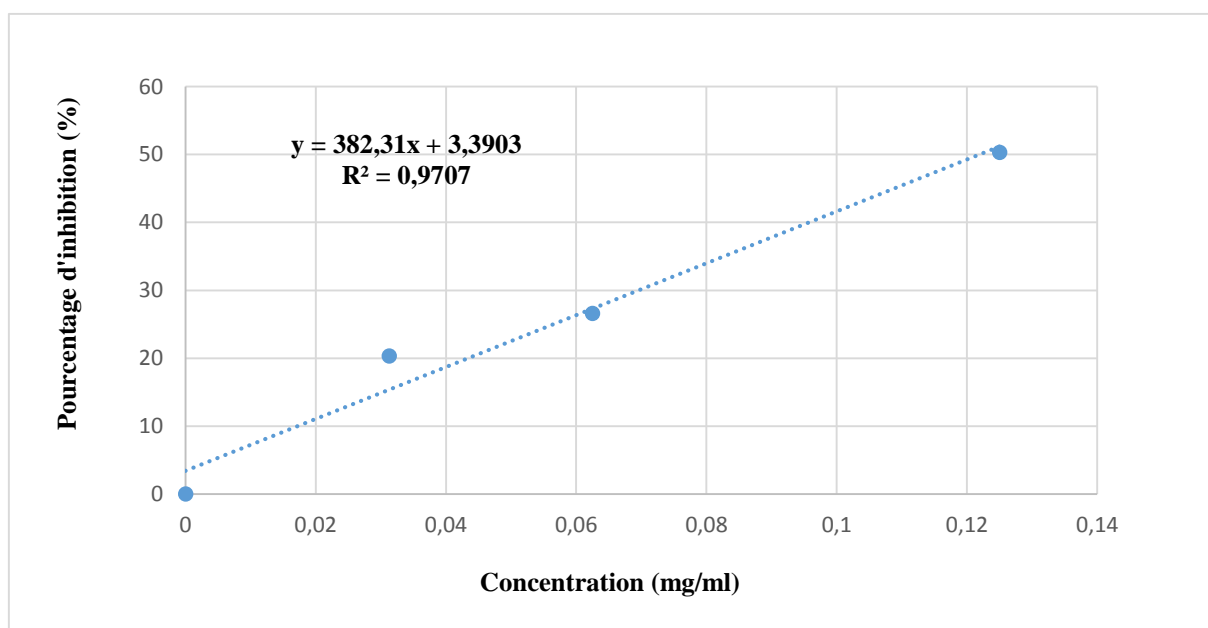


Figure 29 : pourcentage de réduction du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de la fraction organique

La capacité antioxydante de nos différents extraits est déterminée à partir des IC_{50} . C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. L' IC_{50} et l'activité

antioxydante de l'extrait testé sont inversement proportionnelles. Les valeurs des IC_{50} trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le tableau 06 suivant :

Tableau 06 : valeur d' IC_{50} des extraits de fruit de l'arbousier et de l'acide ascorbique.

extraits	Extrait brut	Fraction organique	Fraction aqueuse	Acide ascorbique
IC_{50} (mg/ml)	0,292	0,121	0,361	0,00069

En comparant les IC_{50} des différents extraits testés du fruit de l'arbousier par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous remarquons que l'activité antiradicalaire de tous nos extraits est inférieure à celle de la molécule de référence (0,00069 mg/ml). Cette capacité est plus importante dans la fraction organique (0,121 mg/ml) qui est inférieure à celle de l'extrait brute (0,292 mg/ml) et de la fraction aqueuse (0,361 mg/ml).

6.2. Réduction de fer (FRAP) :

C'est une méthode de mesure de la puissance des substances de nos extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} qui est l'un des mécanismes antioxydants. C'est une technique rapide, facile et reproductible (Karagözler *et al.*, 2008). La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle.

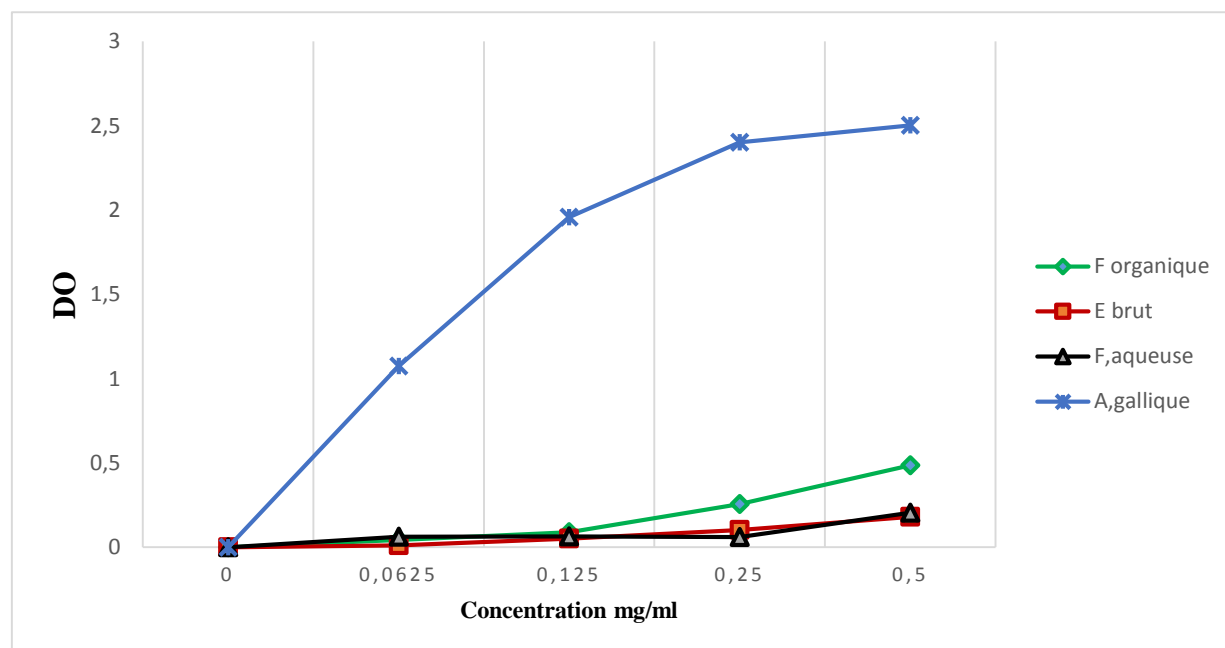


Figure 30 : Réduction du fer par les extraits de l'arbousier et de l'acide gallique

D'après les résultats, nous remarquons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration des échantillons.

Tous nos extraits présentent des activités antioxydantes nettement inférieures que celle de la référence (acide gallique).

A la concentration de 0,25 mg/ml, les extraits étudiés présentent des pouvoirs réducteurs variables ; la fraction organique donne une meilleure activité comparée à celles de l'extrait brut et de la fraction aqueuse. Nous pouvons déduire que tous les extraits ont une capacité pour réduire le fer, mais elle reste toujours inférieure à celle de l'acide gallique.

6.3. Test de blanchissement de β -carotène :

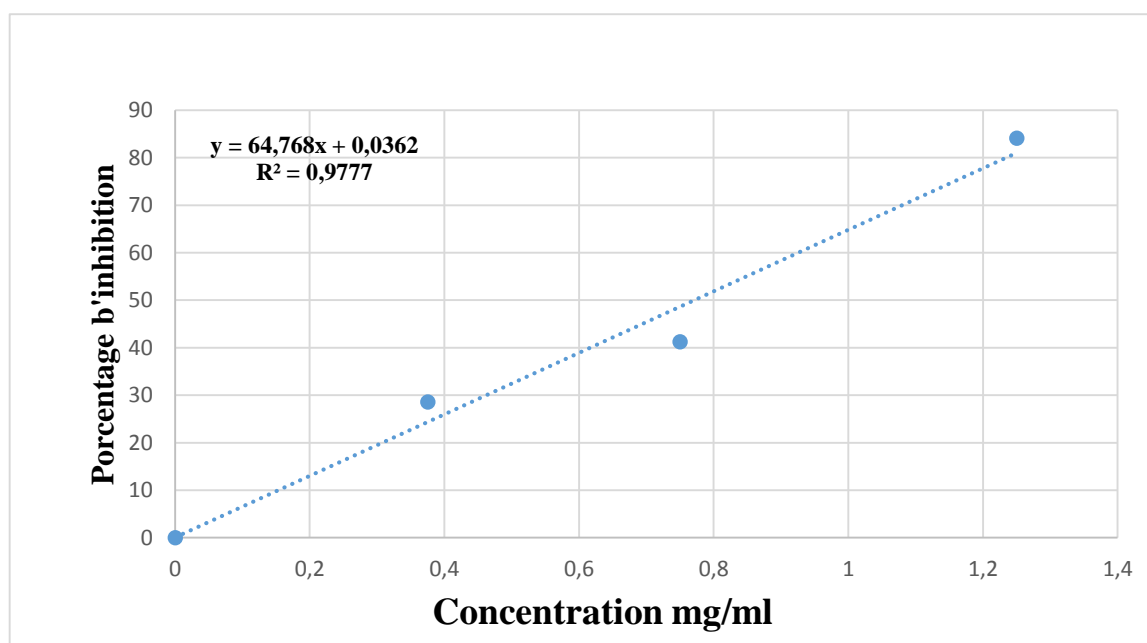


Figure 31 : pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène en fonction des concentrations de BHT

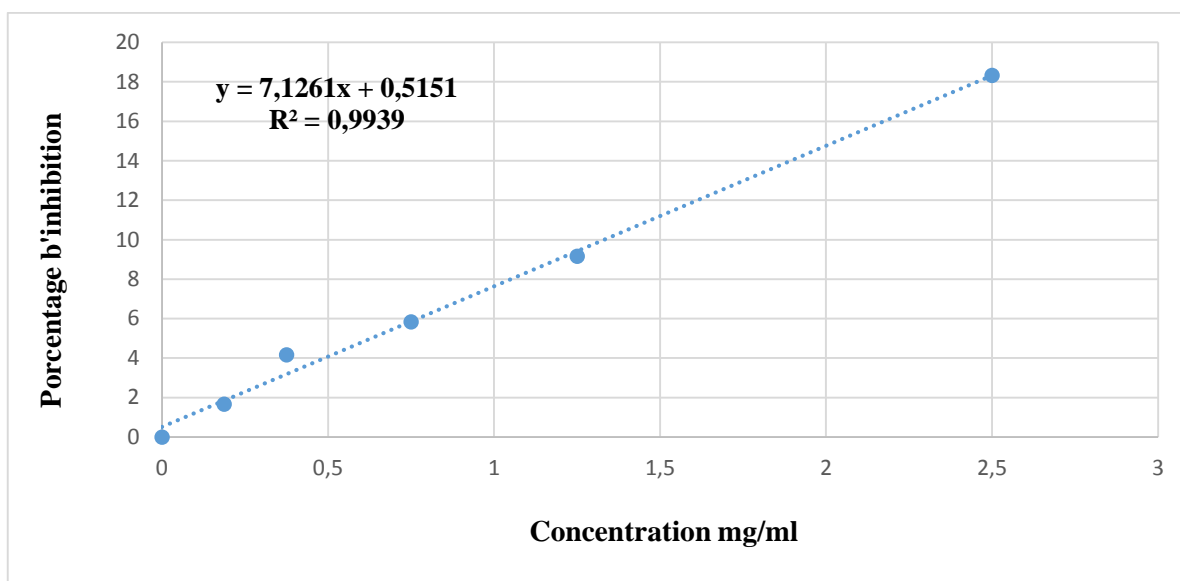


Figure 32 : pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène en fonction des concentrations de l'extrait brut.

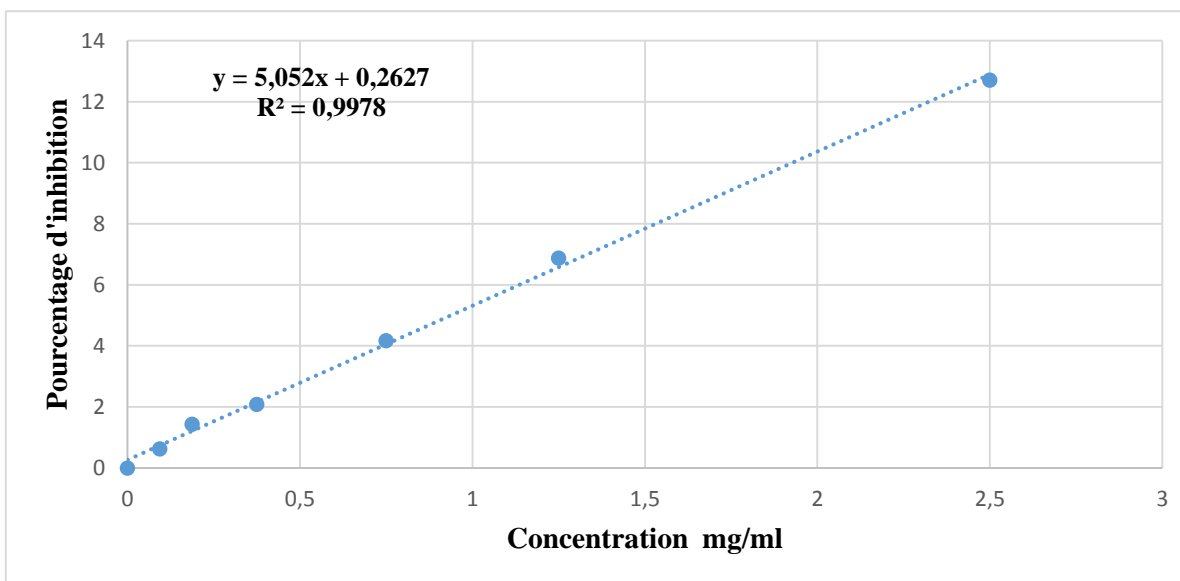


Figure 33 : pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène en fonction des concentrations de la fraction organique.

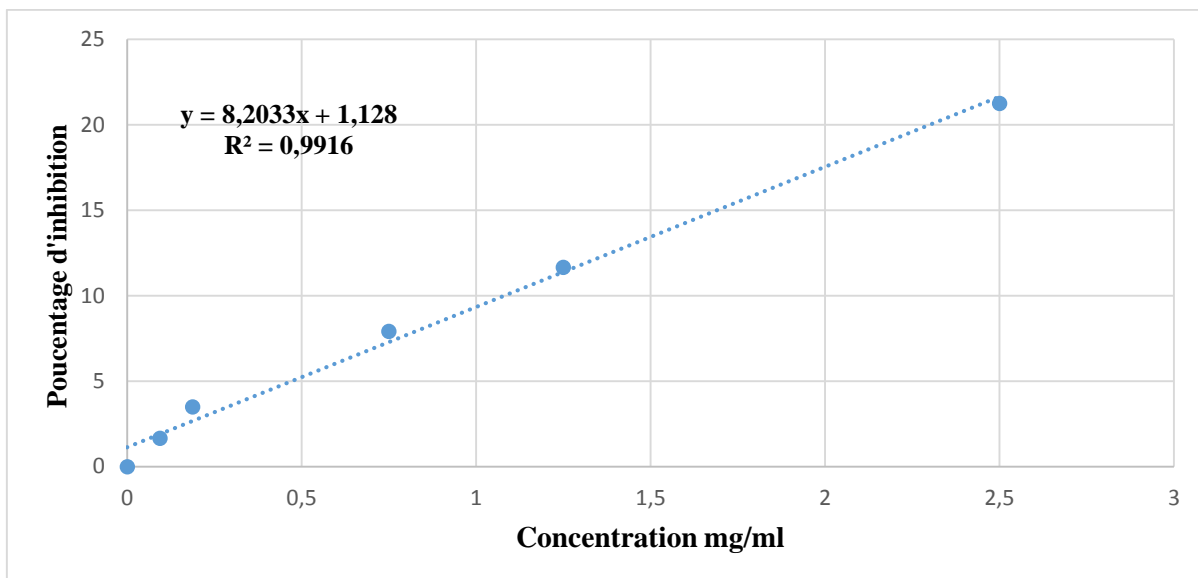


Figure 3 : pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β-carotène en fonction des concentrations de la fraction aqueuse.

L'extrait brut atteint un pourcentage d'inhibition de 5,83% à 0,75 mg/ml. A cette même concentration la fraction organique et aqueuse présentent des pourcentages d'inhibition de 4,16% et 7,91%, respectivement.

Le BHT présente la meilleure activité antioxydante par rapport aux extraits des fruits de l'arbousier où il produit un pourcentage d'inhibition de 41,26% à 0,75 mg/ml.

Les valeurs d'IC₅₀ montrent que les extraits étudiés présentent une faible activité antioxydante par rapport aux BHT.

Tableau 07 : valeur des IC₅₀ des différents extraits de fruit de l'arbousier et de BHT.

extraits	Extrait brut	Fraction organique	Fraction aqueuse	BHT
IC ₅₀ mg/ml	6,94	9,84	5,95	0,77

L'inhibition la plus élevée est fournie par le BHT suivie par la fraction aqueuse, l'extrait brut et en dernier la fraction organique.

Discussion

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement qui en dépendent, pour assurer leurs soins de santé primaires et leur subsistance. Ces communautés utilisent la plupart des espèces végétales, tant ligneuses qu'herbacées, comme médicaments. Les plantes médicinales demeurent toujours une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement en l'absence d'un système médical moderne (Tabuti *et al.*, 2003).

L'objectif de notre étude est porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de fruits de l'arbousier : extrait eau-acétone, fraction organique et fraction aqueuse par trois méthodes : DPPH, FRAP et blanchissement de β -carotène.

Les extraits préparés à partir des fruits de l'arbousier ont fait l'objet de quelques tests phytochimiques classiques, dans le but de vérifier la présence ou l'absence de certains composés chimiques. Les résultats obtenus ont révélés la présence des flavonoïdes et tanins dans les trois extraits, résultats confirmés par les études de Dib *et al.*, (2013), ainsi que la présence des acides aminés dans l'extrait brut et la fraction organique où ils sont absents dans la fraction aqueuse. Medjdoub *et al.*, (2014) a montré la richesse des racines de l'arbousier en acides aminés.

Les sucres sont les constituants les plus importants du fruit d'*A.unedo* L. ces fruits constitueraient une source non négligeable de sucres où on trouve 73.2 % dans l'extrait brut, 26% et 21% dans les fractions, organique et aqueuse, respectivement. Les résultats trouvés dans les fractions sont proche de ceux trouvés par Favier *et al.*, 1993 (20g/100g) mais ils sont différents de ceux trouvés par Ruiz-Rodríguez *et al.*, (2011) et Baross *et al.*,(2010) où ils sont trouvés (14,11 g/100g) et (40,55g/100g), respectivement.

Ces variations peuvent être dus à plusieurs facteurs tel que la charge de l'arbre, le stade de maturation et l'état physiologique du fruit lors de l'analyse (Ayaz *et al.*, 2000).

Dorais *et al.*, (2001), propose d'autres facteurs comme la teneur en minéraux des sols, la disponibilité de l'eau, la durée au soleil ainsi l'irrigation et la fertilisation peuvent influencer sur le niveau des sucres des fruits.

D'après Sawaya *et al.*, (1983), Nixon et Carpenter, (1978) et Munier, (1973), les sucres varient en fonction du climat et du stade de maturation.

Parallèlement aux tests phytochimiques nous avons déterminés les taux de polyphénols et de flavonoïdes totaux dans les extraits préparés.

La teneur en polyphénols est élevée dans la fraction organique (26,1 %) suivi par la fraction aqueuse (21,3 %) et finalement l'extrait brut (14,6 %) où cette valeur est hautement supérieure de celle trouvé par (Orak *et al.*, 2011), 14,29 µg, GAE/g dans l'étude de polyphénols des fruits fraîche.

Nos résultats sont proche de celle trouvés par Barosss *et al.*, (2010) (126,83 mg GAE/g). alors qu'ils sont nettement supérieure à ceux de Fortalezas *et al.*, (2010), Doukani et Tabak., (2015) et par Şeker et Toplu, (2010) qui sont trouvés des valeurs de $16,46 \pm 3,66$ mg GAE/g, $17,025 \pm 0,148$ mg GAE/g et $26,75 \pm 9,05$ mg GAE/g respectivement.

En comparant le taux de polyphénols de notre fruit avec des autres fruits sauvage considérés comme des fruits riches en polyphénols on constate que la teneur en polyphénols d'*Arbutus unedo* est très proche à celle de *Rosa canina* L (143,17mg GAE/g) par contre ils sont supérieure celle de *Prunus spinosa* L. (83,40mg GAE/g) (baross *et al.*, 2010).

Par ailleurs les flavonoïdes présentent des teneurs proches dans l'extrait brut et la fraction organique (2,3g/100g et 2,1g/100g, respectivement) et sont plus disponibles dans la fraction aqueuse avec un teneur de 5,6g/100g.

Nos résultats sont hautement superieurs par rapport i à ceux déterminés par Pallauf *et al.*, (2008) et par García-Alonso *et al.*, (2004) où ils ont trouvés 32,37g/100g et 55,3g/100g, respectivement, et aussi par rapport à ceux trouvés par Maleš *et al.*, (2006) avec un teneur de 0.10 ± 0.02 g/100g.

Cette différence en teneur des flavonoïdes peut être due à l'organe de la plante étudié, la date de collecte ou de la localité Maleš *et al.*,(2006).

Plusieurs méthodes sont utilisés pour évaluer l'activité antioxydante in vitro telque le piégeage de radical peroxyde ROO• par la méthode TRAP (Total Radical-Trapping Antioxydant Parameter) et ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Réduction du radical DPPH et autres.

Concernant le test du DPPH en comparant les IC₅₀ des différents extraits testés des fruits d'*A. unedo* par rapport à celle de l'acide ascorbique, nous remarquons que l'activité antiradicalaire de tous nos extraits est inférieure à la capacité du piégeage du radical DPPH• de la substance de référence (0,00069 mg/ml). Cette capacité est plus importante dans la fraction organique (0,121 mg/ml) suivi par l'extrait brut (0,292mg/ml) et la fraction aqueuse (0,361 mg/ml), Il est possible que la forte activité de la fraction organique est attribuée à sa richesse aux polyphénols.

Nos extraits présentent une bonne activité par rapport à celle de Baross *et al.*, 2010 (0,81 mg/ml). Les extraits de fruits d'*A. unedo* ont révélés une activité antioxydante (Miguel *et al.*, 2014)

Mendes *et al.*, (2011) ont étudié l'activité antioxydante de fruit de l'arbousier par la méthode du piégeage de radical DPPH•, les résultats ont montrés une activité faible par rapport à nos extraits avec une IC₅₀ de 0,790 ± 0,016 mg/ml.

Pallauf *et al.*, (2008)ont montrés que les fruits d'*A. unedo* L peuvent être une bonne source d'antioxydants comme flavonoïdes, vitamines C, caroténoïdes liposolubles et vitamine E.

Oliveira *et al.*, (2011) ont étudié la capacité des fruits murs de l'arbose récoltetes en novembre 2009 dans Portugal sur le radical DPPH• , les résultats ont montrés une activité proche de nos résultats avec une valeur d'IC₅₀ de 0,25 ± 0,02 mg/ml.

Miguel *et al.*, (2014) ont étudié l'activité antioxydante par la méthode de piégeage de DPPH• des fruits de l'arbousier rouges et jaunes, les résultats ont montré que les fruits rouges présentent une meilleur activité par rapport aux fruits jaunes avec des IC₅₀ de 0.409 mg/ml et 0.499 mg/ml, respectivement.

Concernant le test de réduction de fer (FRAP), la fraction organique présent une meilleure capacité de réduire le fer suivi par l'extrait brut et la fraction aqueuse mais ces capacités restent toujours inférieures à celle de la molécule de référence (acide gallique).

L'étude de Aksil, (2015), confirme nos résultat et montre que la fraction organique est la fraction qui présente la meilleure réduction par rapport aux autres extrait.

Pour confirmer la capacité antioxydante de fruits de l'arbousier, en plus de test de DPPH et FRAP nous avons réalisés aussi le test de blanchissement de β -carotène. La fraction aqueuse présente une meilleure capacité inhibitrice de l'oxydation de β -carotène suivi par l'extrait brut et la fraction organique avec des IC_{50} de 5,95mg/ml, 6,94mg/ml et 9,84mg/ml, respectivement. Ces valeurs restent toujours inférieure à celle de la molécule de référence le BHT, avec une IC_{50} de 0,63mg/ml.

Miguel *et al.*, (2014), les fruits d'*Arbutus unedo* présente une IC_{50} de 0,246mg/ml pour les fruits rouge et 0,328 mg/ml pour les fruit jaune. Cela pour le test de blanchissement de β -carotène.

Aussi Baross *et al.*, (2009) ont étudiés la capacité des fruits de l'arbousier à inhiber l'oxydation de β -carotène et ont trouvés une valeur d' IC_{50} de 0,77mg/ml.

Les résultats obtenus par Moualek *et al.*, (2016), concernant le test de blanchissement du β -carotène réalisé en présence de l'extrait aqueux des feuilles de l'arbousier montrent une inhibition de l'ordre de $87.04 \pm 1.21\%$ pour une concentration de 1 000 μ g/ml.

L'étude de Belkhatir (2017) sur la réduction du radical DPPH par l'extrait hydroacétonique des racines de l'arbousier par le test de piégeage a montré que l'extrait brut et la fraction aqueuse présentent une activité plus importante par rapport à de celle de l'acide ascorbique suivi par la fraction acétate d'éthyle avec des IC_{50} de 0,0014 ; 0,0032 ; 0,004 et 0,023 mg/ml respectivement. Parallèlement au test de piégeage de radical DPPH, un test de blanchissement du β -carotène a été réalisé où les résultats sont exprimés comme suit :

La fraction aqueuse et la fraction acétate d'éthyle ont montré une meilleure activité antioxydante par rapport à la molécule de référence, le BHT, suivi par la fraction eau-acétone avec des IC_{50} de : 0,061 ; 0,094 ; 0,098 et 0,19 mg/ml respectivement. Il ressort de ces résultats que les racines de l'arbousier sont plus efficaces par rapport aux fruits.

Les travaux de Belfekih *et al.*, (2017) montrent la présence de plusieurs métabolites secondaires au niveau de différents organes d'*Arbutus unedo* L. Les alcaloïdes présents au niveau de toute la plante avec des proportions élevés au niveau des fruits, ainsi que la présence des tanins, des flavonoïdes, Coumarines, Caroténoïdes, Composés réducteurs Saponines, Stérols et tri terpènes. Cette richesse en métabolites secondaires peut être la cause de l'activité de cette plante surtout qu'elle contient des pourcentages élevés en composés phénoliques.

A la lumière de ce modeste travail nous pouvons constater une richesse en composés phénoliques, polyphénols et flavonoïdes.

Le fruit de l'arbousier est doué d'une activité antioxydante très remarquable

Conclusion

Notre travail a pour objectif d'évaluer l'activité antioxydante des fruits de l'arbousier, *Arbutus unedo* L. C'est une plante médicinale de la famille des Ericaceae et qui constitue une source intéressante de substances bioactives.

La plante est récoltée au mois de décembre 2017 de la région de Tizi, commune de Ain Fezza, wilaya de Tlemcen.

Dans un premier temps nous avons effectué trois dosages : des sucres, des polyphénols et des flavonoïdes. Concernant le dosage des sucres, l'extrait brut contient plus de sucres par rapport aux autres extraits suivi par la fraction organique puis la fraction aqueuse où ils présentent des valeurs de 73,2% ; 26% et 21%, respectivement.

La teneur en polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle que l'extrait brut d'*Arbutus unedo* et ses fractions, organique et aqueuse contiennent : 14,6 ; 26,1 et 21,3 % respectivement. Il ressort de ces résultats que la fraction organique est la plus riche en polyphénols.

Les teneurs en flavonoïdes de l'extrait brut, la fraction organique et la fraction aqueuse sont de l'ordre de : 2,3 ; 2,1 et 5,6 % respectivement ce qui montre que la fraction aqueuse contient plus de flavonoïdes par rapport aux autres extraits.

L'activité antioxydante des fruits d'*Arbutus unedo* a été évaluée par trois techniques : le piégeage du radical DPPH, le pouvoir réducteur de fer (FRAP) et la technique de blanchissement du β -carotène. Pour la première technique, la fraction organique montre l'activité la plus élevée avec une IC_{50} de 0,121 mg/ml suivie par l'extrait brut avec une IC_{50} de 0,292 mg/ml et la fraction aqueuse avec une IC_{50} de 0,361 mg/ml.

Pour la technique de réduction de fer (FRAP), les résultats montrent que tous nos extraits ont une capacité de réduire le fer qui est nettement inférieure à celle de l'acide gallique. Nous pouvons conclure que la fraction organique a la capacité réductrice la plus élevée par rapport à l'extrait brut et la fraction aqueuse ; une efficacité qui reste toujours inférieure à celle de l'acide gallique.

Concernant la technique de blanchissement du β -carotène, les résultats montrent que tous les extraits ont une activité inhibitrice de l'oxydation du β -carotène nettement inférieure à celle du BHT qui montre une IC_{50} de 0,77 mg/ml. La fraction aqueuse présente la meilleure

activité inhibitrice du blanchissement de β -carotène avec une IC_{50} de 5,95 mg/ml suivie par l'extrait brut avec une IC_{50} de 6,94 mg/ml et finalement la fraction organique avec un IC_{50} de 9,84 mg/ml.

A la lumière de ces résultats, cette étude préliminaire nécessite d'autres recherches qui s'intéressent à :

- ✓ Approfondir l'analyse phytochimique et chromatographique pour isoler et identifier les molécules actives des fruits de l'arbousier.
- ✓ Evaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes *in vitro*: ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), et ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique).
- ✓ Evaluer l'activité antioxydante par d'autres méthodes *in vivo*.
- ✓ Etudier d'autres activités biologiques ; comme antimicrobienne,

Références bibliographiques

- Achat, S. (2013, November). Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Avignon.
- Aksil, T. (2015). *Caractérisation physico-chimique du fruit de l'arbousier (Arbutus unedo L.) du nord Algérien et de la datte (Phoenix dactylifera L.) du nord Algérien et de la datte (Phoenix dactylifera L.)* (Doctoral dissertation).
- Anonyme: <http://herbierdicietdailleurs.eklablog.com/arbutus-unedo-arbousier-a47460722>.
- Anonyme1 : <https://www.arkive.org/bladder-dock/rumex-vesicarius>
- anonyme2 : <https://www.biolib.cz/en/image/id128053>
- anonyme3 : <http://antropocene.it/en/2018/03/14/cuminum-cyminum>
- anonyme4 : http://fr.hortipedia.com/wiki/Cedrus_atlantica.
- Aouadhi, S. (2010). Atlas de risques de la phytothérapie traditionnelle à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. *Mém. Mas. en toxicologie. Faculté de médecine de Tunisie*.
- Arteel, G. E., & Sies, H. (2001). The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10(4), 153-158.
- Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S. (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminum cyminum L. *Lebanese Science Journal*, 11(1), 69-81.
- Avaramo A.. (2003)- Pphysio-chemistry of strawberry tree characterisation. *Nature and technology*, 53 (2) : 81-102.
- Ayaz, F. A., Kucukislamoglu, M., & Reunanen, M. (2000). Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (Arbutus unedo L. var. ellipsoidea) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(2), 171-177.
- Badouard, C. (2006). *Les lésions des acides nucléiques: détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *médecine/sciences*, 22(3), 266-272.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food chemistry*, 120(1), 247-254.
- Baytop, T. (1984). *Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün)* (No. 40). İstanbul Üniversitesi.

- Belfekih, F., El Yahyaoui, O., Chleh, M., Abdellahi, L. O., Sammama, A., & Aicha, L. Screening Phytochimique d'*Arbutus unedo* L.
- Benbrook, C. M. (2005). *Elevating antioxidant levels in food through organic farming and food processing*. Organic Center.
- Beniston, N. T., & Beniston, W. S. (1984). Fleurs d'Algérie. *Alger: Entreprise Nationale du Livre 359p.-col. illus.. Fr Icones. Geog, 1*.
- Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie, 12(6)*, 364-371.
- Bessam, F. Z., Mehdadi, Z., Lizard, G., Djellouli R. (2017). Study of the antioxidant activity of the extracts of the achenes of *Sylibum marianum* L. *Journal of Biochemistry International. 3(2)* : 63-72.
- Blumberg, J. B., & Frei, B. (2007). Why clinical trials of vitamin E and cardiovascular diseases may be fatally flawed. Commentary on "The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans". *Free Radical Biology and Medicine, 43(10)*, 1374-1376.
- Botineau, M. (2010). *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Tec & doc.
- Boudy, P. (1950). *Economie forestière Nord-africaine-Tome 2: monographies et traitements des essences forestières*.
- Bouras Fatima Zohra et Houchi Abdelbasset. (2013) *Étude de l'activité antioxydante de la plantes Rumex Vesicarius* (Doctoral dissertation).
- Bouzid, A., Chadli, R., & Bouzid, K. (2017). Étude ethnobotanique de la plante médicinale *Arbutus unedo* L. dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale. *Phytothérapie, 15(6)*, 373-378..
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology, 28(1)*, 25-30.
- Bremness, L. (2002). *Plantes aromatiques et médicinales*. Bordas (éd.), Paris, 303 p.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*. 3^{ème}Ed Tec et Doc.

- Cavin, A. (1999). *Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: "Tinospora crispa"(Menispermaceae)," Merremia emarginata"(Convolvulaceae) et" Orophea enneandra"(Annonaceae).*
- Celikel, G., Demirsoy, L., & Demirsoy, H. (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 118(2), 115-119.
- Charpentier, B., Hamon-Lorleac'h, F., Harlay, A., & Ridoux, L. (2008). *Guide du préparateur en pharmacie*. Elsevier Masson.
- Chea, A. (2006). *Ethnopharmacologie de plantes traditionnellement utilisées au Cambodge dans le traitement de la malaria et des maladies infectieuses: application à trois plantes antipaludiques Erioglossum edule Blume [Lepisanthes rubiginosa (Roxb.) Leenh.], Stephania rotunda Lour, Vernonia cinerea Less* (Doctoral dissertation, Aix Marseille 2).
- Chemali, A., & Belkacem, N. E. (2017). Evaluation de l'activité antioxydante et de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique d'une plante médicinale locale.
- Choe, E., & Min, D. B. (2005). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Journal of food science*, 70(9).
- Correia, A. V., & Oliveira, Â. C. (1999). *Principais espécies florestais com interesse para Portugal: zonas de influência mediterrânica*. DGF.
- Couplan, F., & Styner, E. (1994). *Guide des plantes sauvages, comestibles et toxiques*. Lausanne: Delachaux et Niestle 415p.-illus., col. illus.. ISBN 2603009524 *En Icones. Plant records. Text by F. Couplan, illustrations by E. Styner. Geog, 1*.
- Crozier A. (2003). Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants' Diet and Health'*. Ed. Goldberg. pp: 27- 48.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A., & Linssen, J. P. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(1), 140-146.
- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*, 50(4-5), 279-289.
- Debuigne, G., & Couplan, F. (2009). *Petit Larousse des plantes médicinales*. Larousse.
- DEHAK, K. (2013), *Méthodes d'extraction et de séparation des substances naturelles* (Doctorat de Chimie : Analyse physicochimique et réactivité des espèces moléculaire, Université KASDI Merbah Ouargla).

- Dhandapani, S., Subramanian, V. R., Rajagopal, S., & Namasivayam, N. (2002). Hypolipidemic effect of *Cuminum cyminum* L. on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacological research*, 46(3), 251-255.
- Diallo, A. (2005). *Etude de la phytochimie et des activités biologiques de Syzygium guineense Willd.(Myrtaceae)* (Doctoral dissertation, Thèse. Université de Bamako, Mali: Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odoto-Stomatologie).
- Dib, M. E. A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N., & Tabti, B. (2013). Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(4), 381-385.
- Dif, M. M., Benchiha, H., Mehdadi, Z., Benali-Toumi, F., Benyahia, M., & Bouterfas, K. (2015). Étude quantitative des polyphénols dans les différents organes de l'espèce *Papaver rhoeas* L. Quantification study of polyphenols in different organs of *Papaver rhoeas* L. *Phytothérapie*, 13(5), 314-319.
- Dorai, M., Papadopoulos, A., & Gosselin, A. (2001). Influence of electric conductivity management on greenhouse tomato yield and fruit quality. *Agronomie*, 21(4), 367-383.
- Doukani, K., & Tabak, S. (2015). Profil Physicochimique du fruit "Lendj" (*Arbutus unedo* L.). *Nature & Technology*, (12), 51.
- Duval, C., & Duval, R., (1948) : *Dictionnaire de la chimie et ses applications* 3^{ème} Ed 11, Rue LAVOISIER, F 75008 Paris, 1087.
- El Haouari, M., López, J. J., Mekhfi, H., Rosado, J. A., & Salido, G. M. (2007). Antiagregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *Journal of ethnopharmacology*, 113(2), 325-331.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108.
- Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpão, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P. M., ... & Santos, C. N. (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2(2), 214-229.
- Garait, B. (2006). *Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin®* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- García-Alonso, M., de Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food chemistry*, 84(1), 13-18.
- Godet J.D., 2004. *Arbres et arbustes aux quatre saisons : 270 espèces d'arbres et arbustes et plus de 1600 photographies*. Ed. Delachaux et Niestlé, Paris, 215p.

- Godinho-Ferreira, P., Azevedo, A., & Rego, F. (2005). Carta da tipologia florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana*, 13(1), 1-34.
- Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- Guillaume, D., & Charrouf, Z. (2005). Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*). *Cahiers Agricultures*, 14(6), 509-516.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonen, M., & Moilanen, E. (2007). Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*, 2007.
- Hampikian, S. (2010). *Cueillettes sauvages sans risques: baies, plantes, champignons*. Terre vivante.
- Harborne, A. J. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Springer science & business media.
- Hartmann, A., & Niess, A. M. (1998). Oxidative DNA damage in exercise. *Pathophysiology*, 1001(5), 112.
- Hennebelle, T. (2006). *Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants: Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota pseudodictamnus (Lamiacées) et Lippia alba (Verbénacées)* (Doctoral dissertation, Lille 1).
- Hummer, K. A., Caraon, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract. *J. Appl. Microbiol*, 86(6), 985-990.
- Isérin, P., Masson, M., & Kedellini, J. P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, Identifications, Préparations. *Soins*.
- Karagözler, A. A., Erdağ, B., Emek, Y. Ç., & Uygun, D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.
- Karumi, Y., Onyeyili, P. A., & Ogugbuaja, V. O. (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3), 179-182.

- Kennedy, C. H., Montagnier, L., Olivier, R., & Pasquier, C. (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1538-1538.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- Kumaran, A. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food chemistry*, 97(1), 109-114.
- Kweon, M. H., Hwang, H. J., & Sung, H. C. (2001). Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4646-4655.
- Kweon, M. H., Hwang, H. J., & Sung, H. C. (2001). Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4646-4655.
- Linden, G., & Lorient, D. (1994). *Biochimie agro-industrielle*. Masson.
- Liu, L., Sun, Y., Laura, T., Liang, X., Ye, H., & Zeng, X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of kudingcha made from *Ilex kudingcha* CJ Tseng. *Food Chemistry*, 112(1), 35-41.
- Lomani Kapepula, (2005): *Contribution à l'étude phytochimique de leptonychiatakona (sterculiacene) plantes en médecine traditionnelle*. Mémoire inédit, Faculté des Sciences, UNIKIS.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. PPUR presses polytechniques.
- Maleš, Ž., Plazibat, M., BILUŠIĆ VUNDAĆ, V. J. E. R. A., & Žuntar, I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree-*Arbutus unedo* L.(Ericaceae). *Acta Pharmaceutica*, 56(2), 245-250.
- Mariod, A. A., Ibrahim, R. M., Ismail, M., & Ismail, N. (2009). Antioxidant activity and phenolic content of phenolic rich fractions obtained from black cumin (*Nigella sativa*) seedcake. *Food Chemistry*, 116(1), 306-312.
- McClintock, D. (2005). *Guide des plantes à fleurs, des arbres et des arbustes d'Europe occidentale*. Delachaux et Niestlé.

- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968–1988). *Free Radical Biology and Medicine*, 5(5-6), 363-369.
- MEDJAOUI BELKHATIR, A. M. E. L. *Étude de l'activité antioxydante de l'extrait hydroacétonique des racines de l'Arbutus unedo de la région de Tlemcen* (Doctoral dissertation).
- Medjdoub, H., Selles, C., Tabti, B., Preliminary phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. and antihyperglycemic effect of the root aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Journal of chemical and pharmaceutical research*. 2014 ;6 (11) : 195-1.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., & Carvalho, M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2285-2291.
- Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C., & Antunes, M. D. (2014). *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules*, 19(10), 15799-15823.
- Montagnier L., Olivier R., Pasquier C., (1998). Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases, *Marcel Dekker, New York*
- Moualek, I., Aiche, G. I., Guechaoui, N. M., Lahcene, S., & Houali, K. (2016). Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 937-944.
- Nelson, S. K., Bose, S. K., & McCord, J. M. (1994). The toxicity of high-dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(2), 195-200.
- Nixon, R. W., & Carpenter, J. B. (1978). *Growing dates in the United States* (No. Folleto 1381).
- Nzungue, Y. (2008). *Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc: place des métallothionéines et de p53* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro, R., Casal, S., Bento, A., & Pereira, J. A. (2011). Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(5), 1401-1407.
- Orak, H. H., Aktas, T., Yagar, H., Isbilir, S. S., Ekinci, N., & Sahin, F. H. (2011). Antioxidant activity, some nutritional and colour properties of vacuum dried strawberry

- tree (*Arbutus unedo* L.) fruit. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 10(3), 331-338.
- Oubre, A. Y., Carlson, T. J., King, S. R., & Reaven, G. M. (1997). From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. *Diabetologia*, 40(5), 614-617.
 - Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
 - Pallauf, K., Rivas-Gonzalo, J. C., Del Castillo, M. D., Cano, M. P., & de Pascual-Teresa, S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(4), 273-281.
 - Pan, Y. Z., Gao, W., & Yu, A. M. (2009). MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. *Drug metabolism and disposition*, 37(10), 2112-2117.
 - Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Saavedra, G., Murcia, M. A., ... & Codina, C. (2003). Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sciences*, 73(13), 1667-1681.
 - Paris, M., Hurabielle, M., & Paris, R. R. (1981). *Abrégé de matière médicale: Monographies (2. partie): plantes actives sur le système nerveux, sur l'appareil digestif, plantes cardiotoniques, plantes antiparasitaires, plantes insecticides, antibiotiques et antitumoraux d'origine végétale*. Masson.
 - Patel Rajesh, M., & Patel Natvar, J. (2011). In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 1, 52-68.
 - Pawlowska, A. M., De Leo, M., & Braca, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L.(Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10234-10238.
 - Pawlowska, A. M., De Leo, M., & Braca, A. (2006). Phenolics of *Arbutus unedo* L.(Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10234-10238.
 - Pelli, K., & Lyly, M. (2003). *Les antioxydants dans l'alimentation*. Institut national de la recherche agronomique.
 - Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.

- Pryor, W. A. (1987). The involvement of free radicals in chemical carcinogenesis. In *Anticarcinogenesis and radiation protection*(pp. 1-9). Springer, Boston, MA.
- Reynaert, N. L., Aesif, S. W., McGovern, T., Brown, A., Wouters, E. F., Irvin, C. G., & Janssen-Heininger, Y. M. (2007). Catalase overexpression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. *The Journal of Immunology*, 178(6), 3814-3821.
- Rezaire, A. (2012). *Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa)* (Doctoral dissertation, Antilles-Guyane).
- Richard, M. J., Belleville, F., Chalas, J., Ceballos-Picot, I., Vitoux, D., Boyer, M. J., ... & Favier, A. (1997). Glutathione peroxidases: value of their determination in clinical biology. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 55, No. 3, pp. 195-207).
- Richter, G. (1993). *Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie*.
- Ruiz-Rodríguez, B. M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., ... & Tardío, J. (2011). Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, 44(5), 1244-1253.
- Saiedirad, M. H., Tabatabaeifar, A., Borghei, A., Mirsalehi, M., Badii, F., & Varnamkhasti, M. G. (2008). Effects of moisture content, seed size, loading rate and seed orientation on force and energy required for fracturing cumin seed (*Cuminum cyminum* Linn.) under quasi-static loading. *Journal of Food Engineering*, 86(4), 565-572.
- Santo, D. E., Galego, L., Gonçalves, T., & Quintas, C. (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47(1), 45-50.
- Sawaya, W. N., Khalil, J. K., Safi, W. N., & Al-Shalhat, A. (1983). Physical and chemical characterization of three Saudi date cultivars at various stages of development. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 16(2), 87-92.
- Şeker, M., & Toplu, C. (2010). Determination and comparison of chemical characteristics of *Arbutus unedo* L. and *Arbutus andrachnae* L.(family Ericaceae) fruits. *Journal of medicinal food*, 13(4), 1013-1018.
- Sen, C., Packer, L., & Hänninen, O. (Eds.). (2000). *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Elsevier.

- Shanlin, F. U., STOCKER, R., & DAVIES, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324(1), 1-18.
- Sohal, R. S., Mockett, R. J., & Orr, W. C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis 1, 2. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 575-586.
- Su, M. S., Shyu, Y. T., & Chien, P. J. (2008). Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chemistry*, 111(4), 892-896.
- Sugita, K., Ouchi, J., Okajima, T., & Watanabe, H. (2004). Topical non-steroidal anti-inflammatory agents containing essential oils and body-warming substances. *Jpn. Kokai Tokyo. JP, 2004175723*, A2.
- Swain, T., & Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I.— The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 63-68.
- Tabuti, J. R. S., Lye, K. A., & Dhillon, S. S. (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), 19-44.
- Tlandrum, J. O. H. N., Bone, R. A., Joa, H., D KILBURN, M. A. R. K., MOORE, L. L., & SPRAGUE, K. E. (1997). A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Experimental eye research*, 65(1), 57-62.
- Torres, J. A., Valle, F., Pinto, C., García-Fuentes, A., Salazar, C., & Cano, E. (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology*, 160(2), 207-223.
- Tutin, T. G., HEYWOOD, V. H., Burges, N. A., VALENTINE, D. H., WALTERS, S. M., & WEBB, D. A. (1964). Flora Europaea. Vol. 1. Lycopodiaceae to Platanaceae. *Flora Europaea. Vol. 1. Lycopodiaceae to Platanaceae*.
- Vertuani, S., Angusti, A., & Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current pharmaceutical design*, 10(14), 1677-1694.
- Vican, P. (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales*. Larousse (éd.), Paris, 355p
- Vidrih, R., Hribar, J., Prgomet, Ž., & Poklar Ulrih, N. (2013). The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Croatian journal of food science and technology*, 5(1), 29-33.
- Wassmann, S., Wassmann, K., & Nickenig, G. (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 44(4), 381-386.