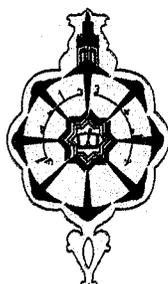


Doc/547-24/02.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCEM – FACULTE DES SCIENCES -
DEPARTEMENT DE CHIMIE

30 JUIN 2008
3259



THESE
Pour l'obtention du diplôme
DE DOCTORAT ES SCIENCES
Option : **CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE**

Ensc
Tabti

THEME

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE
DE QUELQUES POLYPHENOLS PRESENTS DANS
ARBUTUS UNEDO L.

Présenté par : M^r **DIB MOHAMED EL AMINE**

Devant le jury composé de:

M ^r JOSEPH KAJIMA MULENGI	Professeur	UABB Tlemcen	Président
M ^r JEAN COSTA	Professeur	Université de Corse –Pascal Paoli- (France)	Examineur
M ^r DRISS AINAD TABET	Professeur	Université de Sidi Bel Abbès	Examineur
M ^r ABDEREZZAK MESLI	Professeur	Université de Sidi Bel Abbès	Examineur
M ^r BOUFELDJA TABTI	Professeur	UABB Tlemcen	Promoteur
M ^r HOCINE ALLALI	Maitre de Conférence	UABB Tlemcen	Co-promoteur
M ^{me} FOUZIA ATIK	Professeur	UABB Tlemcen	Invitée

Année universitaire 2007/2008

Remerciements

Ce travail a été effectué au laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA) de l'université -Abou Bekr Belkaïd- Tlemcen dirigé par le Professeur
JOSEPH KAJIMA MULENGI

Je tien à remercier :

Monsieur BOUFELDJA TABTI, Directeur de thèse
Professeur à l'Université -Abou Bekr Belkaïd- Tlemcen
&

Monsieur HOCINE ALLALI, Co-promoteur
Maitre de Conférences à l'Université -Abou Bekr Belkaïd- de Tlemcen

qui, durant ces six années, ont bien voulu diriger mes travaux de thèse, en me faisant bénéficier de leur expérience, leur compétence et encouragement.

Monsieur J. KAJIMA MULENGI
Professeur à l'Université -Abou Bekr Belkaïd- Tlemcen

Monsieur J. COSTA
Professeur à l'Université de Corse -Pascal Paoli- (France)

Monsieur D. AINAD TABET
Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbès

Monsieur A. MESLI
Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbès

qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et siéger le jury.

En témoignage de ma reconnaissance et respectueuse gratitude

Je tiens à remercier :

- Le professeur GHALEM SAID :

Pour ses conseils et encouragements pendant les moments difficiles.

- Le Docteur ALLALI HOCINE :

Pour son aide, ses encouragements et son souci pour le travail bien fait. Puisse Dieu vous assister toujours et vous aide à réaliser vos projets.

- Le Docteur BENDAHOU MOURAD :

Pour nous avoir permis de réaliser les activités antifongiques.

- Le Professeur BENABADJI BAKIR et son équipe, pour la réalisation des tests d'activité antibactérienne.

- Le Docteur JACQUES SUSPERREGUI :

Pour sa gentillesse, sa grande compétence dans le domaine de la RMN et sa contribution à l'élucidation structurale des composés.

- Monsieur BENDIABDELLAH DJAMEL :

Pour sa gentillesse, sa disponibilité et la réalisation des analyses infrarouge et les analyses élémentaires.

- Messieurs BOUFATAH MOURAD, KHALDI BOUMEDIENNE et SAFI BENLIMANE NOUR EDDINE :

Pour leur aide précieuse et leur gentillesse.

Je ne saurais oublier tous nos collègues du Département de Chimie et du Laboratoire (COSNA) avec qui nous avons toujours su entretenir une ambiance chaleureuse et amicale.

- A tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin.

Dédicaces

A ma mère

A ma femme

A mes enfants Riad, Zineb et Lotfi

A la mémoire de mon père. Les mots me manquent pour t'exprimer toute ma reconnaissance.

Je n'oublierai jamais tes conseils, tes bénédictions et surtout tes sacrifices consentis à mon égard. Tu as su m'inculquer les vertus du travail bien fait, l'amour du proche et l'humilité.

A toute la famille

Table des matières

	Page
Introduction générale	01
Chapitre I : Les Vertus des Plantes Médicinales	04
I.1. Plantes médicinales.....	04
I.2. Propriétés médicinales des plantes.....	04
I.3. Principales substances curatives des plantes médicinales.....	05
Références Bibliographiques.....	06
Chapitre II : Etude Botanique - <i>Arbutus unedo</i> L. (Ericacées)	07
II.1. Introduction.....	07
II.2. Systématique des Ericacées.....	07
II.3. Famille de l'arbutus et répartition géographique.....	07
II.4. <i>Arbutus unedo</i> L. (Arbousier).....	11
4.1. Histoire et tradition.....	11
4.2. Classification botanique.....	11
4.3. Description botanique.....	12
4.4. Propriétés et usages.....	13
4.5. Recommandations.....	13
4.6. Principes chimiques.....	13
Références Bibliographiques.....	14
Chapitre III : Les polyphénols Végétaux	15
III.1. Introduction.....	15
III.2. Activités biologiques des polyphénols.....	15
III.3. Structures chimiques des polyphénols.....	17
3.1. Les composés non-flavonoïdes.....	17
3.2. Les flavonoïdes.....	18
Références Bibliographiques.....	22
Chapitre IV : Etude Bibliographique sur <i>Arbutus unedo</i> L.	26
IV.1. Introduction.....	26
IV.2. La chimie de <i>Arbutus unedo</i> L.....	26
2.1. Les flavonoïdes.....	26
2.2. Les anthocyanes.....	27
2.3. Les composés phénoliques.....	28
2.4. Composition chimique des fruits de <i>Arbutus unedo</i> L.....	29
2.5. Acide organique des fruits de <i>Arbutus unedo</i> L.....	30
2.6. Teneurs en minéraux.....	31
2.7. Composés aromatiques dans le miel des fruits de <i>Arbutus unedo</i> L.....	32
2.8. Composition de l'huile essentielle de <i>Arbutus unedo</i> L.....	34
IV.3. Activités biologiques des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> L.....	35
Références Bibliographiques.....	37
Chapitre V : Les plantes & l'activité antimicrobienne	39
V.1. Introduction.....	39
V.2. Activité antimicrobienne des plantes.....	39
2.1. Principaux groupes de composés antimicrobiens des végétaux.....	39
2.2. Quelques exemples de la littérature.....	41
Références Bibliographiques.....	44

	Page
Chapitre VI : Etude Chimique & biologique de <i>Arbutus unedo</i> L.....	47
VI.1. Introduction.....	47
VI.2. Etude chimique.....	47
2.1. Examen phytochimique de <i>Arbutus unedo</i> L.....	47
2.2. Dégraissage du matériel végétal.....	56
2.3. Analyse par CLHP des extraits bruts des tiges et des racines.....	58
2.4. Fractionnement des tanins polymériques des racines par ESI-MS.....	60
2.5. Extraction et caractérisation des proanthocyanidines.....	65
VI.3. Etude biologique.....	92
3.1. Introduction.....	92
3.2. Pouvoir antimicrobien des extraits bruts.....	92
3.3. Pouvoir antifongique des extraits en milieu solide.....	97
3.4. Conclusion.....	98
Références bibliographiques.....	99
Généralités.....	101
Chapitre VII : Partie expérimentale.....	103
VII.1. Screening phytochimique de <i>Arbutus unedo</i> L.....	103
1.1. Caractérisation des différentes familles de composés dans <i>Arbutus unedo</i> L.....	103
1.2. Dosage des saponosides.....	104
1.3. Dosages des flavonoïdes totaux.....	105
1.4. Dosage des anthocyanes.....	107
1.5. Dosage différentiel des flavones et des flavonols.....	108
VII.2. Dégraissage de la matière végétale.....	109
VII.3. Analyse des extraits bruts des tiges et des racines par CLHP.....	109
VII.4. Extraction et fractionnement des tanins polymériques des racines par ESI-MS.....	110
VII.5. Fractionnement des tanins par chromatographie sur colonne.....	111
5.1. Fractionnement des proanthocyanidines oligomériques des tiges.....	111
5.2. Analyses spectroscopiques.....	113
5.3. Fractionnement des proanthocyanidines des racines.....	114
5.4. Analyses spectroscopiques.....	116
VII.6. Etude du pouvoir antimicrobien et antifongique de <i>Arbutus unedo</i> L.....	117
6.1. Introduction.....	117
6.2. Provenance des germes.....	117
6.3. Effet antimicrobien des antibiotiques & des antifongiques.....	118
6.4. Méthodes employées pour l'étude de l'activité antibactérienne.....	119
6.5. Effet antifongique des extraits en milieux solide.....	120
Références bibliographiques.....	121
Conclusion générale.....	122
Annexe.....	124
Annexe 1 (spectre IR).....	
Annexe 2 (spectre de masse).....	

Abréviations & Acronymes

Ac	acétyle ou acyle
aq.	aqueux
ATB	antibiotique
ATF	antifongique
APG	Angiosperms phylogeny group (classification phylogénétique des angiospermes)
CMI	concentration minimale inhibitrice
CLHP	chromatographie liquide haute performance
CG/SM	chromatographie gazeuse couplé à la spectroscopie de masse
d	doublet
DMSO	diméthylsulfoxyde
DP	degré de polymérisation
EI	ionisation électronique
ESI-MS	electro spray ionisation = mass spectroscopy
g	gramme
h	heure
HSQC :	heteronuclear single quantum correlation
IR	infrarouge
KI	Indice de rétention
LDL	protéines de faible densité
m	massif
Me	méthyle
min	minute
MS	spectrométrie de masse
PR	pression réduite
q	quadruplet
Rdt	rendement
RDA	rétro Diels-Alder
RMN	résonance magnétique nucléaire
s	singulet
t	triplet
TA	température ambiante
T_f	température de fusion
TMS	triméthylsilyl
UV	ultra violet (lampe)

Introduction générale

Introduction générale

Cette dernière décennie le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu de manière spectaculaire partout dans le monde et a gagné en popularité. Non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans les systèmes de santé.

La médecine traditionnelle est l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques reposant rationnellement ou non, sur les théories, croyances et expériences propres à une culture, est pratiquée pour maintenir les êtres humains en bonne santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques et mentales.

La survie de l'Homme allait dépendre des plantes surtout parce que trois de ces acides gras vitaux ne sont présent que chez les plantes. Aujourd'hui alors que nous commençons à prendre conscience de nos corps et que nous rejetons les effets secondaires de certains médicaments modernes puissants, les plantes retrouvent leur place dans notre vie quotidienne [1].

L'usage de la médecine traditionnelle est très répandu en Afrique. Son accessibilité, sa disponibilité et sa popularité ne font l'ombre d'aucun doute, dans la mesure où environ 80 % d'africains y ont recours pour leurs besoins de santé. Par ailleurs, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 4000 sont des plantes médicinales, ce qui constitue 90 % de la médecine traditionnelle en Afrique [2].

Ces dernières années, plusieurs molécules isolées des plantes sont devenues des médicaments efficaces: citons par exemple le taxol issu de *Taxus baccata* L. (*Taxaceae*) pour ses propriétés anticancéreuses remarquables (cancer de l'ovaire et cancer du sein) et de l'artémisinine isolée d'*Artemisia annua* L. (*Asteraceae*) pour ses propriétés antipaludiques [2].

Les phytothérapeutes sont persuadés que la plante entière est plus efficace que la somme de ses constituants. Pour que le composant principal d'une substance végétale réalise tout son potentiel thérapeutique et agisse sur l'organisme sans susciter d'effets secondaires, il doit être associé à tous les composants secondaires inhérents à la plante. C'est le principe de synergisme, premier pilier de la phytothérapie [3].

Nous avons longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir l'origine de leur action bénéfique. L'isolement de principes actifs datant du XIX^{ème} siècle, en améliorant la connaissance des structures, a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule type [4].

L'étude de *Arbutus unedo* L., entrant précisément dans ce cadre, n'est pas exhaustive et comme il est utilisé sous forme de tisanes, extraits ou préparations complexes, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des polyphénols [5].

Notre étude est motivée, d'une part par le souci de valoriser et de promouvoir les plantes médicinales de la région de Tlemcen, en vue de faciliter l'accès des populations à des médicaments traditionnels améliorés à moindre coût et d'autre part par la nécessité d'objectiver ou d'infirmer les utilisations traditionnelles de *Arbutus unedo* L.

Au cours de cette recherche, nous nous sommes fixés comme objectifs principaux l'extraction de quelques proanthocyanidines contenus dans les racines et les tiges de *Arbutus unedo* L. et leur caractérisation par différentes méthodes spectroscopiques (RMN ¹H, ¹³C, IR, T_g, SM etc...). Ces investigations sont suivies d'une évaluation des activités antibactérienne et antifongique des extraits bruts obtenus par l'emploi de solvants de polarités différentes ou par des extraits purifiés par chromatographie sur colonne. Dans cette étude, des antibiotiques et des antifongiques dotés d'une activité reconnue sont pris comme références.

Références bibliographiques

- [1] S. Flemming, Le livre des herbes - Comment les cultiver, les identifier et les utiliser en cuisine, Ed. Chantecler, Belgique, 1991, p. 116.
- [2] K. Hostettmann, Tout savoir sur le pouvoir des plantes, source de médicaments, Ed. Fabre S A, Lausanne, Suisse, 1997, p. 235.
- [3] N. Bradford, Le guide des médecines complémentaires, Ed. Française Celiv, Paris, 1997, p.94.
- [4] C. Duraffourd, J. Lapra, R. Chemli, La plante médicinale de la tradition à la science, Ed. Grancher, 1997, p. 205-206.
- [5] A. Legssyer, A. Ziyyat, H. Mekhfi, M. Bnouham, C. Herrenknecht, V. Roumy, C. Fourneau, A. Laurens, J. Hoerter, R. Fischmeister, Tannins and Catechin Gallate Mediate the Vasorelaxant Effect of *Arbutus unedo* on the Rat Isolated Aorta, *Phytother. Res*, 2004, 18, 889-894.

Chapitre 1

Chapitre I : Les Vertus des Plantes Médicinales

I.1. Plantes médicinales

Au cours des siècles, nos ancêtres ont accumulé un véritable savoir sur les vertus médicinales des plantes. Tout le monde a entendu parler des remèdes de santé ou recettes grand-mère de nos grand-mères (ail, choux etc.) sous forme de cataplasme ou de décoction.

Une plante médicinale est une plante dont l'un des organes, par exemple la feuille, l'écorce ou racine possède des vertus curatives, et parfois toxiques selon son dosage.

Ainsi, il existe une pharmacopée dans chaque pays, sous forme de plantes médicinales inscrites à la pharmacopée et sont considérées comme des médicaments.

La phytothérapie est le traitement par les plantes (médecine parallèle ou traditionnelle), c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation par voie externe, de produits préparés à partir de plantes, sans passer par une étape de sélection des molécules. Nous ne consommons donc pas seulement le principe actif, mais tout ce que contient la plante. Il est important de ne pas confondre phytothérapie et phytopharmacie. Cette dernière désigne l'ensemble des substances utilisées pour traiter les plantes : pesticides, fongicides, herbicides, insecticides etc. [1].

I.2. Propriétés médicinales des plantes

De tout temps, nous connaissons les vertus curatives des plantes comme aussi bien leur degré de toxicité. C'est ainsi que le lin était déjà commun et cultivé en 4000 av. J.-C., et que la ciguë servit de moyen d'exécution en Perse et en Grèce (ainsi mourut le fameux philosophe Socrate en 399 av. J.-C.).

Aujourd'hui, à côté des médicaments fabriqués uniquement par synthèse chimique, d'autres sont obtenus par traitement chimique de substances naturelles, végétales le plus souvent ou animales, aussi il existe des remèdes purement naturels qui sont rarement d'origine animale (comme le miel) ou minérales (comme la tourbe médicinale) et qui proviennent presque exclusivement de plantes. Parmi celles-ci, seules certaines sont médicinales et la substance thérapeutique efficace n'est, en outre, logée que dans un certain organe déterminé, que l'on cueille alors à cet effet. Il arrive très rarement d'utiliser la plante entière [2].

Nous désignons sous le nom de drogue le produit de la préparation de la partie végétale cueillie.

I.3. Principales substances curatives des plantes médicinales

Les plantes synthétisent les éléments du sol et de l'atmosphère qu'elles absorbent par les racines et par les feuilles : l'eau, l'acide carbonique et les matières minérales et inorganiques. Le processus de base est l'assimilation photosynthétique du gaz carbonique, appelé simplement photosynthèse. Les premiers produits de la photosynthèse sont des substances à basse molécularité appelés métabolites primaires : les saccharides (sucres), puis les acides gras, les acides aminés. Ensuite sont produits les métabolites spécialisés. Certains possèdent des vertus thérapeutiques.

Parmi les métabolites primaires, les saccharides entrent dans la préparation des comprimés, servent de base aux mucilages. Certains acides aminés ne sont pas produits par l'organisme humain auquel ils sont pourtant indispensables et doivent donc être ingérés. Les métabolites contenant de l'iode assurent le bon fonctionnement de la glande thyroïde. Les plus complexes, comme l'insuline, forment la base des hormones ainsi que des antibiotiques. Les plus importants sont les protéines.

Parmi les métabolites spécialisés, les principaux sont :

- * les flavonoïdes, la rutine, qui renforcent les parois des capillaires sanguins,
- * les corps terpéniques (dérivés du terpène, parmi lesquels le menthol, le camphre, etc...). A noter que les corps terpéniques forment la base des stéroïdes que nous retrouvons dans de nombreuses vitamines,
- * les principes amers permettant la digestion des matières grasses,
- * les saponines (*sapo* = savon) sont utilisées comme expectorants et diurétiques,
- * les alcaloïdes à effets thérapeutiques nombreux mais qui peuvent être aussi des poisons mortels [3,4].

Références Bibliographiques

- [1] J. Raynaud, Prescription et conseil en phytothérapie, Collection Lavoisier, Edition TEC & DOC, Paris, 1993, ISBN : 2-7430-0766-4, p. 48-49.
- [2] M. Wichte, R. Anton, Plantes thérapeutiques. Tradition, Pratique Officinale, Sciences et Thérapeutique, Collection Lavoisier, éditeur : TEC & DOC, Strasbourg, décembre 2003, ISBN: 2-7430-0631-5, p. 306-308.
- [3] T. Cecchini, Encyclopédie des Plantes médicinales, Edition Vecchi, Paris, 1973, ISBN : 2-8414-1833-2, p. 176-177.
- [4] Y. Trouard Riolle, Plantes médicinales « Cueillette - Culture - Usage », Collection La Terre, Edition Flammarion, Paris, 1985, ISBN : 2-0807-0663-2, p. 90-96.

Chapitre II

Chapitre II : Etude Botanique

Arbutus unedo L. (Ericacées)

II.1. Introduction

La famille des Ericacées comprend plusieurs sous familles dont les Pyrolacées (*Chimaphila*, *Moneses*, *Orthilia*, *Pyrola*) et les sous arbrisseaux. Elle est représentée surtout par de petits arbrisseaux : bruyères (*Erica*, *Calluna*, *Daboecia*), myrtilles et apparentées (*Vaccinium*, *Arctophyllos*, *Empetrum*), cassiopes et phyllodoces (*Cassiope*, *Phyllodoce*), des arbustes : rhododendrons (*Rhododendron*), thé du Labrador (*Ledum*) et des arbres : bruyère arborescente (*Erica arborea*) ou arbousier (*Arbutus unedo*).

La famille des Ericacées compte dans le monde près de 1350 espèces réparties en une centaine de genres. Beaucoup d'Ericacées entretiennent des relations mycorhiziennes avec des champignons (*Rhizoctonia*) à partir desquels elles reçoivent des éléments nutritifs indispensables à leur croissance. Ce sont probablement ces associations qui permettent aux Ericacées de prospérer sur des sols pauvres en bases échangeables et très acides.

Le nom Ericacée dérive du latin scientifique *Erica*, du latin impérial *Erice*. Cette famille appartient aux dicotylédones, les corolles sont en forme de cloche de couleur rouge, rose ou blanche [1].

II.2. Systématique des Ericacées

Cette famille est plutôt cosmopolite des zones froides ou tempérées à basse altitude jusqu'aux zones tropicales en montagne. Elle est faiblement représentée en Asie. C'est à cette famille qu'appartient le raisin d'ours, les myrtilles, les rhododendrons et les bruyères. Parmi les petits arbres de la famille des Ericacées, figure l'arbousier originaire du bassin méditerranéen.

La classification phylogénétique incorpore à cette famille les Empétracées, les Epacridacées, les Monotropacées et les Pyrolacées.

II.3. Famille de *Arbutus* et répartition géographique

D'après MABERLEY [2], le genre « *arbutus* » comporte 14 espèces disséminées dans les régions tempérées et fraîches de l'hémisphère nord et en Amérique tropicale. Sur le continent européen, nous distinguons deux espèces d'arbousiers : *Arbutus unedo* L. et *Arbutus andrachnoides* L. Ce dernier est cantonné aux régions du pourtour de la mer Égée et en

particulier en Grèce et au Sud de l'Albanie. Quant à *Arbutus unedo* L., sa répartition géographique est méditerranéo-atlantique [1].

Nous signalons aussi l'existence de l'hybride *Arbutus X andrachnoides*. Cette espèce est issue du croisement naturel entre *Arbutus unedo* L. et *Arbutus andrachnoides*.

- *Arbutus x andrachnoides*

Son port est érigé, large, puis étalé. Ses feuilles sont lustrées, finement dentées, ovales à lancéolées, vert, à revers glauque. Sa floraison, en panicules semi-pendantes formées de petites fleurs blanches parfois teintées de rose, a lieu de l'automne au printemps, période au cours de laquelle l'exfoliation de *Arbutus* s'accélère. Sa hauteur est de 5 à 7 m [2].



Figure 1 : Arbre et écorce de *Arbutus x andrachnoides*.

- *Arbutus andrachne*

Arbutus andrachne est situé à l'Est de la méditerranée, son écorce s'exfoliant en donnant une couleur brune rouge. Son feuillage est brillant à bord lisse, ses fleurs sont blanches et ses fruits sont rouges.



Figure 2 : *Arbutus andrachne* à l'état jeune.

- *Arbutus canariensis*

Arbutus canariensis est situé dans les Iles Canaries. Son port est arrondi de 4-5 m, son écorce brun-rouge s'exfoliant, avec des fleurs rosées. Ses feuilles sont grandes d'un vert plus clair que celles d'*Arbutus unedo* L. Son fruit jaune orange est semblable à une petite mandarine. Il est comestible mais sans grand goût. L'écorce d'*Arbutus canariensis* est assez jolie avec ses stries verticales. Cette espèce résiste jusqu'à une température de - 16 °C et préfère les climats frais et humides du littoral à ceux trop continentaux [2].

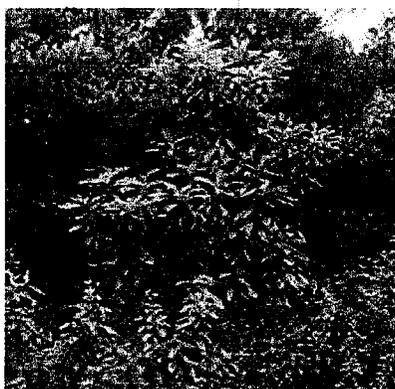


Figure 3 : *Arbutus canariensis*.

- *Arbutus menziesii*

Arbutus menziesii appelé arbousier d'Amérique, arbousier de Menzies, ou encore loupe de madrona, est un arbre de la famille des Ericacées qui appartient à l'ordre Ericales [3]. Il est localisé en Amérique du Nord (Californie-Colombie britannique), atteignant 25-30 m de haut. Son écorce est brune rougeâtre. Ses feuilles sont vertes brillantes et ses fleurs blanc rosé.

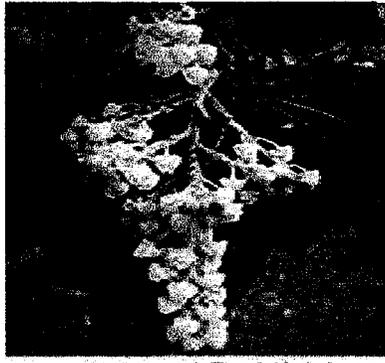


Figure 4 : Fleurs de *Arbutus menziesii*.

- *Arbutus xalapensis*

Il est situé au Mexique, Guatemala, et atteint jusqu'à 12 m de haut. Son écorce cannelle s'exfoliant et ses feuilles sont verte sombre. Ses fleurs sont d'un blanc rosé et ses fruits sont rouges sombres [3].



Figure 5 : Fruits s et fleurs de *Arbutus xalapensis*.

Et aussi :

• *Arbutus unedo* L. ; *Arbutus canariensis* Veill. ; *Arbutus coccinea* Sessé & Moc. ; *Arbutus densiflora* Kunth ; *Arbutus donnell-smithii* Small ; *Arbutus empetrifolia* Lam. ; *Arbutus ferruginea* L.f. ; *Arbutus floribunda* M. Martens & Galeotti ; *Arbutus furiens* Hook. & Arn. ; *Arbutus glandulosa* M. Martens & Galeotti ; *Arbutus hirsutus* Sessé & Moc. ; *Arbutus laurina* M. Martens & Galeotti ; *Arbutus macrophylla* M. Martens & Galeotti ; *Arbutus madrensis* S. González ; *Arbutus menziesii* Pursh ; *Arbutus mollis* Kunth ; *Arbutus mucronata* L. f. ; *Arbutus occidentalis* McVaugh & Rosatti ; *Arbutus ovata* M. Martens & Galeotti ; *Arbutus paniculata* M. Martens & Galeotti ; *Arbutus peninsularis* Rose & Goldman ; *Arbutus petiolaris* Kunth ; *Arbutus phillyreaefolia* Pers. ; *Arbutus pilosa* Graham ex Hook. ; *Arbutus prunifolia* Klotzsch ; *Arbutus punctata* Hook. & Arn. ; *Arbutus rubescens* Bertol. ; *Arbutus salicifolia* Sessé & Moc. ; *Arbutus spinulosa* M. Martens & Galeotti ; *Arbutus tessellata* P.D. Sorensen ; *Arbutus texana* Buckley ; *Arbutus tomentosa* Pursh ; *Arbutus varians* Benth. ; *Arbutus vernalis* Poepp. & Endl. ; *Arbutus xalapensis* Kunth [3].

II.4. *Arbutus unedo* L. (Arbousier)

4.1. Histoire et tradition

D'après Daoud EL ANTAKI, dans son œuvre « TADHKIRA » le nom classique de l'arbousier est Djina. Il est mentionné par Ibn EL BAYTAR avec une bien curieuse expression quatil abihi « meurtrier de son père ». Il explique que c'est à cause de ses fruits qui n'ont pas le temps de dessécher, qu'une pousse est déjà près d'éclore. Quatil abihi est indiqué également par Abderrazaq EL DJAZAIRI avec les synonymes lendj et sassnou [4].

Le nom latin unedo vient de un ede « je n'en mange qu'un » [5]. Dans l'Enéide, Virgile indique qu'on en déposait des branches sur les tombes comme symbole d'estime. Les berbères, quant à eux, accrocheraient à l'arbre sacralisé des morceaux d'étoffes pour invoquer la guérison [6].

4.2. Classification botanique

Arbutus unedo L. est l'espèce la plus fréquente en Algérie. Il possède plusieurs noms communs comme l'arbousier, l'arbre aux fraises, le fraisier en arbre, l'olonier etc. [7]. Ses appellations arabes sont lendj, boudjbiba, henna hameur, acir ed dob, qatelabihia, mothrounia [8]. Chez les berbères, il est connu sous les noms ticisnou, sisnou et bahennou [8].

L'origine du nom de cette espèce de la famille des Ericacées [4] vient du latin arbor, petit arbre ou du celtique arbois, fruit raboteux [9]. *Arbutus unedo* L. est classé selon les différentes classifications comme suit :

4.2.1. Classification classique

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Ericales

Famille : Ericaceae

Genre : *Arbutus*

Espèce : unedo

4.2.2. Classification systématique (d'après L. Bray, 2001)

Embranchement : Angiospermae A. Braun & Doell

Classe : Asteropsida Brongn. (1843)

Sous-classe : Cornidae Frohe & U. Jensen (1996)

Super-ordre : Ericanae Takht. (1996)

Ordre : Ericales

Famille : Ericacées Juss. (1789)

Genre : *Arbutus*

4.2.3. Classification APG

Famille : Ericaceae

Ordre : Ericales

Super-ordre : Ericanae

Sous-classe : Asteridae

4.3. Description botanique

L'arbousier, en latin *Arbutus unedo* L., est un grand arbuste des terrains siliceux qui peut atteindre 6 à 8 m [6]. Originaire d'Amérique, nous le trouvons dans nos forêts méditerranéennes. Il appartient à la famille des Ericacées (dicotylédones gamopétales pentacycliques) [4].

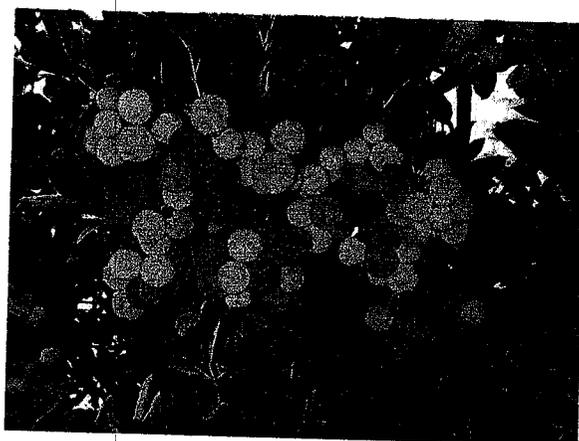


Figure 6 : Arbre, feuilles et fruits de *Arbutus unedo* L.

Ses feuilles sont persistantes coriaces et luisantes [2]. Il développe une écorce rouge très décorative qui a tendance à s'exfolier en lanières fines pour laisser apparaître un tronc lisse beige rosé. Il séduit par sa généreuse floraison en forme de clochettes blanches [5] et par ses fruits ronds et comestibles à l'aspect d'une fraise. C'est pour cette raison qu'il est appelé arbre aux fraises [6]. Ces baies globuleuses et hérissées sont de couleur rouge orangée à rouge écarlate [10].

* **Ecorce** : Les jeunes rameaux sont rouges, rudes et poilus [8]. Devenue âgée, l'écorce devient brun terne, se fissure et finit par s'exfolier par petites plaques.

* **Feuilles** : Elles sont oblongues lancéolées, glabres, alternes, coriaces et luisantes [4]. Elles mesurent de 5 à 11 cm de long et 1.5 à 4 cm de large. Les bords du limbe sont dentés en scie ou parfois sub-entiers. Le pétiole mesure 10 mm au moins.

* **Fleurs** : Elles sont rassemblées en grappes [6] rameuses et terminales, hermaphrodites, actinomorphes (régulières) et possèdent 10 étamines. Le calice gamosépale possède 5 lobes

courts. La corolle gamopétale de 5 à 7 mm de longueur forme un petit grelot de couleur blanchâtre qui devient caduque avant que la fleur ne fane. Chaque extrémité des 5 pétales soudés se termine par une courte dent enroulée en dehors.

* **Fruits** : L'arbousier est un des rares végétaux qui porte, en même temps, des fleurs et des fruits. A l'automne, les fleurs s'épanouissent et côtoient les fruits mûrs formés au cours de l'année précédente. Cet arbrisseau porte des baies charnues (à 5 loges), globuleuses, indéhiscentes de 20 mm de diamètre, rouge vif à maturité. Elles sont couvertes de tubercules pyramidaux coniques; leur conférant cet aspect rugueux caractéristique. Chacune des loges renferme 4 ou 5 graines [6].

4.4. Propriétés et usages

Les fruits, de saveur un peu fade, sont comestibles. Ils sont légèrement narcotiques et deviennent stupéfiants à haute dose [6]. Ils donnent, par fermentation, de l'eau de vie qui possède des propriétés digestives et stomachiques [7].

Le bois est un excellent combustible [9]. La racine passe pour être dépurative et décongestionnante, et possède aussi une activité hypotensive et hypoglycémiante. C'est un bon désinfectant des voies urinaires, et est utilisée aussi pour soigner les blennorragies purgatives [7].

Les feuilles sont antiseptiques et très astringentes [11]. Elles sont utilisées contre la diarrhée, la dysenterie, les inflammations des voies urinaires accompagnées de purulence [8]. Elles favorisent la circulation sanguine [12], sont dotées de propriétés antispasmodiques et agissent sur le transit intestinal et biliaire [6].

Les fleurs possèdent des propriétés sudorifiques réputées [7].

4.5. Recommandations

Le fruit est déconseillé pendant la grossesse et en cas d'affection rénale [5]. Il est nécessaire de respecter les doses d'arbouses consommées car en petite quantité, elles sont anti-diarrhéiques, et en grande quantité, elles deviennent purgatives [7].

4.6. Principes chimiques

L'arbousier est très riche en polyphénols, les tanins de l'écorce en contiennent 35 à 45%. Les feuilles renferment de la gaultérine et de l'arbustérine. Les graines contiennent 39% d'une huile grasse qui se range parmi les huiles siccatives.

Références Bibliographiques

- [1] Petit Larousse illustré, Librairie Larousse, **1980**, p. 390.
- [2] D.J. Mabberley, The Plant Book, A portable dictionary of the vascular plants, Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, **1997**, p. 858.
- [3] H. Abbayes, G. Claustres, R. Corillion, P. Dupont, Flore et végétation du massif Armoricaïn, Tome I, Presses Universitaires de Bretagne, Saint-Brieuc, **1971**, p. 1226.
- [4] F. Baba Aïssa, Encyclopédie des plantes utiles, Edition EDAS, **2000**, p. 18.
- [5] P. Iserin, Encyclopédie des plantes médicinales identification, Préparation, Soins, Edition Larousse, **2001**, p. 170.
- [6] C. Boisvert, Plantes et remèdes naturels, Edition Aubanel, **2004**, p. 83.
- [7] B. Boullard, Plantes médicinales du monde - Réalité et Croyance, Edition Estem, **2001**, p. 50.
- [8] A. Beloued, Plantes médicinales d'Algérie, Office des Publications Universitaires (OPU), **2001**, p. 32.
- [9] H. Coste, Flore descriptive illustrée de la France, Tome I, Réédition de 1906, Edition Blanchard, Paris, **1990**, p. 505.
- [10] P. Quezel, S. Santa, Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Edition CNRS, Tome II, **1963**, p. 1170.
- [11] L. Bezanger, Beauquesne Pinkas, F. Troitin, Plantes médicinales des régions tempérées, Edition Maloine, **1980**, p. 512.
- [12] R.E. Spichiger, V. Savolainen, M. Figeat, Botanique Systématique des Plantes à Fleurs, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 1ère Edition, **2000**, p. 120.

Chapitre III

Chapitre III : Les polyphénols Végétaux

III.1. Introduction

Les polyphénols végétaux ont d'abord été étudiés pour leurs effets protecteurs contre les organismes pathogènes, bactéries ou virus qui infectent la plante. Souvent présents en grande quantité dans les plantes consommées par les herbivores, ils limitent leur appétence et digestibilité. Ils ont donc été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels. C'est un regard tout à fait différent que nous leur portons aujourd'hui, après la reconnaissance de leurs propriétés anti-oxydantes et de leurs effets présumés sur la santé.

Les recherches sur les effets thérapeutiques des polyphénols ont cependant débuté beaucoup plus tardivement que pour les autres antioxydants. Ceci est largement expliqué par la très grande diversité de leurs structures chimiques. Plusieurs centaines de molécules ont été identifiées dans les aliments, réparties en plusieurs classes. Nous pouvons citer parmi les plus importantes les anthocyanes [1] responsables de la couleur des fruits rouges (cerise, cassis, fraise, etc.), les tanins [2] responsables de l'astringence de divers fruits (pellicule et pépins du raisin, chair du kaki, etc.), les flavanones responsables de l'amertume du pamplemousse et également abondantes dans l'orange. Pour les légumes, nous citons l'oignon riche en flavonols (quercétine).

III.2. Activités biologiques des polyphénols

Les orientations récentes des recherches sur les polyphénols visent à mieux comprendre les mécanismes d'action au niveau moléculaire et cellulaire. Les résultats des études portant sur les marqueurs du stress oxydant sont très contradictoires et ne progresseront qu'à la lumière des progrès réalisés dans la validation de ces marqueurs. Trop peu d'études cliniques ont encore été publiées mais elles suggèrent un rôle protecteur vis-à-vis des maladies cardiovasculaires.

Les recherches épidémiologiques visant à préciser les associations entre les niveaux de consommation des divers polyphénols et le risque de développer les pathologies permettront de préciser la nature des polyphénols et les niveaux d'apports les plus favorables à la prévention des diverses pathologies.

Ces études épidémiologiques sont encore à leurs balbutiements. Les progrès sont rendus difficiles par l'insuffisance des tables de compositions alimentaires pour les polyphénols. Une première table partielle vient d'être publiée aux Etats-Unis. Une autre table plus complète est en cours d'élaboration en France. Le développement de tels outils contribuera à préciser les associations entre consommation de polyphénols et santé, une des clés nécessaires pour l'établissement de recommandations nutritionnelles.

Dans l'état des connaissances actuelles, il est illusoire de recommander une augmentation des niveaux d'apports en polyphénols. Un apport excessif en polyphénols à travers notamment la consommation de suppléments nutritionnels pourrait avoir éventuellement des conséquences fâcheuses pour la santé (statut en fer, effets pro-oxydants, effets goïtrogènes, etc...). Seules les recherches à venir permettront de mieux préciser les niveaux d'apport les plus favorables au maintien de la santé [2].

Tableau 1 : Activités biologiques des composés polyphénoliques.

Polyphénols	Activités	Références
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques)	Anti-bactériennes	[3]
	Anti-fongiques	[4]
	Anti-oxydantes	[5]
Coumarines	Protectrices vasculaires et	[6]
	Anti-oedémateuses	
Flavonoïdes	Anti-tumorales	[7]
	Anti-carcinogènes	[8]
	Anti-inflammatoires	[9]
	Hypotenseurs et diurétiques	[10]
	Anti-oxydantes	[11]
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène	[12]
	Anti-oxydantes	[13]
	Anti-tumorales	[14]
	Anti-fongiques	[15]
	Anti-inflammatoires	[9]
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux	[16]
Tanins galliques et catéchiques	Anti-oxydantes	[17-18]

III.3. Structures chimiques des polyphénols

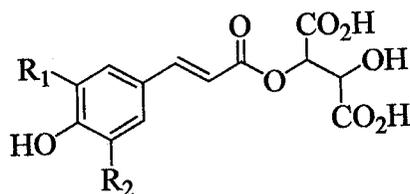
3.1. Les composés non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

- Les acides phénoliques

Nous distinguons tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représentés par l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine.

D'autres composés phénoliques appartiennent également à cette classe de composés. A titre d'exemple, nous citons les dérivés de l'ester hydroxycinnamique possédant une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *t*-caféique, l'acide *t*-fertarique et l'acide *t*-sinapique [18, 19].



Acide *t*-caféique : $R_1=OH$, $R_2=H$

Acide *p*-coumarique : $R_1=H$, $R_2=H$

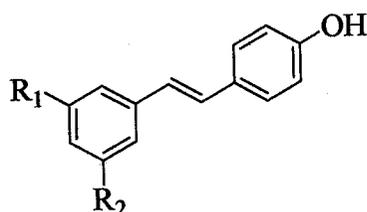
Acide *t*-fertarique : $R_1=OCH_3$, $R_2=H$

Acide *t*-sinapique : $R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$

Figure 7 : Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique.

- Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Les plus abondants sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères : le resvératrol *trans*-déhydrodimère et l' ϵ -viniférine [20, 21].



Pterostilbène : $R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$

Resvératrol : $R_1=OH$, $R_2=OH$

Picéide : $R_1=OGlc$, $R_2=OH$

Figure 8 : Structures chimiques de quelques stilbènes.

Ce type de molécules existe aussi sous la forme de dérivés trimériques jusqu'à pentamériques [22, 23]. Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL). D'après les travaux de FRANKEL et coll. [24],

ils pourraient jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires. D'autre part, JANG et coll. [25] leur attribue des activités chimio-préventives contre le cancer.

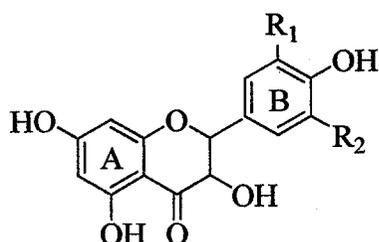
3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6), correspondant à la structure de la 2-phényl benzopyrone.

Au sens large du terme, ce groupe comprend principalement trois familles de composés : les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central [26].

- Les flavonols

Les flavonoïdes sont des substances naturelles polyphénoliques très répandues dans le règne végétal et donc dans les produits de notre alimentation. Nous citons à titre d'exemples le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine. Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. Ceux de la myricétine semblent être spécifiques aux variétés de raisins rouges [27]. Des travaux réalisés par BOHM et coll. [28] et par VINSON et coll. [29] leurs attribuent des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du cœur et des cancers. D'autre part, LACAÏLLE-DUBOIS et coll. [30] ont montré que ces composés possèdent aussi des activités antitumorales et chimio-préventives.



Kaempférol : $R_1=H$, $R_2=H$

Quercétine : $R_1=OH$, $R_2=H$

Myricétine : $R_1=OH$, $R_2=OH$

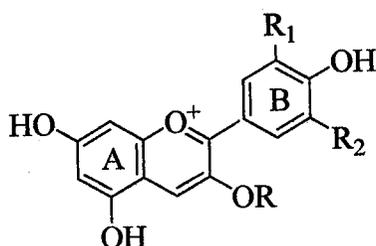
Isorhamnétine : $R_1=OCH_3$, $R_2=H$

Figure 9 : Structures chimiques de quelques flavonols.

- Les anthocyanes

Les anthocyanes sont responsables de la coloration rouge des racines de l'*Arbutus unedo* L. Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en position C-3 [31]. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule.

L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. Nous distinguons cinq anthocyanidines : La cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine.



Malvidine : $R_1=OCH_3, R_2=OCH_3$

Péonidine : $R_1=OCH_3, R_2=H$

Delphinidine : $R_1=OH, R_2=OH$

Pétunidine : $R_1=OCH_3, R_2=OH$

Cyanidine : $R_1=OH, R_2=H$

Figure 10 : Structures chimiques de quelques anthocyanidines.

- Les tanins condensés (flavan-3-ols)

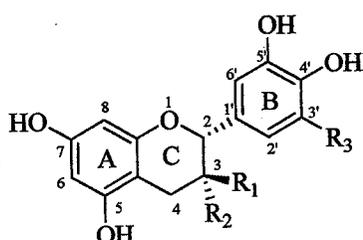
Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidines, sont largement répandus dans notre alimentation (fruits, thé etc.) et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles de nos produits de consommation [32, 33]. Dans l'*Arbutus unedo* L. les racines, tiges et fruits sont les zones de concentration des tanins et des composés phénoliques [34, 35]. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation et leur nombre de substituants galloylés [36].

Tableau 2 : Classes de proanthocyanidines.

Classes de proanthocyanidines	Unité monomérique	Substituants				
		5	7	3'	4'	5'
Procyanidine	(2R, 3S)-Catéchine	OH	OH	OH	OH	H
Prodelfidine	(+)-(2R, 3S)-Gallocatéchine	OH	OH	OH	OH	OH
Propelargonidine	(2R, 3S)-Afzélíchole	OH	OH	H	OH	H
Profisetidine	(2R, 3S)-Fisetinidole	H	OH	OH	OH	H

Les unités monomériques

Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C-2 et C-3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. Nous distinguons ainsi les catéchines (dihydroxylées) et des gallocatéchine (trihydroxylées).



(+)-(2R, 3S)-Catéchine : $R_1=OH, R_2=H, R_3=H$

(-)-(2R, 3S)-Epicatéchine : $R_1=H, R_2=OH, R_3=H$

(+)-(2R, 3S)-Gallocatéchine : $R_1=OH, R_2=H, R_3=OH$

(-)-(2R, 3S)-Epigallocatéchine : $R_1=H, R_2=OH, R_3=OH$

Figure 11 : Structures des unités monomériques constitutives des tanins condensés.

Ces unités peuvent être substituées par l'acide gallique en position C-3, en particulier, dans l'(-)-épicatéchine, formant l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate [37, 38].

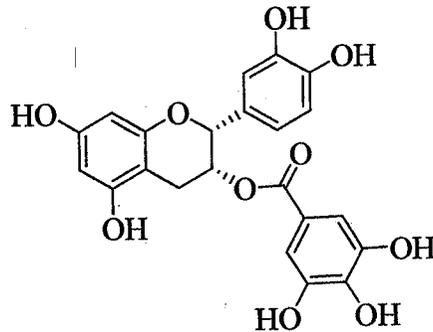
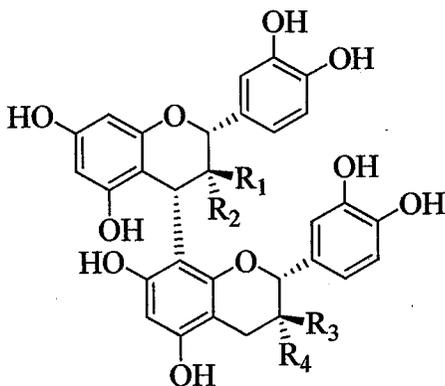


Figure 12 : Structure de l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate.

- Tanins condensés (type A et B)

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison inter-monomérique [39, 40].

Les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unités monomériques et le type de liaison les reliant entre-elles. Ainsi, une trentaine de proanthocyanidines dimériques, trimériques et tétramériques ont déjà été identifiées [41-43]. Le type B se caractérise par une liaison inter-monomérique qui peut être soit C4-C8 ou C4-C6, de conformation *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C-3. La stéréochimie du carbone C-2 est généralement (*R*), mais il existe quelques exceptions. Les structures des principaux dimères de type B sont représentées dans la figure 13. Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C-2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A [34].



Dimères B₁ à B₄

B₁ : Epicatechine-(4β→8)-catéchine

R₁=H, R₂=OH, R₃=OH, R₄=H

B₂ : Epicatechine-(4β→8)-épicatéchine

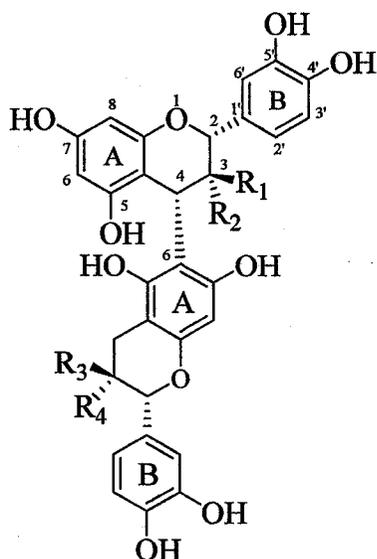
R₁=H, R₂=OH, R₃=H, R₄=OH

B₃ : Catéchine-(4α→8)-catéchine

R₁=OH, R₂=H, R₃=OH, R₄=H

B₄ : Catéchine-(4α→8)-épicatéchine

R₁=OH, R₂=H, R₃=H, R₄=OH



Dimères B₅ à B₈

B₅ : Epicatéchine-(4β→6)-épicatéchine

R₁=H, R₂=OH, R₃=H, R₄=OH

B₆ : Catéchine-(4α→6)-catéchine

R₁=OH, R₂=H, R₃=OH, R₄=H

B₇ : Epicatéchine-(4β→6)-catéchine

R₁=H, R₂=OH, R₃=OH, R₄=H

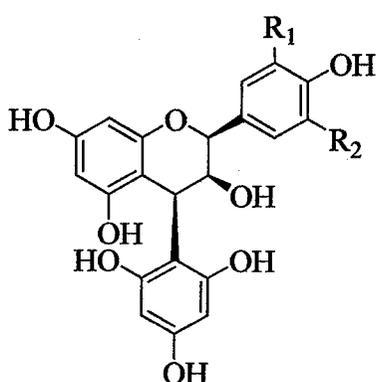
B₈ : Catéchine-(4α→6)-épicatéchine

R₁=OH, R₂=H, R₃=H, R₄=OH

Figure 13 : Structures chimiques des proanthocyanidines dimériques de type B.

- Dérivés du phloroglucinole

Les travaux de BRUYNE et coll. [44] ainsi que ceux de PORTER et coll. [45] ont montré qu'un autre type de proanthocyanidines sont présents dans le règne végétal. Nous citons à titre d'exemples l'épicatéchine-(4β→2)-phloroglucinole, l'épigallocatechine-(4β→2)-phloroglucinole etc.



Epicatéchine-(4β→2)-phloroglucinole :

R₁=OH, R₂=H

Epigallocatechine-(4β→2)-phloroglucinole :

R₁=OH, R₂=OH

Epiafzélíchole-(4β→2)-phloroglucinole :

R₁=H, R₂=H

Figure 14 : Structures chimiques des proanthocyanidines avec le phloroglucinole.

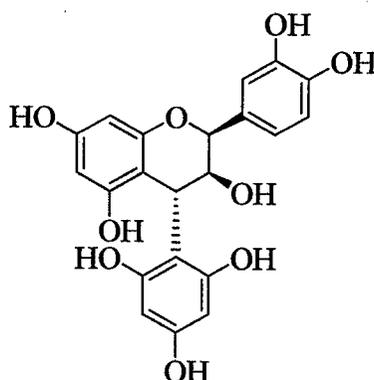


Figure 15 : Catéchine-(4α→2)-phloroglucinole.

Références Bibliographiques

- [1] A. Scalbert, G. Williamson, Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J. Nutr.*, **2000**, 130, 2073-2085.
- [2] N. Didry, M. Pinkas et M. Torck, Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de divers espèces de *Grindelia*, *Planta Med. Phytother.*, **1982**, 16, 7-15.
- [3] H. Ravn, C. Andary, G. Kovacs and P. Molgaard, Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi, *Biochem. Syst. Ecol.*, **1984**, 17, 175-184.
- [4] F. Hayase, M. Kato, Antioxidant compounds of sweet potatoes, *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, **1984**, 30, 37-46.
- [5] T.J. Mabry, A. Ulubelen, Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans, *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, 28, 188-196.
- [6] B. Stavric, T.I. Matula, Flavonoids in food - Their significance for nutrition and health, Birkhauser Verlag, **1992**, p. 274.
- [7] H.C. Das, J.H. Wang, E.J. Lien, Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids : A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis, Birkhauser Verlag, **1994**, p. 133.
- [8] D. Bidet, J.C. Gagnault, P. Girard, F. Trotin, Inflammation, Allergie, Douleur et Acide Arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes, *Actualité Chimique*, **1987**, 89-97.
- [9] J. Bruneton, Pharmacognosie et Phytochimie - Plantes médicinales, Paris, France 3^{ème} édition, **1993**, p. 322 & P.360.
- [10] O.I. Aruoma, J.P.E. Spencer, J. Butler, B. Halliwell, Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals, *Free Rad. Res.*, **1995**, 22, 187-190.
- [11] J. Masquelier, M.C. Dumon, J. Dumas, Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques, *Acta thérapeutique*, **1979**, 1, 101-104.
- [12] T. Bahorun, B. Gressier, F. Trotin, C. Brunet, T. Dine, M. Luyckx, J. Vasseur, M. Cazin, J.C. Cazin, S.M. Pinkas, Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations, *Drug Res.*, **1996**, 46 II (11), 1086-1089.

- [13] M.M. De Oliveira, M.R.P. Sampaio, F. Simon, B. Gibert, W.B. Mors, Antitumor activity of condensed flavenols, *An. Acad. Brasil.*, **1972**, 44, 41-44.
- [14] H.E. Brownléé, J. Hedger, I.M. Scott, Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*, *Phys. Mol. Plant Pathol.*, **1992**, 40, 227-232.
- [15] T. Kreofsky, J.W. Schlager, Z. Vuk-Pavlovic, R.T. Abraham, M.S. Rohrbach, Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages, *Am. J. Resir. Cell. Mol. Biol.*, **1992**, 7, 172-181.
- [16] T. Okuda, Y. Kimura, T. Yoshida, T. Hatano, H. Okuda, S. Arichi, Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver, *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 1625-1631.
- [17] H. Okamura, A. Mmimura, Y. Yakou, M. Niwano, Y. Takahara, Antioxidant activity of tanins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*, *Phytochem.*, **1993**, 33, 557-561.
- [18] P. Huglin, C. Schneider, *Biologie et Ecologie de la Vigne - Technique et Documentation*, Paris, **1998**.
- [19] G. Goetz, A. Fkyerat, N. Métais, M. Kunz, R. Tabacchi, R. Pezet, V. Pont, Resistance factors to grey mould in grape berries : Identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase, *Phytochem.*, **1999**, 52, 759-767.
- [20] A. L. Waterhouse, R. M. Lamuela-Raventos, The Occurence of piceid, a stilbene glycoside in grape berries, *Phytochem.*, **1994**, 37(2), 571-573.
- [21] P. Langcake, Disease resistance of *Vitis* spp.v and the production of stress metabolites resveratrol, ϵ -Viniferin, α -Viniferin and pterostilbene, *Physiol. Plant Pathol.*, **1981**, 9, 77-86.
- [22] M. Bokel, C. M. N. Diyasena, A. A. L. Gunatilaka, W. Kraus, S. Sotheeswaran, Canaliculatol, an antifugal resveratrol trimer from *Stemonoporous canaliculatus*, *Phytochem.*, **1988**, 27(2), 377-380.
- [23] T. Tanaka, M. Ohyama, K. Morimoto, F. Asai, M. Iinuma, A Resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*, *Phytochem.*, **1998**, 48(7), 1241-1243.
- [24] E. N. Frankel, A. L. Waterhaouse, J. E. Kinsella, Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol, *The Lancet*, **1993**, 341, 1103-1104.
- [25] M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani, Cancer chimio preventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science*, **1997**, 275, 218-220.
- [26] M. Bourzeix, D. Weiland, N. Heredia, A Study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine, *Bulletin de l'O.I.V.*, **1986**, 669, 1173.

- [27] S. Remy, Les tanins du Vin rouge: Caractérisation de structures natives et dérivées. Thèse de l'INRA, Montpellier, 1999.
- [28] H. Bohm, H. Boeing, J. Hempel, Flavonols, Flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 1998, 37(2), 147-163.
- [29] J. A. Vinson, Y. A. Dabbagh, M. M. Serry, Plant flavonoïds, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using *in vitro* oxidation model for heart disease, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 2800-2802.
- [30] M.-A. Lacaille-Dubois, H. Wagner, Importance pharmacologique des dérivés phénoliques, *Acta Botanica Gallica*, 1996, 143(6), 555-562.
- [31] P. Ribereau-Gayon, Les Composés phénoliques des végétaux, 1968.
- [32] E. Haslam, Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action, Cambridge University Press, Cambridge, 1998.
- [33] E. Haslam, In *Vino veritas*: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines, *Phytochem.*, 1980, 19, 2577-2582.
- [34] M. T. Escribo-Bailon, Y. Gutierrez-Fernandez, J. C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40, 1794-1799.
- [35] J. M. Souquet, V. Cheynier, F. Brossaud, M. Moutounet, Polymeric proanthocyanidins from grape skins, *Phytochem.*, 1996, 43(2), 509-512.
- [36] R. W. Hemingway, Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives, in "Plant polyphenols: Synthesis, Properties, Significance", R. W. Hemingway and P. E. Laks Eds., New-York, 1992.
- [37] C. T. Su, V. L. Singleton, Identification of three flavan-3-ols from grapes, *Phytochem.*, 2001, 8, 153-1558.
- [38] M. Boukharta, M. Girardin, M. Metche, Procyanidines galloylées du sarment de la vigne (*Vitis vinifera*) : Séparation et identification par chromatographie liquide à haute performance et chromatographie en phase gazeuse, *J. Chromatogr.*, 1988, 455, 406-409.
- [39] E. C. Bate-Smith, Astringency in foods, *Food Processing*, 1954, 23, 124-35.
- [40] L. J. Porter, L. N. Hirtstich, B. G. Chang, The conversion of procyanidins and prodelfphinidins to cyanidins and delphinidins, *Phytochem.*, 1986, 25(1), 223-230.
- [41] K. Weinges, M. Piretti, Isolation of procyanidins B1 from grapes, *Justus Liebig's Annalen der Chemie*, 1971, 748, 218-220.

- [42] Z. Czochanska, L. Yeap Foo, L. J. Porter, Composition changes un lower molecular weight flavans during grape maturation, *Phytochem.*, **1979**, 18, 1819-1822.
- [43] Ricardo-da-Silva, J. M. Rigaud, J. Cheynier, V. Cheminat, A., M. Moutounet, Procyanidin dimers and trimers from grape seeds, *Phytochem.*, **1991**, 30(4), 1259-1264.
- [44] T. de Bruyne, L. Pieters, R. Domisse, H. Kolodziej, V. Wray, D. Vanden Berghe, A. Vlietinck, NMR characterization and biological evaluation of proanthocyanidins: a systematic approach, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, **1999**, p. 193-209.
- [45] L. J. Porter, P. M. Dey, J. B. Harborne (Eds.), *Methods in plant biochemistry - Plant phenolics*, Academic Press, London, **1989**, 1, p. 389-419.

Chapitre IV

Chapitre IV : Etude Bibliographique sur *Arbutus unedo* L.

IV.1. Introduction

Les travaux des ethnopharmacologues ont mis en relief l'utilisation des plantes médicinales pour l'extraction de principes actifs par l'industrie pharmaceutique. La rationalité industrielle trouve dans cette démarche une base d'innovation pour la mise au point de médicaments nouveaux qui peut être source de gain de temps dans les processus de recherche et développement [1].

De nombreux travaux ont été réalisés sur *Arbutus unedo* L. et plus spécialement sur son huile essentielle en s'attachant particulièrement à caractériser les différents composés. D'autres visent à déterminer la valeur alimentaire due principalement à leur contenu en sucre, vitamine et sels minéraux. Actuellement, beaucoup de travaux visent à caractériser les polyphénols pour leur caractère antioxydant.

IV.2. La chimie de *Arbutus unedo* L.

2.1. Les flavonoïdes

Les flavonols constituent la sous-classe la plus importante des flavonoïdes. Les flavonols libres, sans oses accrochés, sont appelés aglycones dont les principaux sont la quercétine, le kaempférol, la myricétine et l'isorhamnétine. Ces formes sont présentes dans les plantes fraîches, mais peuvent être aussi le résultat d'un traitement de l'aliment. En effet, les flavonols sont généralement présents dans les plantes sous forme liée à des oses. Ces derniers peuvent être liés aux différentes positions à l'aglycone mais préférentiellement en position 3. Plus de 80 oses différents, monosaccharides, disaccharides, tri-saccharides ou même tétra-saccharides, peuvent être liés aux différents flavonols présents dans les plantes. Ainsi et à titre d'exemple, nous connaissons, actuellement, 179 formes différentes de glycoside de la quercétine décrites.

Afin de déterminer les contenus en flavonols dans les aliments, une hydrolyse acide des flavonols glycosylés est nécessaire. Cette hydrolyse est une approche pratique car il n'existe pas de référence spécifique pour chacun des glycosides existant dans la nature.

DAUGUET et coll. [2] ont isolés cinq hétérosides de flavonols à partir des feuilles de *Arbutus unedo* L. Leurs structures sont représentées ci-dessous :

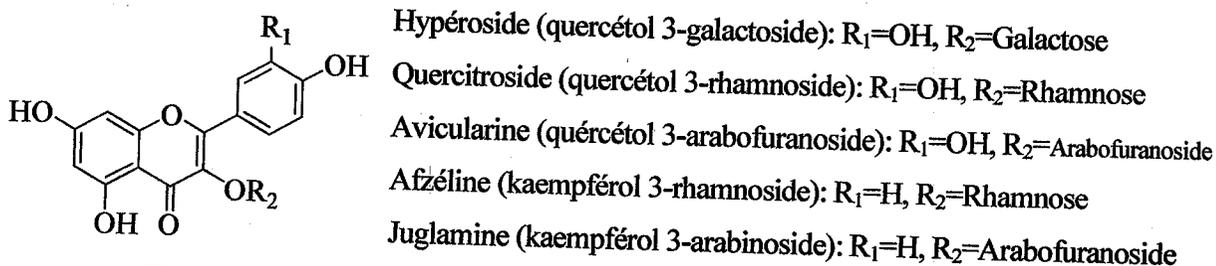


Figure 16 : Structure chimique des flavonols des feuilles de *Arbutus unedo* L.

2.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes constituent une sous-classe très importante des flavonoïdes. Les anthocyanes libres, sans oses accrochés, sont appelés anthocyanidines. Les principales sont la delphinidine, la pétunidine, la cyanidine, la péconidine, la pélanidine et la malvidine. Ces formes sont présentes dans les plantes fraîches, mais peuvent être aussi le résultat du traitement de l'aliment. En effet, les anthocyanes sont généralement présents dans les plantes sous forme liée à des oses. Afin de déterminer les contenus en anthocyanidines d'aliments, une hydrolyse acide des anthocyanes est nécessaire. Cette hydrolyse est une approche pratique car il n'existe pas de référence pure pour chacun des glycosides existant dans la nature.

L'analyse par chromatographie sur colonne couplée à la SM du pigment rouge des fruits de l'*Arbutus unedo* L. a révélé la présence de trois anthocyanes, la cyanidine 3-O-β-D-galactopyranoside, la delphinidine 3-O-β-D-glucopyranoside et la cyanidine 3-O-β-D-arabinopyranoside [3]. Ces trois anthocyanes identifiés dans les fruits de *Arbutus unedo* L. sont représentés ci-dessous :

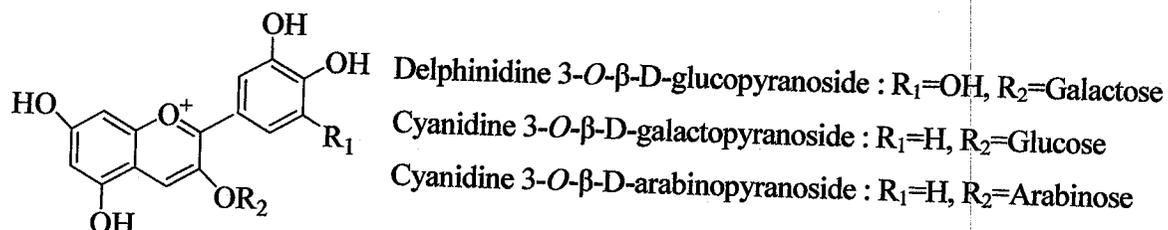
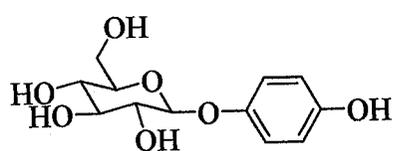


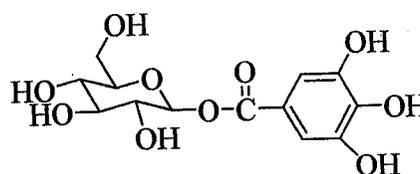
Figure 17 : Structure chimique des anthocyanes des fruits de *Arbutus unedo* L.

2.3. Les composés phénoliques

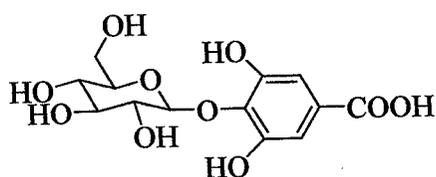
AGATA et coll. [3] ont évalué le profil des constituants phénoliques dans les fruits de *Arbutus unedo* L. Cette étude a révélé l'existence de sept composés purs lors de l'analyse HPLC des fractions obtenues par chromatographie de l'extrait brut méthanolique sur une colonne sephadex LH-20. Les structures de ces composés sont résumées ci-dessous :



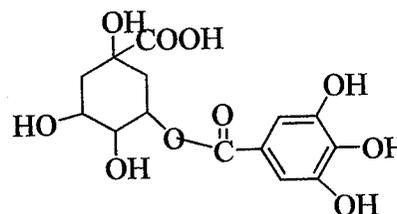
Arbutine



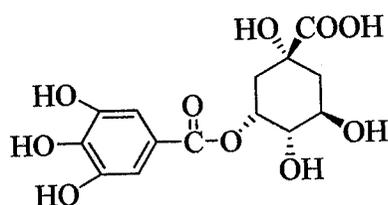
β -D-glucogalline



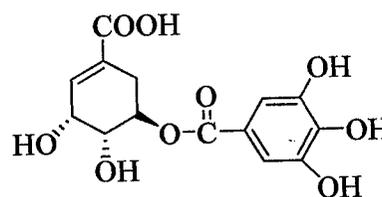
Acide gallique 4-*O*- β -D-glucopyranoside



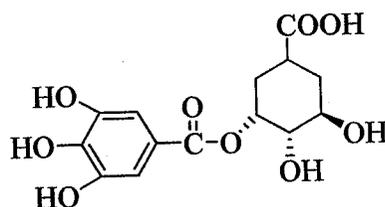
Acide 3-*O*-galloylquinique



Acide 5-*O*-galloylquinique



Acide 5-*O*-galloylshikimique



Acide 3-*O*-galloylshikimique

Figure 18 : Composés phénoliques identifiés dans les fruits de *Arbutus unedo* L.

2.4. Composition chimique des fruits de *Arbutus unedo* L.

2.4.1. Sucre et acides non-volatiles

Une étude a été menée par AYAZ et coll. [4] sur la composition et la concentration des sucres et des acides non volatiles dans les fruits de *Arbutus unedo* L. Cette étude réalisée par CPG/SM et en utilisant des produits de références, a conduit aux résultats résumés dans les tableaux 3 et 4 :

Tableau 3 : Composition des sucres dans les fruits de *Arbutus unedo* L.

Sucres	Concentration (% Poids sec)
Fructose	27.8 ± 0.32
Glucose	21.5 ± 0.18
Saccharose	1.8 ± 0.02
Maltose	1.11 ± 0.06
Total	52.21

Tableau 4 : Composition des acides non-volatiles dans les fruits de *Arbutus unedo* L.

Acide non-volatile	Concentration (mg/g Poids sec)
Acide fumarique	1.94 ± 0.07
Acide lactique	0.49 ± 0.03
Acide malique	0.84 ± 0.06
Acide subérique	0.23 ± 0.05
Acide citrique	trace

Les sucres solubles identifiés et quantifiés au cours de cette étude sont : le fructose, le glucose, le saccharose et le maltose. Leurs teneurs respectives sont de 27.8, 21.5, 1.8 et 1.11% du poids sec des fruits [4].

Parmi les acides non volatiles, l'acide fumarique (1.34 mg/g), lactique (0.84 mg/g), malique (0.84 mg/g), subérique (0.23 mg/g) et citrique ont été caractérisés.

Il est à noter que le fructose, le glucose, l'acide fumarique et malique représentent les composés majoritaires responsables du goût des fruits.

2.4.2. Acides phénoliques [4]

En utilisant la CPG/SM, les acides phénoliques ont été identifiés et quantifiés dans les fruits de *Arbutus unedo* L. Les acides caractérisés sont représentés dans le tableau 5 ci-dessous :

Tableau 5 : Composition des acides phénoliques dans les fruits de *Arbutus unedo* L.

Acide Phénolique	Concentration (mg/g Poids sec)
Acide gallique	10.7 ± 0.04
Acide protocatéchique	0.6 ± 0.03
Acide gentisique	1.9 ± 0.11
Acide <i>p</i> -Hydroxybenzoïque	0.3 ± 0.01
Acide vanillique	0.12 ± 0.08
Acide <i>m</i> -Anisique	0.05 ± 0.001

2.5. Acide organique des fruits de *Arbutus unedo* L.

L'analyse des acides organiques, du miel de fraisier de *Arbutus unedo* L., a montré la présence d'un acide inconnu comme constituant majoritaire. Ce composé a été isolé et identifié par SM et RMN comme structuralement similaire à l'acide 2,5-dihydroxy phényl acétique. Sa teneur moyenne dans le miel est de 378 mg/Kg.

L'analyse du nectar a confirmé l'origine florale de ce composé. Ce dernier n'a été détecté dans aucun des miels d'origine monoflorale, il pourrait donc être utilisé comme marqueur du miel de fraisier d'*Arbutus unedo* [5].

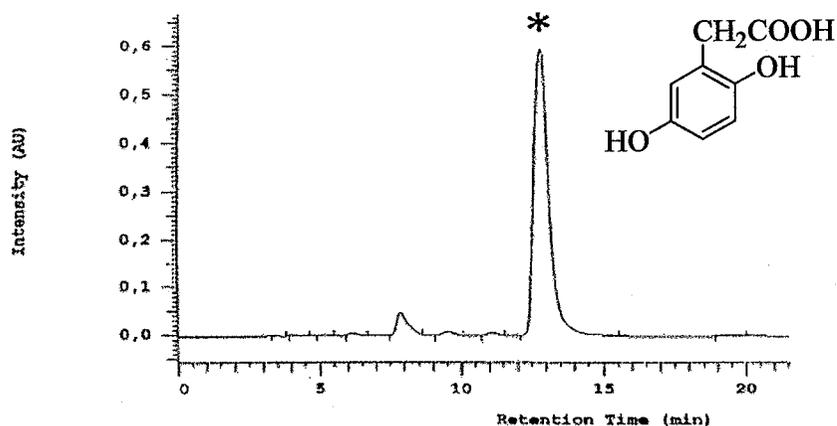


Figure 19 : Chromatogramme HPLC de l'acide homogénétique de *Arbutus unedo* L.

2.6. Teneurs en éléments minéraux

Les travaux de MEHMET MUSA et coll. [5] ont montré que les teneurs en sels minéraux dans les fruits de *Arbutus unedo* L. sont très variables. Elles sont résumées dans le tableau 6 ci-dessous :

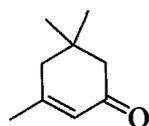
Tableau 6 : Teneurs en minéraux dans les fruits de *Arbutus unedo* L.

Minéraux	Valeurs (mg/Kg)
Al	20.11 ± 2.69
As	10.58 ± 6.47
B	16.03 ± 2.12
Ca	4959.02 ± 150
Cd	0.19 ± 0.05
Cr	2.41 ± 0.96
Cu	1.65 ± 0.41
Fe	12.15 ± 1.11
Ga	0.47 ± 0.43
K	14909.08 ± 1687
Li	0.94 ± 0.15
Mg	1315.57 ± 129.19
Mn	4.44 ± 0.55
Na	701.26 ± 80
Ni	0.13 ± 0.14
P	3668.56 ± 339.69
Pb	0.51 ± 0.04
Sr	5.10 ± 0.80
Ti	0.16 ± 0.26
V	16.63 ± 4.27
Zn	8.09 ± 0.96

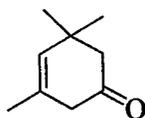
D'après ces résultats, nous remarquons que les fruits de *Arbutus unedo* L. sont riches en calcium, potassium, magnésium, sodium et phosphore. Par contre le cadmium, cuivre, lithium, manganèse, nickel, plomb et strontium se trouvent sous forme de trace.

2.7. Composés aromatiques dans le miel des fruits de *Arbutus unedo* L.

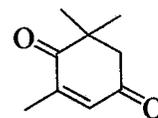
Afin de caractériser et d'authentifier le profil aromatique du miel de fraisier, BIANCHI et coll. [6] ont effectué une extraction dynamique (DHS : dynamic headspace), suivie d'une analyse CG/SM, sur 100 échantillons de miel de fraisiers de Sardaigne. Un total de 28 composés aromatiques a été identifié parmi lesquels seulement les composés norisoprénoïdes comme l' α -isophorone, la β -isophorone et la 4-oxoisophorone ont été reconnus comme marqueurs originaux et floraux spécifiques du miel de fraisier. Leurs structures sont représentées ci-dessous :



α -isophorone



β -isophorone



4-oxoisophorone

Figure 20 : Composés norisoprénoïdes.

Le rapport α -isophorone/ β -isophorone varie de 4 à 8, alors que le rapport α -isophorone/4-oxoisophorone est compris entre 11 et 20.

La méthode d'extraction DHS a été proposée comme une alternative valide à l'analyse du pollen pour la détection de la source florale, particulièrement pour les produits comme le miel de fraisier caractérisé par une faible teneur en pollen.

Le tableau ci-dessous regroupe les composés identifiés par comparaison de leurs spectres de masse, leurs temps de rétention avec ceux des produits de références ou encore leur identification par comparaison de l'indice de rétention (KI) avec les valeurs de la littérature [6].

Tableau 7 : Composés volatiles dans le miel des fruits de *Arbutus unedo* L.

N°	Composés	RT (min)	KI _{calc}	ID ^a
1	acétone	2.32	n.c.	SM, TR
2	2-butanone	3.30	905	SM, TR, KI
3	éthanol	3.98	939	SM, TR, KI
4	2,5-diméthylfurane	4.43	965	SM, KI
5	2,3-butanedione	5.22	989	SM, TR, KI
6	2,3-pentanedione	8.80	1047	SM
7	hexanal	9.53	1088	SM, TR, KI
8	méthyl-2-butenal	9.99	1103	SM
9	2-méthyl-1-propanol	10.39	1106	SM, TR, KI
10	1-butanol	2.34	1155	SM, TR, KI
11	heptanal	14.64	1183	SM, TR, KI
12	2,4,4-triméthylcyclopentanone	15.62	1211	SM
13	3-méthyl-1-butanol	15.75	1214	SM, TR, KI
14	octanal	18.60	1291	SM, TR, KI
15	2,3,4-triméthyl-2-cyclopentèn-1-one	19.28	1311	SM
16	3-(1-méthyléthyl)-2-cyclopentèn-1-one	19.61	1322	SM
17	5-heptèn-2-one-6-méthyl	20.13	1343	SM, TR, KI
18	3,3,5-triméthylcyclohexanone (dihydroisophorone)	21.02	1368	SM
19	nonanal	21.71	1397	SM, TR, KI
20	3,5,5-triméthyl-3-cyclohexèn-1-one (β -isophorone)	22.03	1407	SM
21	3-furancarboxaldéhyde	22.79	1441	SM
22	furfural	23.64	1474	SM, TR, KI
23	décanal	24.41	1503	SM, TR, KI
24	1-(2-furanyl) éthanone	24.60	1512	SM
25	benzaldéhyde	25.01	1528	SM, TR, KI
26	3,5,5-triméthyl-2-cyclohexen-1-one (α - isophorone)	26.52	1591	SM, TR
27	3,5,5-triméthylcyclohex-2-ène-1,4-dione (4- oxoisophorone)	28.75	1698	SM, TR
28	3,5,5-triméthylcyclohexan-1,4-dione	30.53	1786	SM

n.c. : non calculé ; a : Méthode d'identification : SM, identification par comparaison du spectre de masse; TR, identification par comparaison du temps de rétention de référence; KI, identification par comparaison du KI avec les valeurs de la littérature.

2.8. Composition de l'huile essentielle de *Arbutus unedo* L.

L'huile essentielle obtenue à partir des feuilles d'*Arbutus unedo* L. d'origine Turque a été analysée par CG/SM par l'équipe KIVCAK et coll. [7]. Vingt huit composés aromatiques ont été caractérisés. Le (*E*)-2-décenal (12%), l' α -terpinéol (8.8%), l'acide hexadécanoïque (5.1%) et (*E*)-2-undécenal (4.8%) représentent les constituants majoritaires de l'huile essentielle. Les résultats des analyses CG/SM sont résumés ci-dessous :

Tableau 8 : Composition de l'huile essentielle de *Arbutus unedo* L.

IRR	Composés	%	IRR	Composés	%
1400	Nonanal	3.7	1827	(<i>E,E</i>)-2,4-Décadiénal	0.5
1506	Décadiénal	0.5	1830	β -Damascone	0.4
1507	(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadiénal	0.3	1857	Géraniol	0.3
1548	(<i>E</i>)-2-Nonenal	0.5	1864	<i>p</i> -Cymèn-8-ol	0.2
1553	Linalol	1.2	1868	(<i>E</i>)-Géranyl acétone	3.8
1562	Octanol	1.9	4958	β -Ionone	3.4
1599	(<i>E,Z</i>)-2,6-Nonadiénal	0.4	2037	Salvia-4(14)-èn-1-one	0.3
1602	6-Méthyl-3,5-heptadièn-2-one	1.1	2084	Acide octanoïque	1.7
1612	β -Caryophyllène	0.7	2131	Hexahydrofarnesyl acétone	3.9
1638	β -Cyclocitral	0.8	2148	(<i>Z</i>)-3-Hexèn-1-yl-benzoate	1.1
1648	2,2,6,8-Tétraméthyl-7,11-dioxa tricyclo[6.2.1.0]-1,6-undec-4-ène	4.3	2179	3,4-Diméthyl-5-pentylidène-2(5H)- furanone	2.2
1655	(<i>E</i>)-2-Décenal	12.0	2192	Acide nonanoïque	3.9
1706	α -Terpinéol	8.8	2193	γ -Eudesmol	1.1
1715	(<i>E,E</i>)-2,4-Nonadiénal	0.3	2250	α -Eudesmol	0.6
1764	(<i>E</i>)-2-Undécenal	4.8	2257	β -Eudesmol	0.5
1779	(<i>E,Z</i>)-2,4-Décadiénal	0.7	2503	Acide dodécanoïque	1.6
1798	Méthylsalicylate	0.7	2670	Acide myristique	2.3
1804	Myrténol	0.3	2931	Acide hexadécanoïque	5.1
1815	2-Tridécane	0.5			
			Total		76.6

IRR: Indices de Réétention Relative calculés par rapport aux *n*-alcanes.

Cette étude révèle que l'huile contient aussi des quantités appréciables de 2,2,6,8-tétraméthyl-7,11-dioxatricyclo[6.2.1.0]-1,6-undec-4-ène, de nonanal, de (*E*)-géranyl acétone, β -ionone, d'acides nonanoïque et myristique, d'hexahydrofarnesyl acétone, et de 3,4-diméthyl-5-pentylidène-2(5H)-furanone [7].

IV.3. Activités biologiques des extraits d'*Arbutus unedo* L.

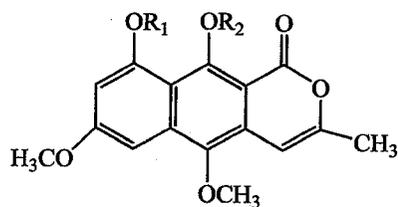
MEKHFI et coll. [8] ont montré que l'extrait aqueux des différentes parties de la plante possède une propriété anti-agrégante. Cette dernière peut être due aux composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les tanins et les flavonols.

D'autre part, KIVCAK et coll. [9] ont prouvé que les extraits éthanoliques et méthanoliques sont dotés d'une remarquable activité anti-oxydante qui est attribuable aux glucosides, aux flavonols et aux tanins.

L'activité anti-hypertensive a été étudiée aussi par MEKHFI et coll. [10]. Leurs travaux réalisés sur des rats wistar, en utilisant des extraits aqueux et méthanolique de feuilles d'*Arbutus unedo* L., a montré une forte activité vaso-relaxante due aux composés phénoliques, et principalement à la catéchine gallate.

Des travaux sur l'activité anti-microbienne ont été réalisés par FERRAZOLI DEVIENNE et coll. [11]. Ces tests sont menés, en utilisant la technique de micro-dilution spectrophotométrique, et en employant trois isocoumarines produites naturellement (paepalutine, paepalutine 9-O- β -D-glucopyranoside et paepalutine 9-O- β -D-allopyranosyl (1-6) glucopyranoside) et deux de leurs analogues semi-synthétiques 9,10-acétylé et 9-O-4-10-méthylaté, structurellement similaires à la paepalutine. Cette étude met l'accent sur l'activité accrue de la paepalutine contre les *Staphylococcus aureus*, les *Staphylococcus epidermidis* et l'*Escherichia faecalis*. Les quatre composés restant se sont avérés inefficaces contre tous les microorganismes testés à des concentrations de 500 μ g/mL. Ce résultat montre que des variations de la substitution phénolique à OH-9 et/ou OH-10, dans la molécule de paepalutine, conduisent à des composés sans activité antimicrobienne.

Les propriétés antimicrobiennes potentielles de la paepalutine sont dues à ses caractéristiques structurales notamment deux groupes phénoliques formant un arrangement en système oxygéné.



Paepalantine : $R_1=H, R_2=H$

Paepalantine-9-*O*- β -D-glucopyranoside : $R_1=Gly, R_2=H$

Paepalantine-9-*O*- β -D-allo pyranosyl-(1 \rightarrow 6) glucopyranoside :

$R_1= -Glc \text{---} \alpha \text{---} all, R_2=H$

9,10-dérivé acétylé : $R_1=Ac, R_2=Ac$

9-OH-10-dérivé méthylé : $R_1=H, R_2=Me$

Figure 21 : Structures chimiques des isocoumarines.

Références Bibliographiques

- [1] J. Fleurentin, Ethnopharmacologie et Aliments, l'approche ethnopharmacologique, Deuxième Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et XXIe Conférence Internationale d'Ethnopharmacologie, Heidelberg, 1993.
- [2] J.C. Dauguet, J.P. Foucher, Les flavonoïdes de *Arbutus unedo* L., Plante médicinales et phytothérapie, Tome XVI, N° 3, 1982, p. 185-191.
- [3] M. Agata, M. Pawlowska, A. Braca, Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 10, 1021.
- [4] F. A. Ayaz, M. Kucukislamoglu, M. Reunanen, Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) Fruits, *J. Food Comps. Analy.*, 2000, 13, 171-177.
- [5] Mehmet Musa, O. zcan, Haydar Haciseferogulları, The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents, *J. Food Engineering*, 2007, 78, 1022–1028.
- [6] Federica Bianchi, Maria Careri, Marilena Musci, Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree *Arbutus unedo* L. honey, characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Food Chem.*, 2005, 89, 527–532.
- [7] B. Kivcak, T. Mert, B. Demirci, Composition of the essential oil of *Arbutus unedo*, *Baser Chem. Nat. Comps.*, 2001, 37(5).
- [8] H. Mekhfi, M. El Haouari, A. Legssyer, M. Bnouhama, M. Aziz, F. Atmani, A. Remmal, A. Ziyat, Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, 2004, 94, 317–322.
- [9] A. Pabuccuoglu, B. Kivcak, M. Bas, T. Mert, Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves, *Fitoterapia*, 2003, 74, 597-599.
- [10] A. Legssyer, A. Ziyat, H. Mekhfi, M. Bnouham, C. Herrenknecht, V. Roumy, C. Fourneau, A. Laurens, J. Hoerter, R. Fischmeister, Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta, *Phytother. Res.*, 2004, 18, 889–894.

- [11] K. Ferrazoli Devienne, M.S. Gonçalves Raddi, R. Gomes Coelho, W. Vilegas, Structure antimicrobial activity of some natural isocoumarins and their analogues, *Phytomedicine*, 2005, 12, 378-381.

Chapitre V

Chapitre V : Les plantes & l'activité antimicrobienne

V.1. Introduction

Une substance antibiotique est un médicament qui a pour effet de tuer les bactéries de façon ciblée. Il se distingue d'un antiseptique qui détruit tout germe, et parfois même la cellule, de manière non ciblée.

De nos jours, beaucoup d'antibiotiques sont connus, mais leur surconsommation entraîne des résistances de certaines bactéries à certains d'entre eux, et même des multi-résistances (cas du staphylocoque doré). Ce phénomène rend à nouveau incurables les premières maladies traitées avec succès avec les antibiotiques.

Le mécanisme le plus probable de cette résistance est sans doute que l'antibiotique utilisé crée une sélection, qui favorise la sélection de mutations naturelles (même rares), qui confèrent à la bactérie une résistance à l'antibiotique en question et donc un avantage sélectif. Certaines bactéries (bactéries dites compétentes) sont capables d'intégrer de l'ADN exogène (présent dans le milieu) et donc d'acquérir potentiellement des gènes de résistances aux antibiotiques d'une autre espèce bactérienne [1].

V.2. Activité antimicrobienne des plantes

De nos jours, un grand nombre de composés issus de plantes sont utilisés en médecine moderne et une majorité de ceux-ci le sont selon leur usage traditionnel. Des 25 composés pharmaceutiques les plus vendus à travers le monde, 12 proviennent de produits naturels, mais jusqu'ici, environ seulement 10 % des 250 000 espèces de plantes inventoriées ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives [2].

2.1. Principaux groupes de composés antimicrobiens des végétaux

Depuis l'Antiquité, l'homme a utilisé les plantes pour leurs vertus bienfaites. Aujourd'hui, leurs principes actifs sont à la base de nombreux médicaments. Pour mémoire, l'aspirine (acide acétylsalicylique) provient à l'origine du saule (*Salix*) et a été synthétisée chimiquement.

Parmi les principales vertus des plantes, on peut citer : stimulant de la digestion, anti-inflammatoire, antalgique, antidiabétique, anti-cholestérol, tonique, antiparasitaire, antiseptique, antibactérien et antifongique.

Les principes actifs extraits des plantes dotés d'activité antimicrobienne peuvent être regroupés en plusieurs familles chimiques :

- les composés soufrés : thiosulfonates (allicine de l'ail) ;
- les aldéhydes : cinnamaldéhyde de la cannelle, cuminaldéhyde du cumin ;
- les phénols : thymol, menthol, carvacrol, eugénol etc... ;
- les terpènes : pinène, cymène etc... ;
- les tanins.

L'activité antimicrobienne est souvent considérée comme caractéristique des huiles essentielles [3,4]. Plusieurs études ont été réalisées sur les plantes pour déterminer, en général, les propriétés médicinales et en particulier les propriétés antimicrobiennes.

Tableau 9 : L'activité antibactérienne des plantes les plus remarquables.

Extrait plante	Principal composé	Germes sensibles	Références
Ail	Allicine	<i>Staphylococcus aureus, Salmonella, Bacillus typhosus, dysenteriae. Escherichia coli</i>	[5]
		<i>Candida albicans</i>	[6]
			[7]
Cannelle	Cinnamaldéhyde 90%	<i>Entérococcus faecalis, S. aureus, Listeria. Salmonella enteritidis, Campylobacter jejuni, E. coli, C. albicans, Aspergillus.</i>	[8,9]
			[10,11]
			[12]
Thym	Thymol	<i>S. aureus, Listeria, B. subtilis. E.coli, P. aeruginosa, S.pullorum, Yersinia. C.albicans</i>	[5]
	Carvacrol		[13,14,15]
Origan	Carvacrol 60% thymol 10%	<i>S. aureus, B. subtilis, E. coli, P. aeruginosa, S. pullorum, Yersinia, C. albicans.</i>	[16]
Clou de girofle	Eugénol 80 %	<i>E. coli, S. aureus, P. aeruginosa, K. pneumoniae, Listeria, S. enteritidis, C. jejuni</i>	[17,18]
		<i>C. albicans.</i>	[2]
			[16]

Récemment, CHEN et coll. [19] ont isolé une quinoline alcaloïdique qui manifeste une activité antimicrobienne considérable.

Les antimicrobiens phytochimiques sont de plusieurs types. Le tableau ci-dessous résume les différentes catégories de ces composés.

Tableau 10 : Les principales classes des composés antimicrobiens de végétaux.

Classe	Sous classe	Exemple
Polyphénols	Phénols simples	Catéchine Epicatéchine
	Acides phénoliques	Acide cinnamique
	Flavonoïdes et flavones	Chrysin Abyssinone
	Flavonoles	Totarol
	Tanins	Ellagitanins
	Coumarines	Warfarine
	Quinones	Hypéricine
Terpénoïdes et les huiles essentielles	//	Capsaïcine
Alcaloïdes	//	Berberine Pipérine

2.2. Quelques exemples de la littérature

2.2.1. Les composés phénoliques et polyphénols

Il a été récemment établi que les secoiridoïdes (oleuropéine et ses dérivés), une des classes principales des polyphénols contenus dans l'huile d'olive, empêche ou retarde la croissance d'une gamme de bactéries et de micro-champignons. Malheureusement, la littérature ne mentionne aucune donnée au sujet de l'usage possible de ces secoiridoïdes en tant qu'agents antimicrobiens contre les bactéries pathogènes chez l'homme.

Dans le cadre d'une étude menée par BISIGNANO et coll. [20], plusieurs souches bactériennes, des isolats cliniques et des agents causals des infections des systèmes gastro-intestinal ou respiratoire de l'homme ont fait l'objet d'un examen *in vitro* à l'égard de la susceptibilité à deux secoiridoïdes de l'olivier (*Olea europaea*), l'oleuropéine (le principe amer des olives) et l'hydroxytyrosol (dérivé de l'oleuropéine par l'hydrolyse enzymatique et responsable de la stabilité élevée d'huile d'olive).

Cette étude indique que les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues représentent une preuve d'une large activité antimicrobienne de l'hydroxytyrosol contre les souches bactériennes et les souches isolées en clinique. En outre, l'oleuropéine a également inhibé la croissance de plusieurs souches bactériennes et des agents causals des infections chez l'homme.

Ces résultats montrent que, outre l'emploi potentiel de ses principes actifs comme additifs alimentaires ou dans des programmes de prise en charge de parasites, *Olea europaea* peut être considéré comme une source potentielle d'agents antimicrobiens prometteurs pour le traitement des infections des systèmes gastro-intestinal ou respiratoire de l'homme [20].

D'autres exemples sont mentionnés dans la littérature [21-25]. C'est le cas des phénols qui sont bactéricides *vis-à-vis* des bactéries Gram (+) et Gram (-), parfois des mycobactéries, et non aucune activité *vis-à-vis* des spores bactériennes. De plus, l'acide caféique isolé du thym est efficace contre les virus, les bactéries et les mycètes [21-34].

2.2.2. Flavones, flavonoïdes et flavonols

Les flavonoïdes sont reconnus comme étant synthétisées par des plantes en réponse à l'infection microbienne [26]. Ce qui s'avère des substances antimicrobiennes efficaces contre une grande sélection de micro-organismes.

Les flavonoïdes les plus lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes [27]. C'est le cas de la catéchine qui se trouve dans le thé vert et qui exerce une activité antimicrobienne contre *Vibrio choléra* [28].

2.2.3. Effets antibactériens et antifongiques des composés phénoliques

Le potentiel antimicrobien de huit composants phénoliques isolés à partir du tourteau des olives a été examiné à l'égard de la croissance de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Les composants phénoliques incluaient les acides *p*-hydroxy benzoïque, vanillique, caféique, protocatéchique, syringique, et *p*-coumarique, l'oleuropéine et la quercétine.

Les acides caféique et protocatéchique ont empêché la croissance de *E. coli* et de *K. pneumoniae*. Les mêmes composants indépendamment de l'acide syringique ont complètement inhibé la croissance de *B. cereus*. D'autre part, l'oleuropéine, et les acides *p*-

hydroxy-benzoïque, vanillique et *p*-coumarique ont complètement inhibé la croissance de *E. coli*, de *K. pneumoniae* et de *B. cereus*.

Les acides vanillique et caféique ont inhibé la croissance et la production d'aflatoxine par *A. flavus* et *A. parasiticus*, tandis que l'inhibition complète a été atteinte avec les acides *p*-hydroxy-benzoïque, protocatéchique, syringique, et *p*-coumarique et de quercétine [29].

2.2.4. Activité antibactérienne des aldéhydes aliphatiques

Des travaux réalisés par BISIGNANO et coll. [30] ont montré que les aldéhydes aliphatiques à longue chaîne comme l'hexanal, le nonanal, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-heptenal, (*E*)-2-octenal, (*E*)-2-nonenal, (*E*)-2-décenal et (*E, E*)-2,4-décadienal sont actifs *in vitro* contre certaines souches bactériennes standard et fraîchement isolées. Ces dernières peuvent être des agents causals des infections des systèmes gastro-intestinal ou respiratoire de l'homme.

Il est à noter que les aldéhydes saturés étudiés ne montrent pas une activité antibactérienne significative, contrairement aux aldéhydes alpha-bêta insaturés qui possèdent un spectre antimicrobien large et manifestent une activité semblable contre les micro-organismes Gram-positifs et Gram-négatifs.

L'efficacité des aldéhydes étudiés semble dépendre non seulement de la présence d'une double liaison, mais également de la longueur de chaîne du groupe énal et du micro-organisme examiné [30].

Références Bibliographiques

- [1] P. Courvalin, H. Drugeon, J.P. Flandrois, F. Goldstein, Bactéricidie, Aspects théoriques et thérapeutiques, Maloine, Paris, 1990, p.110.
- [2] K. Rhayour, T. Bouchikhi, A. Tantaoui-Elaraki, The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *J. Essential Oil Res.*, 2003, 15(5), 356-362.
- [3] S.G. Deans, Evaluation of antimicrobial activity of essential (volatile) oils and waxes, Heidelberg, Spring-Verlag, 1991, 12, p. 209-221.
- [4] J. Clavin Kouokam, T. Jahns, H. Becker, Antimicrobial activity of essential oil and some isolated sulphur-rich compounds from *Scorodophloeus*, *Planta Med.*, 2002, 68, 1082-1087.
- [5] C.J. Cavallito, J.H. Bailey, Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, 66, 1950-1951.
- [6] J.F. Carson, Chemistry and biological properties of onions and garlic, *Food Rev. Int.*, 1987, 3, 71-103.
- [7] K.C. Srivastava, A. Bordia, S.K. Verma, Garlic (*Allium sativum*) for disease prevention, *South African J. Sci.*, 1995, 91, 68-77.
- [8] A. Smith-Palmer, J. Stewart, L. Fyfe, Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens, *Lett. Appl. Microbio.*, 1998, 26, 118-122.
- [9] D.A. Ates, O.T. Erdogru, Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts, *Turk. J. Biol.*, 2003, 27, 157-162.
- [10] S. Morozumi, Isolation, Purification and antibiotic activity of o-methoxy-cinnamaldehyde from cinnamon, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978, 36(4), 577-583.
- [11] A.L. Mahmoud, Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1994, 19(2), 110-113.
- [12] P.T. Tampieri, R. Galuppi, F. Macchioni, The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components, *Mycopathol.*, 2004, 10, 1-7.
- [13] S. Cosentino, C.I.G. Tuberoso. B. Pisano, In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1999, 29, 130-135.

- [14] H.J.D. Dorman, S.G. Deans, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, *J. Appl. Microbiol.*, **2000**, 88, 308-316.
- [15] S.A. Burt, R.D. Reinders, Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7, *J. Appl. Microbiol.*, **2003**, 36(3), 162.
- [16] R. Bassett, Traceability important in future of plant extracts, *Feed Mix*, **2000**, 8(6) 30-32.
- [17] B. Ouattara, R.E. Simard, R.A. Holley, Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms, *Int. J. Food Microbiol.*, **1997**, 2(3), 155-162.
- [18] G.G.F. Nascimento, J. Locatelli, P.C. Freitas, G.L. Silva, Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria, *Brazilian J. Microbiol.*, **2000**, 31, 247-256.
- [19] I.S. Chen, H.F. Chen, Y.L. Cheng, C.M. Teng, and I. Tsutomu, Quinoline alkaloids and other constituents of melicope semecarpifolia with antiplatelet aggregation activity, *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, 1143-1147.
- [20] G. Bisignano, A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Crisafi, N. Uccella, A. Saija, Activité antimicrobienne *in vitro* de l'oleuropéine et de l'hydroxytyrosol, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1999**, 51 (8), 971-974.
- [21] R. Wild, The Complete book of natural and medicinal cures, Rodale Press, inc Emmaus, **1994**, p. 13-97
- [22] A. Brantner, Z. Males, S. Pepeljnjak, A. Antolic, Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill., *J. Ethnopharmacol.*, **1996**, 52, 119-122.
- [23] M. Derrueu, Précis de géomorphologie, **1967**, p. 186-188.
- [24] M.T.L.P. Peres, F. D. Monache, A.B. Cruz, M.G. Pizzolatti, R.D. Yunes, Chemical composition and antimicrobial activity of *Crotonurucurana* Baillon, *J. Ethnopharmacol.*, **1997**, 56, 223-226.
- [25] R. A. Dixon, P. M. Dey, C. J. Lamb, Phytoalexins: Enzymology and molecular biology, *Adv. Enzymol.*, **1983**, 55, 197-206.
- [26] H. Tsuchiya, M. Sato, T. Miyazaki, S. Fujiwara, S. Tanigaki, M. Ohyama, T. Tanaka, M. Linuma, Comparative study on the anti-bacterial activity of phytochemical flavonones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Ethnopharmacol.*, **1996**, 50, 27-34.

-
- [27] R. P. Borris, Natural Products Research, Perspectives from a major pharmaceutical company, *J. Ethnopharmacol.*, **1996**, 51, 29-38.
- [28] N.H. Aziz, S.E. Farag, L.A Mousa, M.A. Abo-Zaid, Effets antibactériens et antifongiques comparatifs de certains composants phénoliques, *Microbios.*, **1998**, 93 (374), 43-54.
- [29] H.S. Tranter, S.C. Tassou, G.J. Nychas, Effet du composant phénolique extrait à partir des olives, Oleuropéine, sur la croissance et la production d'entérotoxines B de *Staphylococcus aureus*, *J. Appl. Bacteriol.*, **1993**, 74 (3), 253-259.
- [30] G. Bisignano, M.G. Lagana, D. Trombetta, S. Arena, A. Nostro, N. Uccella, G. Mazzanti, A. Saija, Activité antibactérienne *in vitro* de certains aldéhydes aliphatiques issus de *Olea europaea*, FEMS, *Microbiol. Lett.*, **2001**, 198 (1), 9-13.
- [31] Association des Pays de la Loire pour l'éviction des infections nosocomiales, étude épidémiologique multicentrique à *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline dans les hôpitaux de la région des Pays de la Loire, *BEH*, **1995**, 23, 105-106.
- [32] Working party of the british society for antimicrobial chemotherapy, the hospital infection society and the infection control nurses association, Revised Guidelines for the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in hospital, *J. Hosp. Inf.*, **1998**, 39, 253-290.
- [33] A. Le Coustumier, P. Gueudet, E. Lecaillon, S. Bland, B. Hanesse, Collège de bactériologie, virologie et hygiène des hôpitaux de France, Incidence de *Staphylococcus aureus* méthicilline résistant dans 95 hôpitaux non universitaires en France, **1996**, 26, 634-643.
- [34] J.H.T. Wagenvoort et M. Kepers-Rietrae, Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA) dans la population générale, *Euro surveillance*, **1997**, 2, 96.

Chapitre VI

Chapitre VI : Etude Chimique & biologique de *Arbutus unedo* L.

VI.1. Introduction

Les substances actives des plantes médicinales sont de deux types:

- Les produits du métabolisme primaire, les acides nucléiques, les lipides, les protéines, les acides aminés et essentiellement les saccharides, substances indispensables à la vie de la plante et, qui se forment dans toutes les plantes vertes grâce au phénomène de photosynthèse.
- Les produits du métabolisme secondaire formés essentiellement de l'assimilation de l'azote. Les techniques particulières de la chimie qualitative et quantitative permettent de dépister et de doser la présence de telle ou telle substance en très faible quantité et, qui sont souvent inutiles pour la plante, mais leurs effets thérapeutiques sont en revanche remarquables.

Dans cette partie du travail, nous nous sommes proposé de contribuer à l'étude chimique de *Arbutus unedo* L., une plante bien connue dans la région de Tlemcen par ces vertus thérapeutiques. Pour ce faire, nous avons eu recours à des méthodes de dosages, d'extractions sélectives, de purifications et de caractérisations par les méthodes spectroscopiques (RMN ^1H et ^{13}C , RMN 2D, IR, T_f, ESI/SM, CLHP etc.). Enfin, nous avons complété notre étude par une évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits obtenus par des solvants de polarités différentes et par chromatographie sur colonne.

VI.2. Etude chimique

2.1. Examen phytochimique de *Arbutus unedo* L.

Plusieurs tests chimiques facilement réalisables dans des tubes à essais, nous ont permis de prendre connaissance des différents produits du métabolisme secondaires présents dans les parties étudiées de l'*Arbutus unedo* L. Les tests réalisés sont résumés ci-dessous :

- Chapitre VI : Etude Chimique & biologique de *Arbutus unedo* L. -

- La présence des saponosides est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse (méthode de la Pharmacopée française). Leur présence est en faible quantité dans les feuilles et les fruits.

- Les chlorures ferriques aqueux à 1 % révèlent, pour les différentes parties de la plante, des taches vert foncé et gris noir indiquant la présence des tanins catéchiqes, des flavonoïdes et d'acides phénols dans les extraits méthanolique.

- La présence de composés flavoniques dans les différents organes de l'*Arbutus unedo* L., est prouvée par action du chlorure d'aluminium dans l'alcool 95%. En effet, après examen sous lumière UV, l'apparition des taches de couleur jaune, jaune vert et ocre confirment le test.

- Une macération de 3 minutes au bain-marie de la matière végétale avec du propanol chlorhydrique à 1% donne une forte coloration rouge due aux anthocyanes. La révélation se fait avec la vanilline chlorhydrique 1% qui montre une traînée rose dans l'extrait méthanolique indiquant ainsi la présence de catéchols ou des anthocyanes.

- En milieu alcalin aqueux la solution étherique donne un test positif révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orange, rouge au violet indiquant la présence des anthracénosides dans les différentes parties de la plante [1].

Les résultats du screening phytochimique de *Arbutus unedo* L. sont regroupés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Métabolites secondaires des différents organes de *Arbutus unedo* L.

Composés	Partie étudiée				
	Racines	Rameaux	Tiges	Feuilles	Fruits
Saponosides	-	-	-	+	+
Tanins	+++	+++	+++	+++	+++
Flavonoïdes	+++	+++	+++	+++	+++
Anthocyanosides	+++	+++	+	-	+++
Anthracénosides	+	+	+	+	+

(-) : test négatif, (+) : test faiblement positif, (+++): test fortement positif

Les essais préliminaires montrent l'absence de saponosides dans les racines, les rameaux et les tiges, par contre sont présents sous forme de trace dans les feuilles et les fruits. Les essais nous montrent aussi la présence de substances polyphénoliques (anthocyanes, acides-phénols, flavonoïdes et tanins catéchiques). Pour confirmer nos résultats, nous avons entrepris une étude plus approfondie de certains de ces constituants.

2.1.1. Les saponosides

Les saponosides sont des hétérosides naturels dont la matière est un composé soluble dans l'eau qui la rend moussante comme une eau de savon. Ils modifient la tension superficielle de l'eau [2].

- Détermination qualitative

Une approche qualitative sur des extraits méthanoliques se fait par CCM en utilisant comme mélange éluant AcOEt/MeOH/H₂O : 6/3/1. La révélation est réalisée avec une solution de vanilline sulfurique [3]. Cette dernière donne une coloration rose violette témoignant de la nature triterpénique des saponosides. Ils sont présents surtout dans les feuilles et les fruits et absents dans les autres organes.

Tableau 12 : Caractéristiques chromatographiques des saponosides.

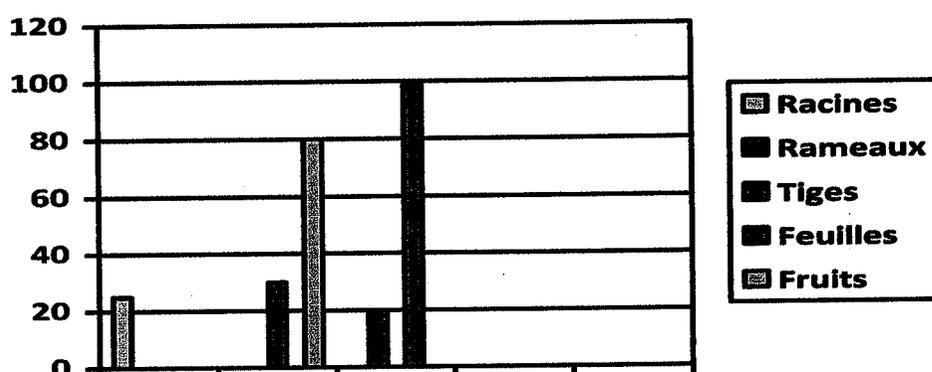
Organes	Fluorescence sur CCM			
	Avant révélation	R _f	Après révélation	Intensité
Racines	Jaune	0.58	Vert	/
	Rouge	0.33	Gris noir	/
Rameaux	Jaune	0.62	Vert	/
	Bleu violet	0.50	Vert	/
	Rouge	0.32	Gris noir	/
Tiges	Jaune	0.80	Vert	/
	Bleu violet	0.22	Gris noir	/
Feuilles	Vert	0.54	Gris noir	/
	Vert	0.28	Rose violet	Faible
Fruits	Rouge	0.88	Rose violet	Faible

- Détermination quantitative

Les résultats obtenus sur les différents organes de l'*Arbutus unedo* L. sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 13 : Indice de mousse des différents organes de l'arbousier.

Indice	Partie étudiée				
	Racines	Rameaux	Tiges	Feuilles	Fruits
Indice de	25	20	30	100	80
Mousse	± 3	± 2	± 1	± 6	± 6



Histogramme 1 : Indice de mousse dans les différents organes de l'arbousier.

Les analyses qualitatives et quantitatives montrent la présence des saponosides dans les feuilles et dans les fruits et confirme leur absence dans les racines, les rameaux et les tiges.

2.1.2. Les flavonoïdes totaux

Les polyphénols possèdent plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (OH alcoolique, carboxyle etc...). Dans cette catégorie, nous trouvons de nombreuses substances : les noyaux simples en C6-C1 et C6-C3, les noyaux dérivant de l'extension du phényl propane, en C6-C3-C6, comme les chalcones, les flavones, les flavonols ou les dérivés du flavane ou du flavane-3-ol (catéchines et proanthocyanidines). Toutes ces substances ont une voie de biosynthèse commune et sont appelées flavonoïdes, au sens large du terme [4].

- Dosage qualitatif

Une séparation préliminaire est d'abord effectuée par chromatographie sur couche mince. La révélation se fait à 365 nm après pulvérisation avec le réactif de Neu (2-amino-éthyl diphenyl borate) 1% dans du MeOH pur.

Tableau 14 : Caractéristiques chromatographiques des flavonoïdes.

Organes	Fluorescence sur CCM			
	Avant révélation	R _f	Après révélation	Intensité
Racines	Jaune	0.88	Bleu violet	Intense
	Jaune	0.82	Jaune vert	Intense
	Rouge	0.42	Jaune orange	Faible
Rameaux	Jaune	0.88	Bleu violet	Moyenne
	Jaune	0.84	Jaune vert	Intense
	Rouge	0.38	Vert	Intense
	Rouge	0.24	Bleu violet	Faible
Tiges	Jaune	0.84	Jaune orange	Moyenne
Feuilles	Vert	0.52	Vert	Moyenne
	Vert	0.11	Bleu violet	Intense
Fruits	Rouge	0.88	Jaune orange	Faible
	Rouge	0.62	Jaune orange	Intense
	Rouge	0.33	Jaune vert	Faible

L'analyse qualitative après CCM, révélation au réactif de Neu et visualisation sous UV, permet de mettre en évidence de nombreuses fluorescences (en particulier : R_f = 0.38, verdâtre ; R_f = 0.42, jaune orange ; R_f = 0.24, bleu violet ; R_f = 0.82 et 0.84, jaune verdâtre surtout pour les parties souterraines.

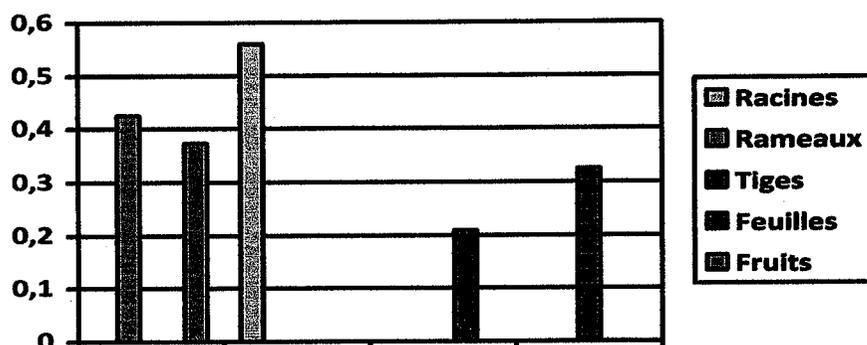
Dans le cas des racines, des rameaux et des feuilles, nous observons aussi une fluorescence bleue violette (R_f = 0.88 et 0.11) très nette. Les tiges et les fruits contiendraient principalement des flavones et flavonols, alors que les racines, les rameaux et les feuilles contiendraient des acides ou des esters phénoliques ainsi que des flavones et des flavonols.

- Dosage quantitatif

Les flavonoïdes sont dosés, à partir d'un extrait alcoolique, par spectrophotométrie du complexe formé avec le réactif de Neu. Le pourcentage des flavonoïdes totaux est alors calculé en équivalent quercétol.

Tableau 15 : Teneurs moyennes en flavonoïdes totaux dans l'*Arbutus unedo* L.

Composés	Partie étudiée				
	Racines	Rameaux	Tiges	Feuilles	Fruits
F=Flavonoïdes	0.561	0.425	0.324	0.209	0.373
Totaux (%)	± 0.003	± 0.001	± 0.004	± 0.006	± 0.004



Histogramme 2 : Teneur en flavonoïdes dans les organes de l'arbousier.

Les résultats de l'analyse quantitative montrent que les racines, les fruits et les rameaux sont les plus riches en flavonoïdes totaux.

2.1.3. Les anthocyanes

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des auronnes et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et fruits [5].

- Dosage qualitatif

L'hydrolyse acide permet d'obtenir, après rupture des liaisons -C-O-C- présentes dans les hétérosides, les aglycones flavoniques et les anthocyanidols [6].

Les CCM effectuées à partir de l'extrait de la phase butanolique montrent l'existence de deux bandes majoritaires (tableau 16) de coloration pourpre et rouge dans le cas des racines, des rameaux et des fruits de l'*Arbutus unedo* L.,

Tableau 16 : Caractéristiques chromatographiques des anthocyanes.

Organes	Fluorescence sur CCM			
	Avant révélation	R _f	Après révélation	Intensité
Racines	Rouge	0.31	Pourpre	Intense
	Rouge	0.48	Rouge	Intense
Rameaux	Rouge	0.32	Pourpre	Intense
	Rouge	0.50	Rouge	Intense
Tiges	Jaune	0.48	Rouge	Intense
Feuilles	/	/	/	/
Fruits	Rouge	0.33	Pourpre	Intense
	Jaune	0.49	Rouge	Intense

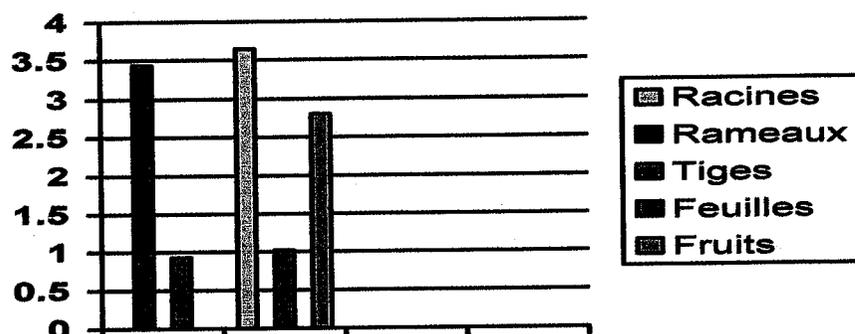
Les CCM des racines, des rameaux et des fruits mettent en évidence deux bandes majoritaires de coloration pourpre (R_f=0.31) et rouge (R_f=0.48) correspondant respectivement au delphinidol et au cyanidol. Cette caractérisation est effectuée en comparaison avec l'arganier (*Argania spinosa*) dont les deux anthocyanidines majoritaires sont connues notamment la delphinidine et la cyanidine et aussi en comparant leurs propriétés physiques (couleur et R_f) avec celles données dans la littérature [7,8]. Des traces sont aussi présentes dans les tiges. Par contre, ils sont totalement absents dans les feuilles.

- Dosage quantitatif

Au cours de cette opération, la récolte est réalisée sur des arbres jeunes et vieux. Les échantillons sont examinés à l'état frais. L'ensemble des organes présente une teinte rougeâtre assez accentuée surtout pour les racines et les rameaux.

Tableau 17 : Teneurs moyennes en anthocyanes dans l'*Arbutus unedo* L.

Composés	Partie étudiée				
	Racines	Rameaux	Tiges	Feuilles	Fruits
T= Anthocyanes (mg/g)	3.65 ± 0.15	3.44 ± 0.30	1.02 ± 0.10	0.93 ± 0.21	2.80 ± 0.01



Histogramme 3 : Teneur en anthocyanes dans les organes de l'arbousier.

Le dosage des anthocyanes met en évidence des quantités importantes dans les racines, les rameaux et les fruits. Les tiges en contiennent des traces, alors qu'elles sont presque absentes dans les feuilles.

2.1.4. Les flavones et flavonols

- Dosage qualitatif

Le screening phytochimique de *Arbutus unedo* L. a montré la présence de divers métabolites secondaires dont les flavonoïdes.

Sous UV, les analyses effectuées révèlent différentes fluorescences correspondant à des hétérosides flavoniques (les flavonols, les flavones et les acides phénols). Ces métabolites jouent des rôles très importants dans la pigmentation des fruits, la protection des plantes contre les herbivores, contre les radiations U.V etc... De plus, ce sont des antihépatotoxiques, anti-allergiques, antioxydants, anti-inflammatoires, antiviraux, anti-tumoraux, anticancéreux et anti-spasmodiques [9].

Tableau 18 : Caractéristiques chromatographiques des flavones et flavonols.

Organes	Fluorescence sur CCM			
	Avant révélation	R _f	Après révélation	Intensité
Racines	Rouge	0.35	Jaune brun	Intense
Rameaux	Rouge	0.28	Jaune brun	Intense
	Jaune	0.54	Jaune brun	Intense
Tiges	/	/	/	/
Feuilles	Vert	0.28	Jaune brun	Intense
	Jaune	0.56	Jaune	Faible
Fruits	Rouge	0.42	Jaune brun	Intense
	Jaune	0.64	Jaune	Intense

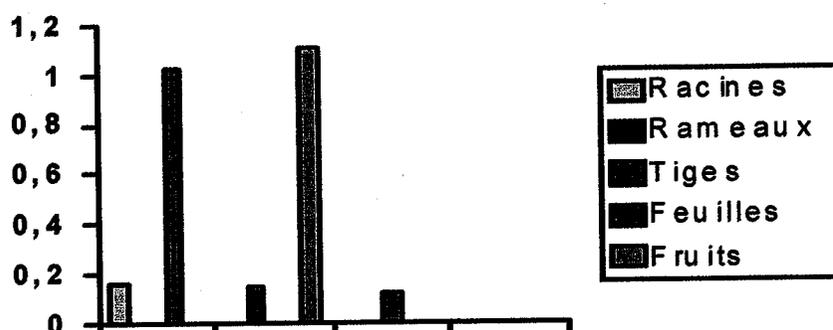
À 365 nm deux spots fluorescents jaunes bruns sont observés sur les chromatogrammes. Après exposition aux vapeurs de NH₃, les taches jaunes brunes s'intensifient en faveur de la présence de flavonols et flavones.

- Dosage quantitatif

La teneur des aglycones flavoniques est déterminée après hydrolyse acide (HCl 1N pendant 2 h à TA). La teneur en flavonoïdes totaux est alors calculée en équivalent quercétol.

Tableau 19 : Teneurs moyennes en aglycones flavoniques dans l'*Arbutus unedo* L.

Composés	Partie étudiée				
	Racines	Rameaux	Tiges	Feuilles	Fruits
T= Aglycones	0.168	0.146	0.115	1.028	1.10
flavoniques (mg/g)	± 0.002	± 0.006	± 0.057	± 0.015	± 0.108



Histogramme 4 : Teneur en flavones et flavonols dans les organes de l'arbousier.

Les feuilles et les fruits possèdent une teneur en aglycones flavoniques plus importante par rapport aux rameaux. Dans les tiges et les racines, ces métabolites existent en moindre quantité.

Le screening phytochimique de l'*Arbutus unedo* L. nous permet de tirer les conclusions suivantes :

- La plante est riche en polyphénols (flavonoïdes, tanins et aglycones flavoniques).
- Les tiges, les rameaux et les racines ne sont pas très riches en aglycones flavoniques et ne contiennent pas les saponosides.

Ce résultat montre la grande richesse de la plante étudiée en polyphénols, produits naturels antioxydants, à intérêt considérable dans le domaine pharmacologique.

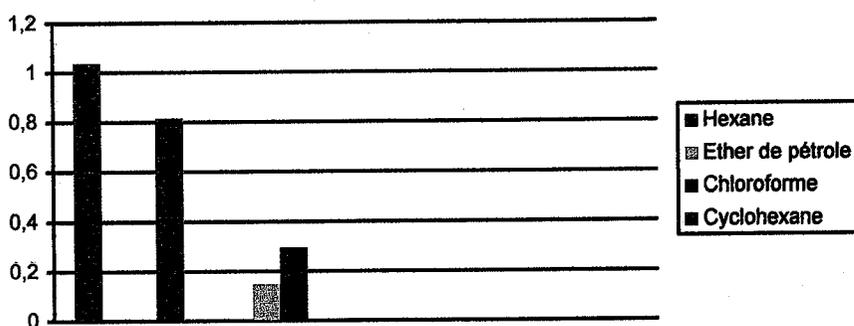
Les tests réalisés apportent une contribution à la connaissance phytochimique de la l'*Arbutus unedo* L. et permettent ainsi, de mieux comprendre les propriétés pharmacodynamiques des extraits de cette plante. Il est donc très intéressant de les exploiter pour la recherche de ses principes actifs, responsables de ces propriétés pharmacologiques.

2.2. Dégraissage du matériel végétal

Dans le cas général, le matériel végétal renferme souvent des quantités appréciables de graisses, mais aussi de cires, de terpènes, de pigments et d'autres substances lipophiles qui peuvent perturber le processus extractif, notamment en induisant la formation d'émulsions. Ces problèmes techniques peuvent être totalement évités en procédant à un dégraissage préalable de la matière végétale [1].

Tableau 20 : Dégraissage des racines par différents solvants.

Solvants	Chloroforme	Ether de pétrole	Cyclohexane	Hexane
Rendement (%)	0.30	0.15	0.82	1.04

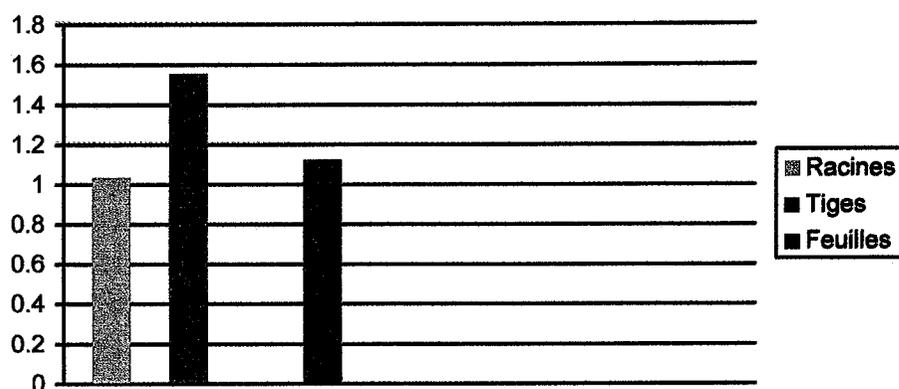


Histogramme 5 : Résultat du dégraissage de la matière végétale.

Le solvant choisi pour le dégraissage des racines et des tiges, est l'hexane. En effet, ce solvant permet d'extraire une quantité importante de matières grasses, comparé au chloroforme, à l'éther diéthylique et au cyclohexane.

Tableau 21 : Rendements du dégraissage des racines, des tiges et des feuilles par l'hexane.

Organes	Racines	Tiges	Feuilles
Rendement (%)	1.04	1.13	1.56



Histogramme 6 : Résultats du dégraissage de l'*Arbutus unedo* par l'hexane.

D'après ce graphe, nous notons que les feuilles contiennent plus de matière grasse que les racines et les tiges.

2.3. Analyse par CLHP des extraits bruts des tiges et des racines

Les polyphénols sont des molécules très polaires qui sont solubles dans les solvants tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétone. Leur solubilité dépend de leur degré de polymérisation. Les tanins à faible DPM (<6) sont solubles dans l'éthanol et le méthanol, ceux à DPM plus élevé (>6) sont solubles dans Acétone/H₂O : 75/25 (v/v). Leur extraction et leur fractionnement, à partir des racines et des tiges, se basent sur cette particularité [1].

L'extrait brut, obtenu comme décrit au chapitre VII.3, contient des tanins mais aussi des acides phénoliques et des composés polaires (anthocyanes, flavanols, polysaccharides etc.). Les deux figures ci-dessous (Figure 22 et Figure 23) représentent les chromatogrammes des extraits bruts des racines et tiges injectés sur une phase normale en utilisant le programme CLHP [10,11].

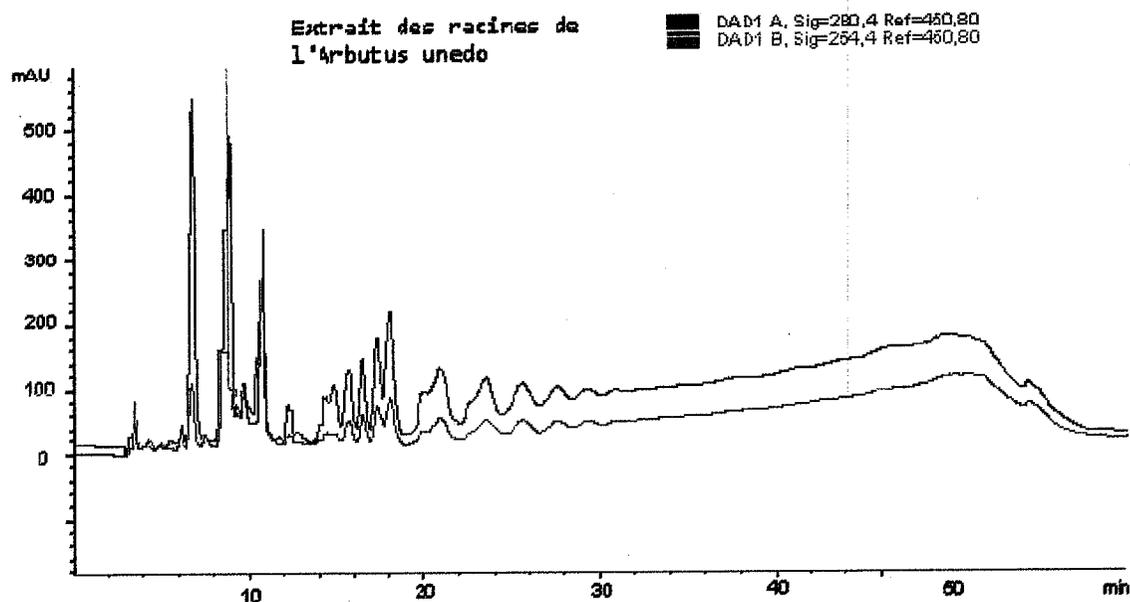


Figure 22 : Chromatogramme UV (280 et 254 nm) des racines.

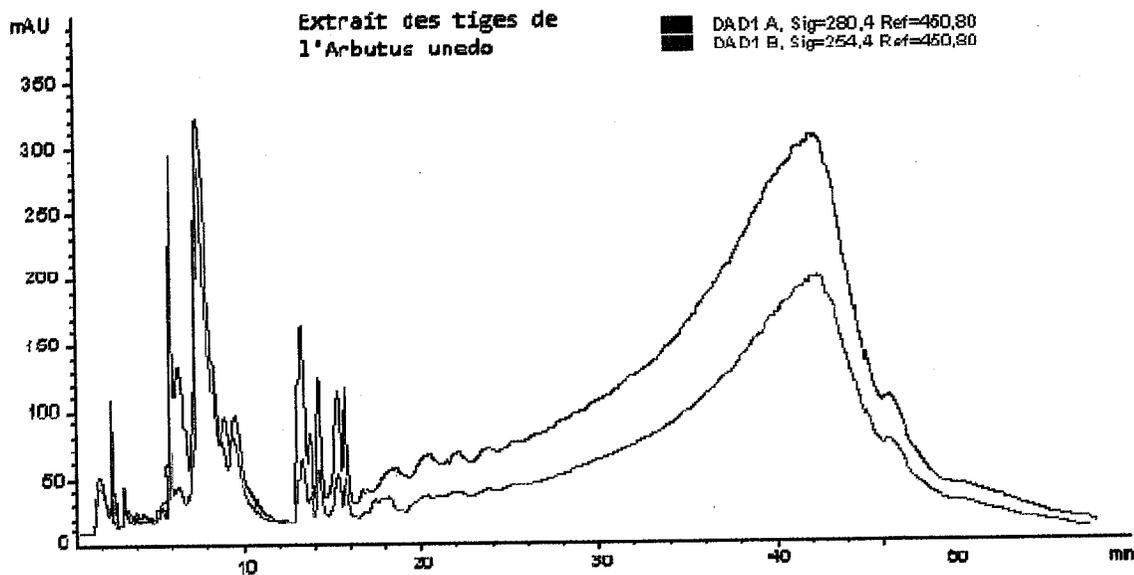


Figure 23 : Chromatogramme UV (280 et 254 nm) des tiges.

La première partie du chromatogramme (0-11 min.) correspond, entre autre, aux composés phénoliques simples, comme les flavonols, les acides phénoliques et les anthocyanes. La deuxième partie (12-19 min.) montre une série de larges pics non résolus pouvant être attribués à la catéchine, l'épicatéchine, l'épicatéchine-*O*-gallate, ou aux proanthocyanidines dimériques. Il est à noter que plus le poids moléculaire augmente, moins la séparation des pics est bonne. De ce fait, la troisième partie du chromatogramme (20-70 min) correspond aux oligomères et aux polymères éluant sous la forme d'un large pic irrésolu.

La principale différence entre le chromatogramme des tiges et celui des racines réside dans le rapport plus élevé entre les tanins oligomériques par rapport aux tanins polymériques dans l'extrait des racines. La séparation de ces composés par CLHP est très difficile due au grand nombre d'isomères et de dérivés possibles pour chaque polymère. La présence d'esters galliques complique énormément l'analyse de ces molécules, car leur diversité augmente considérablement.

L'analyse des tanins par CLHP est largement décrite dans la littérature, mais n'apporte aucune solution à la séparation d'extraits taniques de l'*Arbutus unedo* composés de proanthocyanidines et (ou) de proanthocyanidines galloylées [11,12,13].

2.4. Fractionnement des tanins oligomériques des racines par ESI-MS

L'étude de la fragmentation des proanthocyanidines oligomériques est réalisée en infusant une solution très diluée de tanins. La figure 24 représente le spectre ESI-MS de la fraction oligomérique F6 (m=343 mg) obtenue après élution de l'extrait brut des racines en utilisant un mélange EtOH/H₂O et MeOH (Voir VII-4, tableau 58).

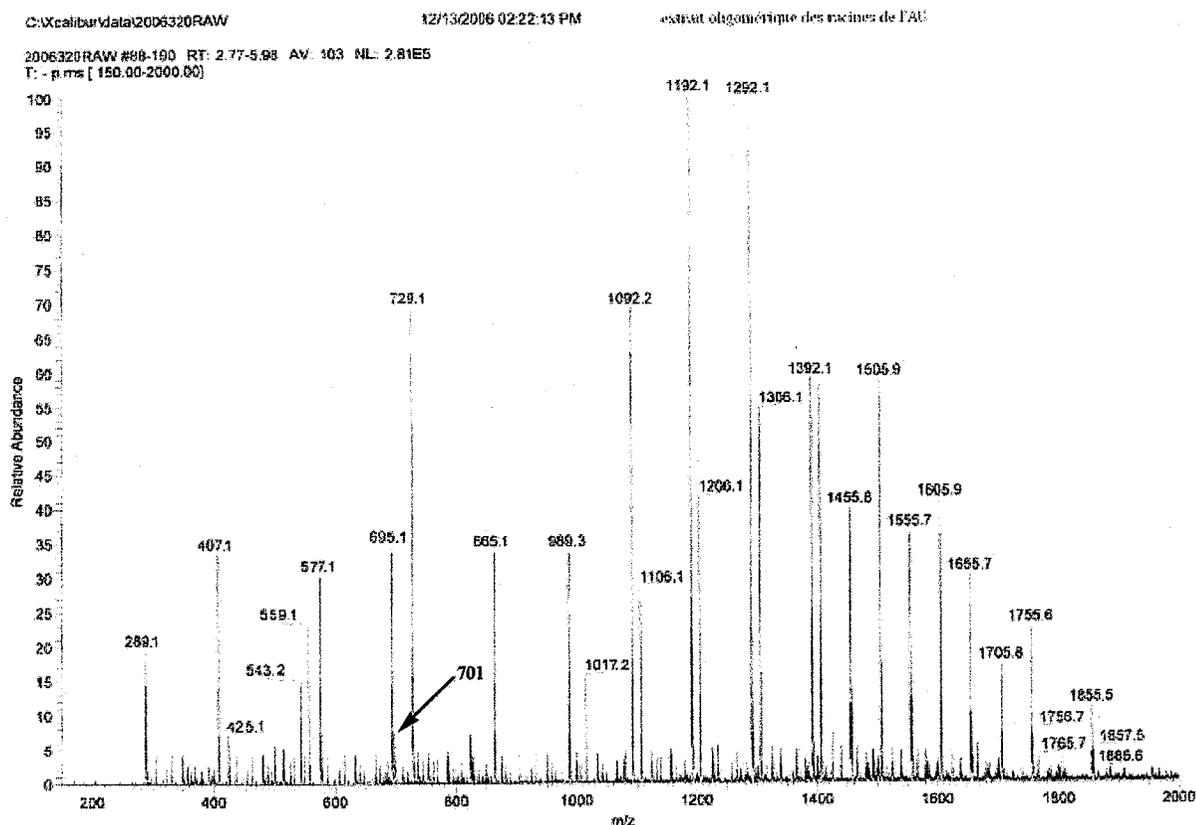


Figure 24 : Spectre ESI-MS des racines.

Pour mieux comprendre en évitant toute confusion, nous avons nommé le dimère : DP2, avec DP signifiant degré de polymérisation et le numéro 2 se rapportant au nombre d'unités du polymère. D'après cette nomenclature les dimères galloylé, digalloylé et phloroglucinole seront nommés respectivement DP2G, DP2G2 et DP2F.

Les mécanismes de fragmentation des différents dimères obtenus à partir du spectre ESI-MS cités ci-dessus sont représentés sur les figures 25, 26 et 27 :

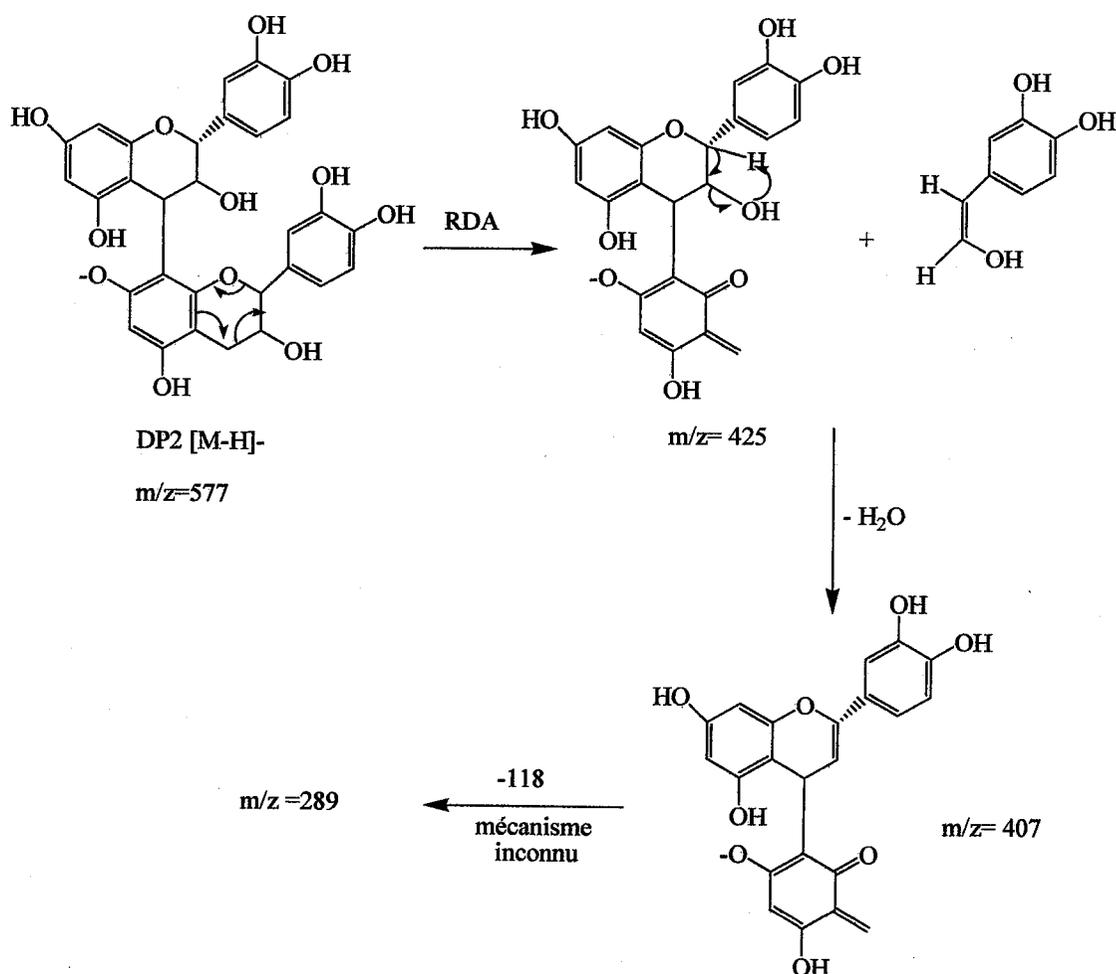


Figure 25 : Mécanisme de la fragmentation du dimère (DP2).

Le dimère DP2 (m/z 577 [M-H]⁻) subit d'abord une fragmentation du type rétro DIELS-ALDER (RDA) [14,15,16], qui a la particularité d'impliquer, non plus des électrons, bien décrit dans les mécanismes EI, mais des paires d'électrons, conduisant ainsi à une perte de 152 uma. L'ion ainsi formé (m/z 425) perd une molécule d'eau par un mécanisme simple de déshydratation décrit par W. FRIEDRICH [10,17]. Pour la dernière fragmentation aucune recherche nous nous a permis d'élucidée son mécanisme. La même étude est appliquée pour le dimère galloylé DP2G (m/z 730).

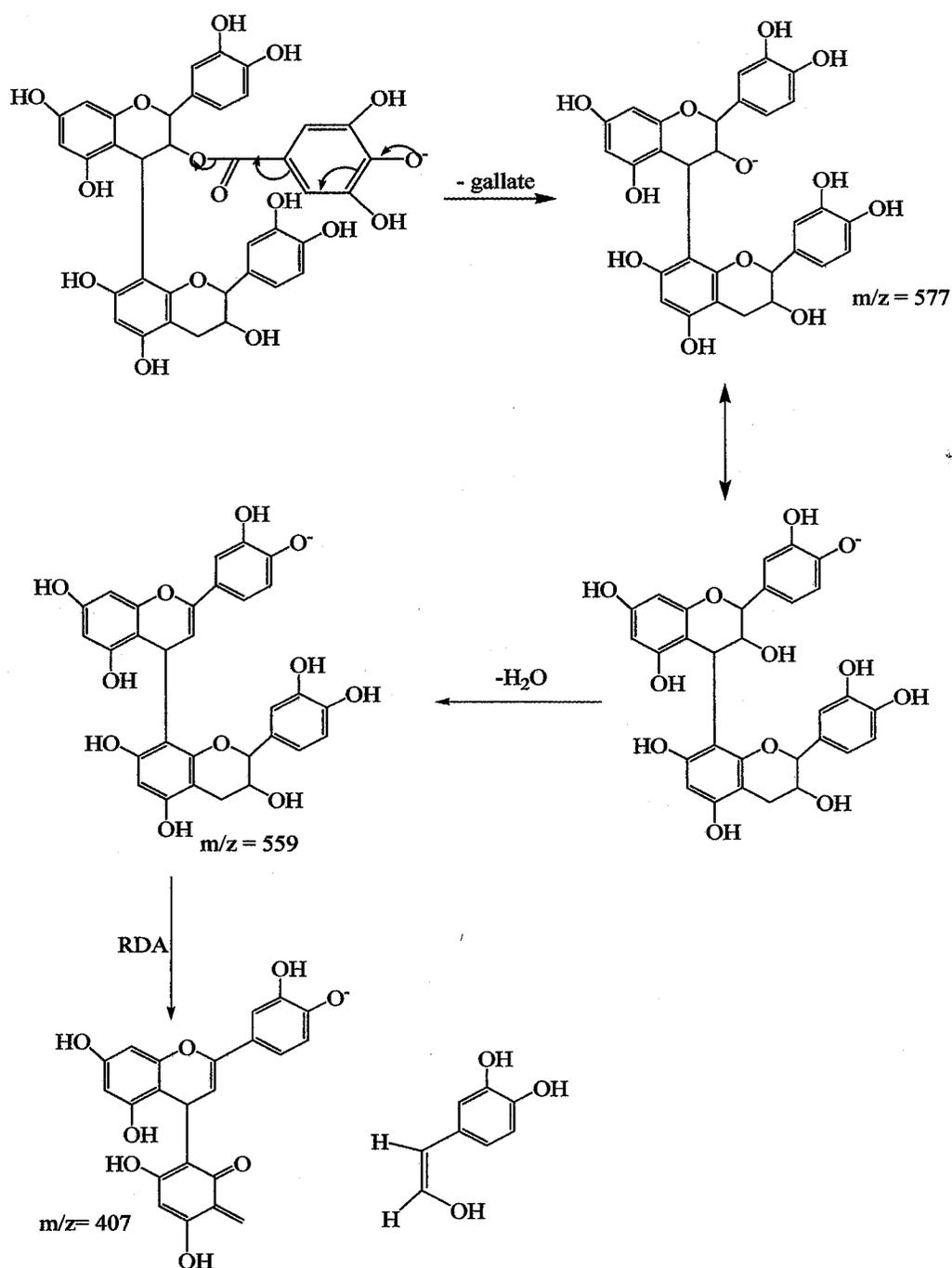


Figure 26 : Mécanisme de la fragmentation du dimère galloylé (DP2G).

Le dimère galloylé DP2G (m/z 729 [M-H]⁻) subit, premièrement, la perte de l'acide gallique [M-H-152]⁻ pour obtenir le dimère DP2 et deuxièmement, la déshydratation avant la réaction RDA [10]. Une étude similaire est appliquée pour dimère phloroglucinoles [DP2F (m/z 701)].

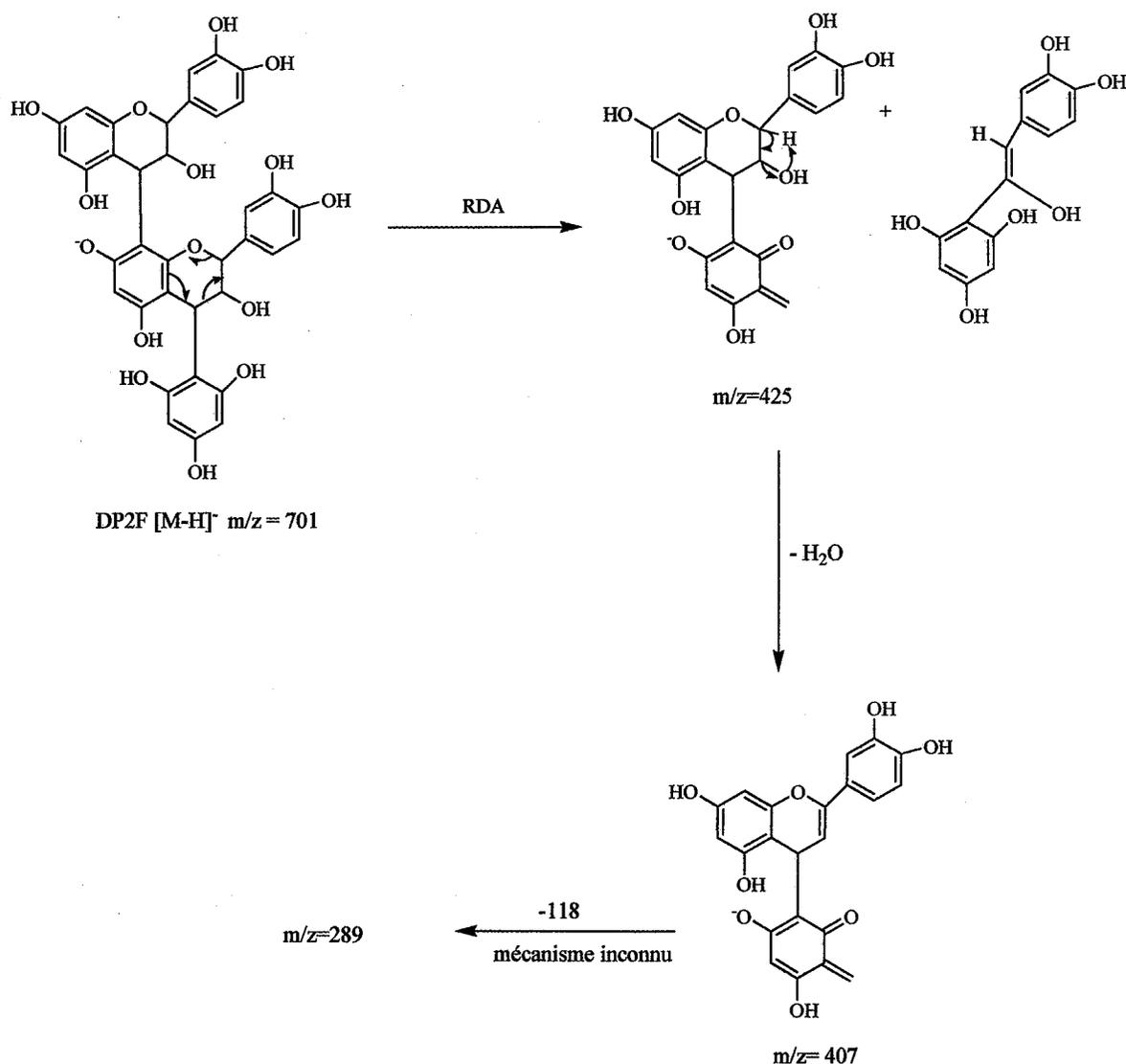


Figure 27 : Mécanisme de la fragmentation du dimère phloroglucinole (DP2F).

De la même façon que DP2, le dimère DP2F (m/z 701) [M-H]⁻) subit d'abord une fragmentation du type RDA conduisant ainsi à une perte de 276 uma. L'ion ainsi formé (m/z 425) perd une molécule d'eau selon un mécanisme de déshydratation.

Nous avons analysé de la même façon les trimères DP3, DP3G et DP3F. Le tableau 22 ci-dessous résume les différentes fragmentations de ces composés.

Tableau 22 : Enumération des différents fragments obtenus pour les dimères et les trimères.

Composés	[M-H] ⁻	Frag. 2	Frag. 3	Frag. 4	Frag. 5
DP2	577	425*	407	289	/
DP3	865	577	425*, 407*, 289	/	/
DP3	865	695*	543*	525	/
DP2G	729	577	559	407*	289
DP3G	1017	729	577	559, 407*	/
DP2F	701	425*	407	289	/
DP3F	989	701	425*	407	289

* correspond à une fragmentation RDA

La fragmentation du trimère DP3 peut suivre deux chemins possibles [10] :

- Le premier montre une perte d'une unité catéchique pour obtenir le dimère à m/z 577, aussi trois ions sont détectés sur le spectre à m/z 425, 407 et 289 dont l'apparition à m/z 425 et 407 semble très nette sur la figure 24. Ce qui nous a permis de déduire la troisième défragmentation (Frag3).

- Le second chemin suit une première réaction RDA, puis une perte d'une molécule d'eau en donnant ainsi un ion à m/z 695, puis une seconde réaction RDA formant un ion à m/z 543, suivie d'une déshydratation à m/z 525.

Concernant le trimère galloylé DP3G, nous mentionnons qu'il ne subit qu'une seule voie de fragmentation. Il perd d'abord une unité catéchique pour former le dimère galloylé DP2 à m/z 729. L'ion à m/z 577 détecté au niveau du spectre nous indique la perte de l'acide gallique pour former le dimère DP2. Finalement, les ions à m/z 559 et 407 correspondent à une déshydratation suivie d'une réaction RDA.

Le trimère phloroglucinole DP3F ne montre aussi qu'une seule voie de fragmentation. Il perd d'abord une unité catéchique pour former le dimère galloylé DP2F à m/z 701. Aussi les ions à m/z 425 et 407 correspondent à une réaction RDA suivie d'une déshydratation.

D'après l'analyse de ce spectre, nous remarquons que les mécanismes de fragmentations sont toujours semblables pour les proanthocyanidines oligomériques. De plus, nous pouvons supposer qu'il existe 5 mécanismes de fragmentation pour ce type de composés :

- La fragmentation rétro DIELS-ALDER (perte de 152 ou 276 uma) ;
- La déshydratation (perte de 18 uma) ;
- La perte de l'acide gallique à partir des proanthocyanidines galloylées correspondant à 152 uma ;
- Une perte de 118 uma non caractérisée.
- Perte d'une unité monomérique [M-288].

2.5. Extraction et caractérisation des proanthocyanidines.

2.5.1. Les proanthocyanidines dans les tiges

Cette partie de l'étude traite l'extraction des tiges d'*Arbutus unedo* L. par un mélange de solvants H₂O/MeOH/Acétone à reflux. Après traitement du mélange final, nous avons obtenu une masse de 0.9 g en produit brut (0.3%). Cette opération est suivie d'un premier fractionnement qui nous a permis la séparation de six fractions notées F1, F2, F3, F4, F5 et F6. L'élution est réalisée par un mélange CH₂Cl₂/MeOH. Nous avons soumis, ensuite, la fraction polymérique F6 à un second fractionnement sur couche épaisse (préparative) en employant comme éluant un mélange *n*-C₆H₁₂/Acétone/H₂O : 6/3/1 contenant quelques gouttes d'une solution d'acide acétique 1%. Il en résulte trois nouvelles fractions désignées par AUT1, AUT2 et AUT3. Le tableau ci-dessous résume le résultat du fractionnement de F6 dans les conditions citées ci-dessus :

Tableau 23 : Séparation de la fraction F6 par chromatographie sur colonne.

Aspect physique	Masse utilisée (g)	Chromatographie sur colonne				
		Composé	Masse (g)	Rdt (%)	Tf (°C)	R _f
Solide jaune	1.0	AUT1	0.38	38	240	0.84
		AUT2	0.26	26	247	0.60
		AUT3	0.18	18	248.6	0.45

Nous avons entrepris ensuite la caractérisation spectrale des trois fractions AUT1, AUT2 et AUT3 en employant différentes techniques d'identification telle que IR, RMN ¹H et ¹³C ainsi que la spectrométrie de masse.

- Analyses spectroscopiques

• AUT1

Le spectre IR (Voir annexe 1) de AUT1, solide jaunâtre, est enregistré dans le domaine compris entre 4000 et 500 cm^{-1} . Il montre principalement les vibrations d'élongation de la liaison C-H entre 2955 et 2854 cm^{-1} . Nous notons la présence d'une bande intense située à 3363 cm^{-1} correspondante aux vibrations d'élongation de O-H d'un alcool.

La réponse caractéristique des éthers est associée à l'élongation du système C-O-C. En effet, il y a une bande d'élongation symétrique vers 1031 cm^{-1} et une autre bande d'élongation asymétrique forte vers 1281 cm^{-1} . De plus, nous mentionnons la présence d'une bande d'élongation vers 1609 cm^{-1} indiquant l'existence des liaisons C=C aromatiques. Le spectre montre deux bandes vers 1518, 1456 cm^{-1} révélatrices de l'existence d'une conjugaison du cycle avec un doublet p non liant.

L'analyse élémentaire du composé AUT1 est : %C=61.98 % ; %H=4.75 %. D'autre part, son spectre de masse (ESI-MS) enregistré en mode négatif (figure 1, annexe 2) montre un ion moléculaire $m/z=289$ correspondant à la formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$. Le spectre RMN ^1H de AUT1 est représenté ci-dessous :

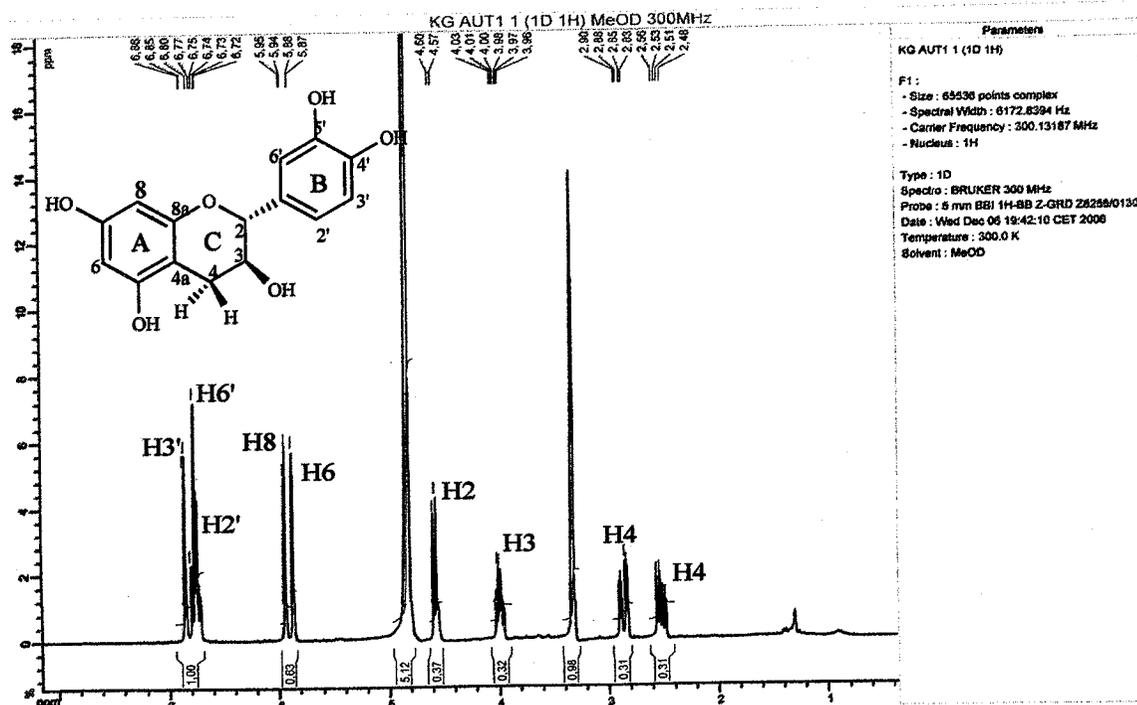


Figure 28 : Spectre RMN ^1H de la fraction AUT1.

Le spectre RMN ^1H montre un couplage entre les protons H-4 et les protons H-3 [(3.96, ddd, 1H, H-3, $J_{\text{H-3/H-2}}=9.0$ Hz, $J_{\text{H-3/H-4}}=6.0$ Hz, $J_{\text{H-3/H-4}}=3.0$ Hz) ; (2.42, dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}}=6.0$ Hz, $J_{\text{H-4/H-4}}=15$ Hz) ; (2.83, dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}}=6.0$ Hz, $J_{\text{H-4/H-4}}=15$ Hz)]. La valeur élevée de la constante de couplage ($J^2=15$ Hz) est caractéristique d'une substitution en C-4 de deux protons géminés. Le spectre présente aussi dans la région des champs forts un proton aliphatique caractéristique d'une substitution en C-2 (4.58, d, 1H, H-2, $J_{\text{H-2/H-3}}=9.0$ Hz). Il indique également deux signaux à 5.87 et 5.94 ppm attribuables aux protons aromatiques en C-6 et C-8. A 6.77 ppm apparaît un signal massif correspondant aux trois protons aromatiques qui corrélient avec le carbone en C-2', C-3' et C-6'.

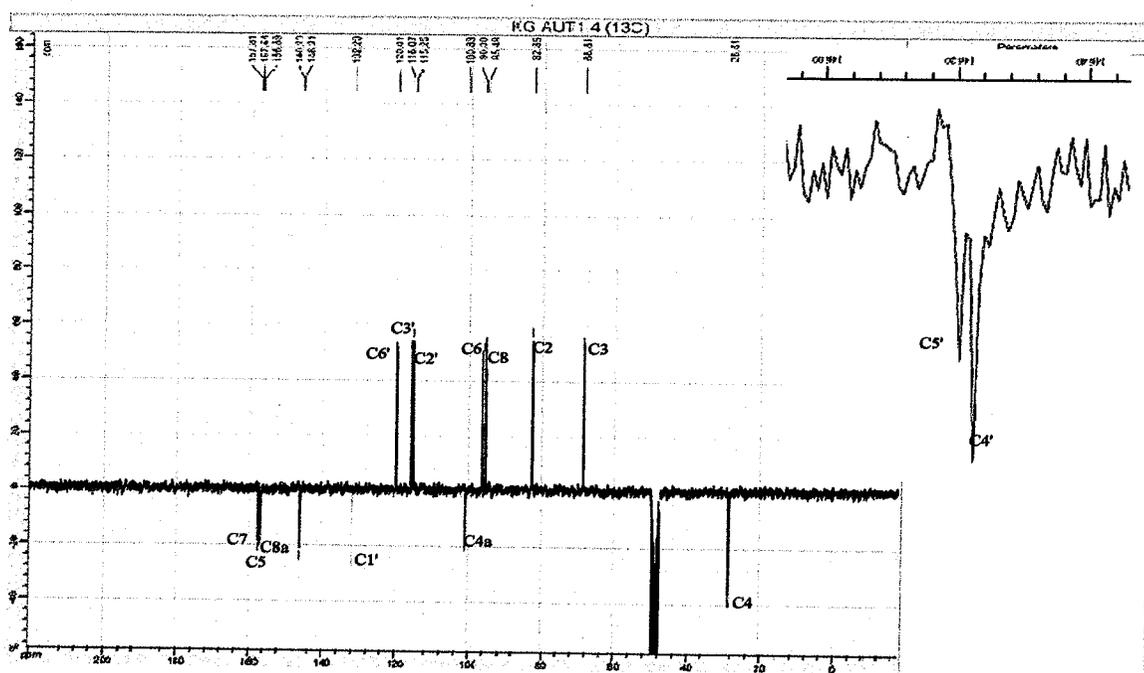


Figure 29 : Spectre RMN ^{13}C de la fraction AUT1.

Le spectre RMN ^{13}C du produit AUT1 montre :

- Douze carbones sp^2 dont sept quaternaires δ_{ppm} : 100.83 (C-4a), 132.23 (C-1'), 146.23 (C-4'), 146.21 (C-5'), 156.89 (C-8a), 157.54 (C-5), 157.81 (C-7) et cinq carbones tertiaires δ_{ppm} : 95.49 (C-8), 96.30 (C-6), 115.25 (C-2'), 116.07 (C-3'), 120.01 (C-6').
- Trois carbones sp^3 dont un secondaire 28.51 (C-4) et deux primaires 68.81 (C-3), 82.85 (C-2).

Le déblindage des signaux de trois des sept carbones quaternaires est expliqué par la proximité d'un hétéroatome.

L'attribution de ces signaux est réalisée à l'aide de la RMN 2D, en particulier, l'expérience HSQC.

Tableau 24 : RMN HSQC de la fraction AUT1.

Carbones	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
CH-2	82.85	4.58
CH-3	68.81	3.96
CH ₂ -4	28.51	2.48
		2.83
C-4a	100.83	
C-5	157.54	
CH-6	96.30	5.87
C-7	157.82	
CH-8	95.49	5.94
C-8a	156.89	
C-1'	132.23	
CH-2'	115.25	6.72
CH-3'	116.07	6.85
C-4'	146.23	
C-5'	146.21	
CH-6'	120.01	6.74

δ_H & δ_C : Déplacements chimiques des hydrogènes et des carbones (ppm).

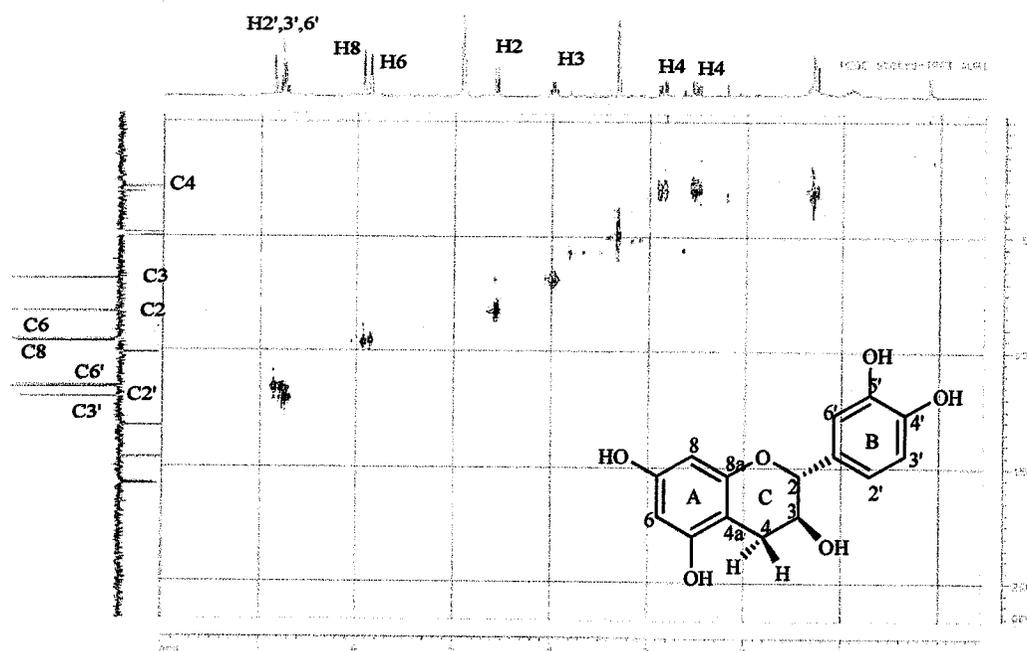


Figure 30 : Spectre RMN HSQC de la fraction AUT1.

Les déplacements chimiques des protons et des carbones (tableaux 25 & 26) de ce composé se sont révélés très proches, en tout point, aux données de la littérature [18].

Tableau 25 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹H de AUT1/(+)-Catéchine.

Protons	RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD, δ en ppm)	RMN ¹ H (300 MHz, Acétone-d ₆ , δ en ppm) [18]	
2	4.58 (1H, d, 9.0 Hz)	4.55 (1H, d, 6.1 Hz)	Cycle C
3	3.96 (1H, ddd 9.0, 6.0, 3.0 Hz)	4.00 (m, 1H)	
4	2.48 (1H, dd, 6.0, 15 Hz)	2.95 (m, 1H)	
	2.85 (1H, dd, 6.0, 15 Hz)		
4a			Cycle A
5			
6	5.87 (1H, d, 3.0 Hz)	5.88 (s, 1H)	
7			
8	5.94 (1H, d, 3.0 Hz)	5.91 (s, 1H)	
8a			
1'			Cycle B
2'	6.72 (1H, d, 3.0 Hz)	6.80 (m, 1H)	
3'	6.85 (1H, d, 3.0 Hz)	6.80 (m, 1H)	
4'			
5'			
6'	6.74 (1H, dd, 3.0, 9.0 Hz)	6.91 (s, 1H)	

d : doublet ; t : triplet ; s : singulet ; m : multiplet.

Tableau 26 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹³C de AUT1/(+)-Catéchine.

Carbones	RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD, δ en ppm) AUT1	RMN ¹³ C (75 MHz, Acétone-d ₆ , δ en ppm) [18]	
2	82.85	82.5	Cycle C
3	68.81	68.2	
4	28.51	28.8	
4a	100.83	100.5	Cycle A
5	157.54	156.7	
6	96.30	96.2	
7	157.81	157.2	
8	95.49	95.2	
8a	156.89	157.6	
1'	132.23	131.9	Cycle B
2'	115.25	115.4	
3'	116.07	115.8	
4'	146.23	145.7	
5'	146.21	145.6	
6'	120.01	119.9	

Tableau 27 : Caractéristiques physiques de la fraction AUT1.

Caractéristiques	Composé AUT1	Littérature	Références
Masse moléculaire (g/mole)	290	290	/
Pouvoir rotatoire	$[\alpha]_D = +3^\circ$ (c 0.10, MeOH)	$[\alpha]_D^{20} = +3^\circ$ (c 0.10, MeOH)	[18]
Indice de réfraction (20°C)	$n_D = 1.342$	/	/
T_f (°C)	238-240	242	[19]

Une étude détaillée du spectre RMN ^1H , nous permet de caractériser un seul système *ortho/para* à 5.87 et 5.94 ppm (H-6A et H-8A). Les signaux à 2.48 et 2.83 ppm, $J^2=15$ Hz, nous indiquent la présence de deux protons géminés.

Nous observons aussi l'existence d'un seul système, indiquant une substitution *ortho/para* sur le cycle aromatique (H-2', 3' et 6'B).

Deux hydrogènes représentés par un doublet à 4.58 ppm ($J^3=9.0$ Hz) et un doublet de triplet à 3.96 ppm ($J^3=9.0$ Hz) correspondant au 2,3-*trans*.

L'ensemble de nos investigations permettent de suggère que la fraction AUT1 est constituée de la (+)-catéchine représentée sur la figure 31 ci-dessous :

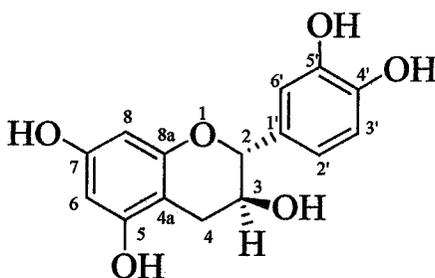


Figure 31 : (2R, 3S)-2-(3,4-dihydroxyphényl) chroman-3,5,7-triol (Catéchine).

• AUT2

Le spectre IR (Voir annexe 1) de AUT2, solide jaunâtre, est enregistré dans le domaine compris entre 4000 et 500 cm^{-1} . Il montre principalement les vibrations d'élongation de la liaison C-H entre 2958 et 2856 cm^{-1} . Comme dans le cas AUT1, une bande intense est située à 3338 cm^{-1} , caractéristique des vibrations d'élongation O-H d'un alcool. La réponse caractéristique des éthers apparaît sous forme d'une bande d'élongation asymétrique forte vers 1284 cm^{-1} .

Le spectre montre aussi une bande caractéristique des liaisons C=C aromatiques vers 1626 cm^{-1} . Cette dernière est accompagnée de deux autres bandes vers 1518 et 1466 cm^{-1} résultantes de la conjugaison du cycle avec un doublet π non liant.

L'analyse élémentaire du composé AUT2 fournit les résultats suivants :
 C: 62.15% H: 4.15% O: 33.70%

Le spectre de masse (ESI-MS) enregistré en mode négatif (figure 2, annexe 2), montre un ion moléculaire à m/z -273 correspondant à la formule brute : $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_7$. Le spectre RMN ^1H du composé AUT2 est le suivant :

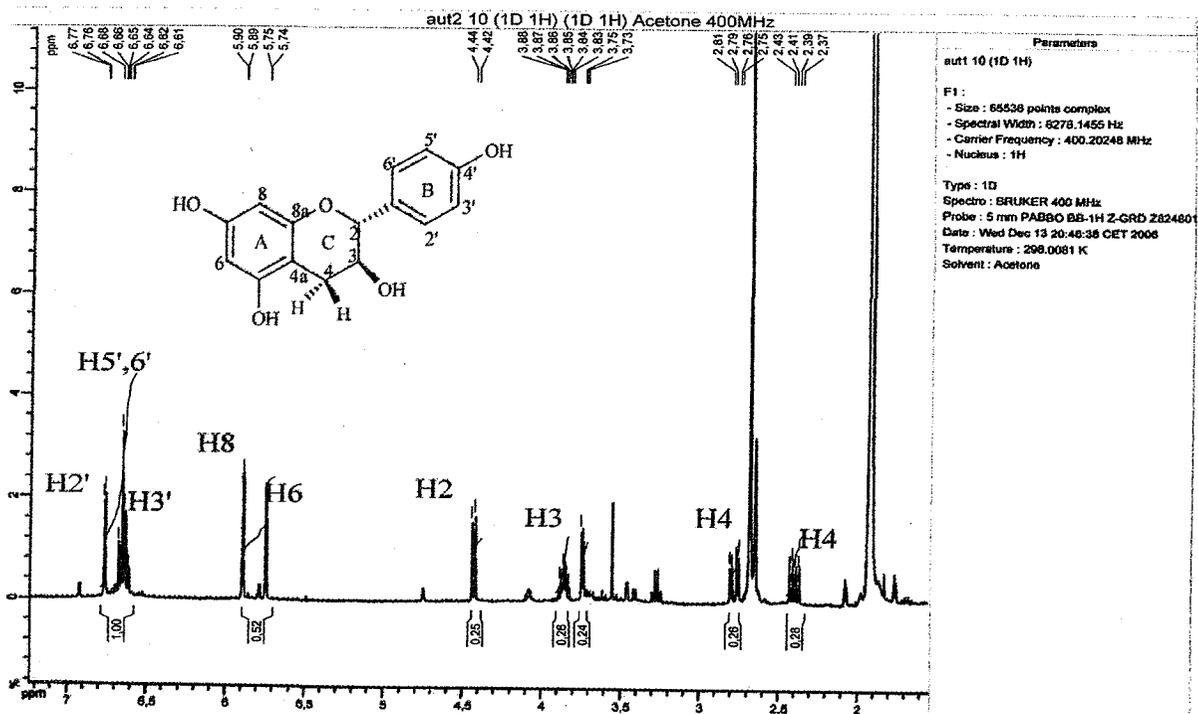


Figure 32 : Spectre RMN ^1H de la fraction AUT2.

Sur le spectre RMN ^1H , nous pouvons remarquer aisément un couplage entre les protons H-4 et H-3 [(3.84, ddd, 1H, H-3, $J_{\text{H-3/H-2}} = 8.0$ Hz, $J_{\text{H-3/H-4}} = 4$ Hz, $J_{\text{H-3/H-4}} = 8.0$ Hz) ; (2.37, dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}} = 8.0$ Hz, $J_{\text{H-4/H-4}} = 16$ Hz) ; (2.75, dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}} = 4.0$ Hz, $J_{\text{H-4/H-4}} = 16$ Hz)]. La valeur de la constante de couplage ($J^2 = 16$ Hz) est caractéristique d'une substitution en C-4 de deux protons géminés. Le spectre présente dans la région des champs forts un doublet correspondant à un proton aliphatique caractéristique d'une substitution en C-2 (4.42, d, 1H, H-2, $J_{\text{H-2/H-3}} = 8.0$ Hz). Les protons aromatiques en C-6 et C-8 apparaissent à 5.74 et 5.89 ppm et ceux en C-2', C-3', C-5' et C-6' sont désignés par un massif à 6.66 ppm.

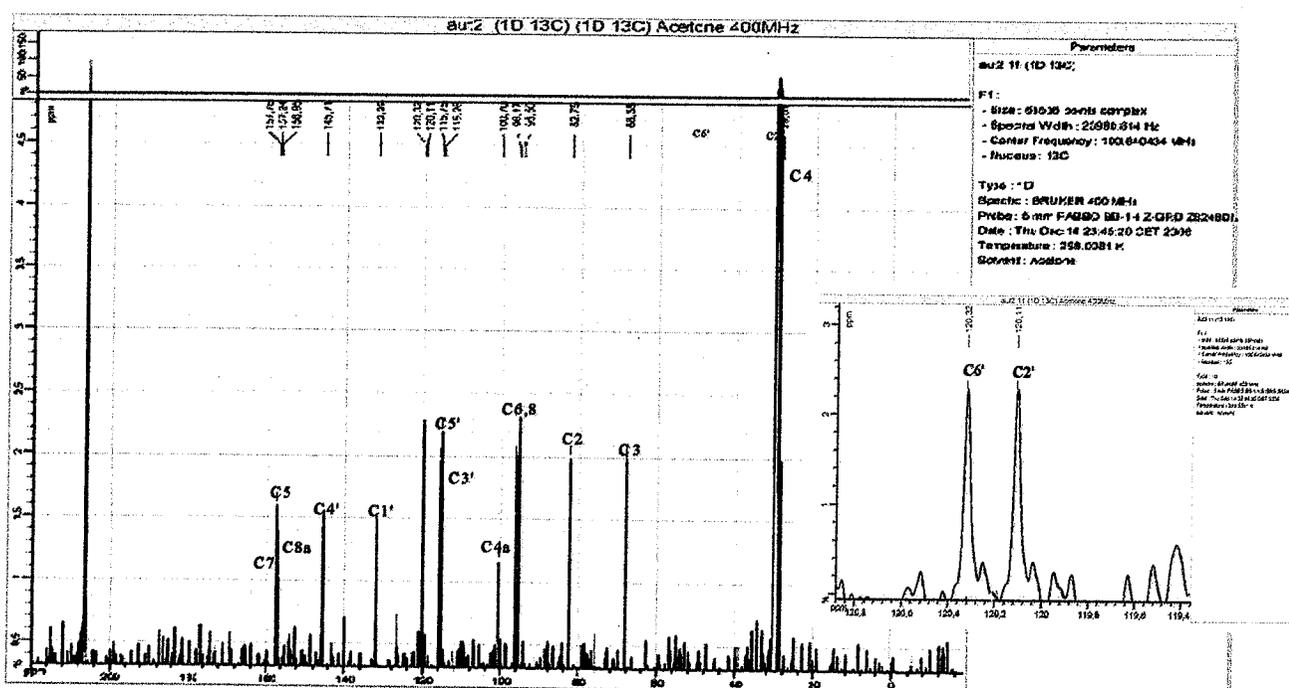


Figure 33 : Spectre RMN ^{13}C de la fraction AUT2.

Le spectre RMN ^{13}C de la fraction AUT2 représenté ci-dessus révèle :

- Douze carbones sp^2 dont six carbones quaternaires δ_{ppm} : 100.70 (C-4a), 132.25 (C-1'), 145.71 (C-4'), 156.95 (C-8a), 157.24 (C-5), 157.76 (C-7) et six carbones tertiaires δ_{ppm} : 95.50 (C-8), 96.17 (C-6), 115.28 (C-5'), 115.75 (C-3'), 120.11 (C-2'), 120.32 (C-6').
- Trois carbones sp^3 dont un secondaire 29.01 (C-4) et deux primaires 68.38 (C-3), 82.75 (C-2).

L'attribution de ces signaux est faite aussi à l'aide de la RMN 2D HSQC.

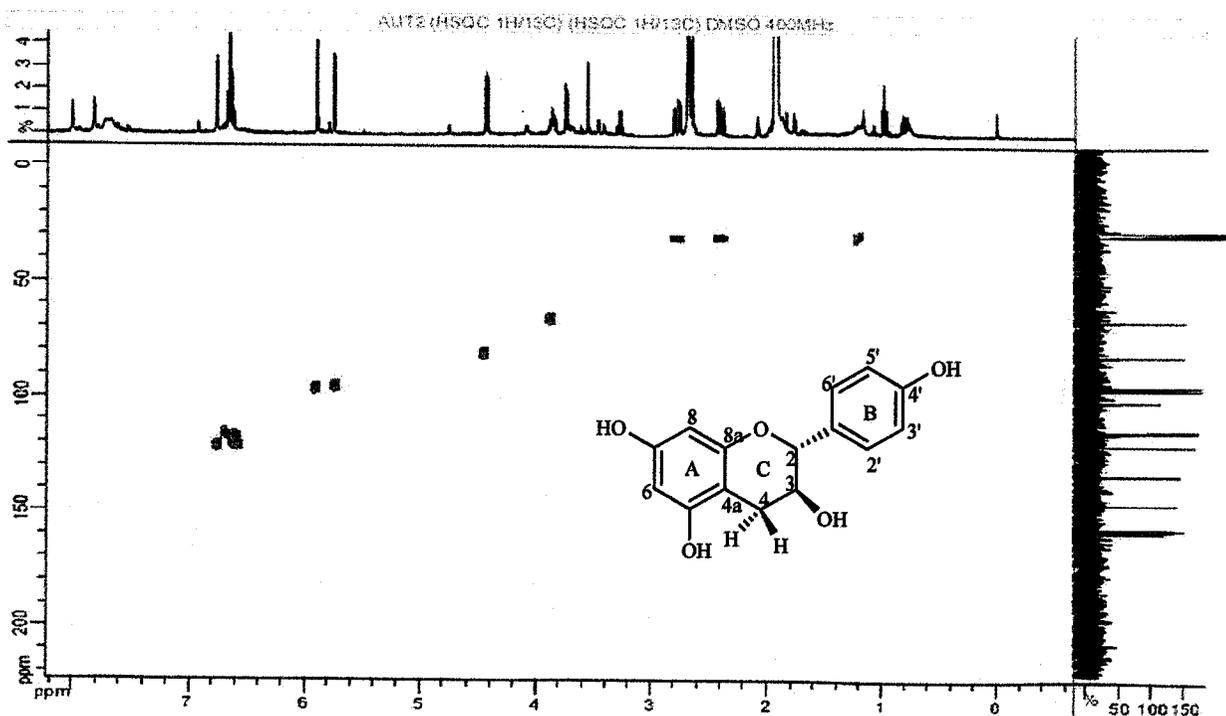


Figure 34 : Spectre RMN HSQC de la fraction AUT2.

Tableau 28 : RMN HSQC de la fraction AUT2.

Carbones	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
CH-2	82.75	4.42
CH-3	68.38	3.84
CH ₂ -4	29.01	2.38 2.79
C-4a	100.70	
C-5	157.24	
CH-6	96.17	5.74
C-7	157.76	
CH-8	95.50	5.89
C-8a	156.95	
C-1'	132.25	
CH-2'	120.11	6.76
CH-3'	115.75	6.61
C-4'	145.71	
CH-5'	115.28	6.46
CH-6'	120.32	6.66

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé AUT2 sont comparés aux données de la littérature [20] (tableaux 29 & 30).

Tableau 29 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹H de AUT2/(+)-epiafeléchine.

Protons	RMN ¹ H (400 MHz, Acétone d ₆ , δ en ppm)	RMN ¹ H (400 MHz, Acétone-d ₆ , δ en ppm) [20]	
2	4.42 (1H, d, 8.0 Hz)	4.85 (1H, d, 1.1 Hz)	Cycle C
3	3.84 (1H, ddd, 8.0, 4.0, 8.0 Hz)	4.17 (1H, ddd, 4.3, 3.5, 1.1 Hz)	
4	2.38 (1H, dd, 8.0, 16 Hz)	3.53 (1H, dd, 4.3, 16 Hz)	
	2.76 (1H, dd, 4.0, 16 Hz)	3.64 (1H, dd, 3.5, 16 Hz)	
4a			Cycle A
5			
6	5.74 (1H, d, 4.0 Hz)	5.98 (1H, d, 2.3 Hz)	
7			
8	5.89 (1H, d, 4.0 Hz)	5.94 (1H, d, 2.3 Hz)	Cycle B
8a			
1'			
2'	6.76 (1H, d, 4.0 Hz)	7.28 (1H, d, 8.4 Hz)	
3'	6.61 (1H, d, 4.0 Hz)	6.78 (1H, d, 8.4 Hz)	
4'			
5'	6.64 (1H, d, 4.0 Hz)	6.78 (1H, d, 8.4 Hz)	
6'	6.66 (1H, d, 8.0 Hz)	7.28 (1H, d, 8.4 Hz)	

Tableau 30 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹³C de AUT2/(+)-epiafeléchine.

Carbones	RMN ¹³ C (100 MHz, Acétone d ₆ , δ en ppm)	RMN ¹³ C (100 MHz, Acétone-d ₆ , δ en ppm) [20]	
2	82.75	80.0	Cycle C
3	68.38	66.8	
4	29.01	29.8	
4a	100.70	100.1	Cycle A
5	157.24	158.8	
6	96.17	96.7	
7	157.76	158.7	
8	95.50	95.8	
8a	156.95	157.6	
1'	132.25	131.3	Cycle B
2'	120.11	129.5	
3'	115.75	115.8	
4'	145.71	158.5	
5'	115.28	115.8	
6'	120.32	129.5	

Une analyse fine en RMN ^1H montre que le composé AUT2 appartient à la même classe de composés que la (+)-catéchine. En effet, nous observons un seul système *ortho/para* avec un doublet à 5,74 ppm (H-6, $J = 4.0$ Hz) et un autre doublet 5,89 ppm (H-8, $J=2$ Hz). Les signaux à 2.37 et 2.75 ppm, avec $J^2=16$ Hz, sont caractéristiques de la présence de deux protons géminés en C-4. Le spectre montre également deux doublets à 4.42 ppm et 3.84 ppm attribuables à deux protons H-2 et H-3 avec des constantes de couplages 4.0 et 8 Hz correspondant au 2,3-*trans*. Il indique aussi un massif à 6.68 ppm correspondant à 4 protons dans un système indiquant une substitution *ortho/méta/para* sur le cycle aromatique (H-2', 3', 5' et 6'B).

Tableau 31 : Caractéristiques physiques de la fraction AUT2.

Caractéristiques	Composé AUT2	Littérature	Références
Masse moléculaire (g/mole)	274	274	/
Pouvoir rotatoire	$[\alpha]_{\text{D}} = +9^\circ$ (c 0.10, MeOH)	$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +59.3^\circ$ (c 1.23, MeOH)	[20]
Indice de réfraction (20°C)	$n_{\text{D}} = 1.3360$	/	/
T_f (°C)	248	248-251	[20]

A partir de l'ensemble de ces résultats spectroscopiques, nous pouvons suggérer que le composé AUT2 est l'afzeléchine dont la structure est représentée ci-dessous :

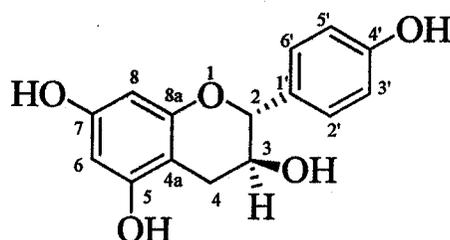


Figure 35: (2*R*,3*S*)-2-(4-hydroxyphényl)chroman-3,5,7-triol (Afzeléchine).

- **AUT3**

Le spectre IR (Voir annexe 1) de AUT3, solide jaunâtre, est enregistré dans le domaine compris entre 4000 et 500 cm^{-1} . Il montre les bandes suivantes : ν (cm^{-1}) 2987 (C-H aliphatique) ; 3378 (O-H) ; 1278 (C-O-C) ; 1611 (C=C) ; 1723 (C=O).

De plus, le composé AUT3 répond positivement au test des flavonoïdes et est optiquement actif $[\alpha]_D = +132^\circ$ (c 0.10, MeOH). Son analyse élémentaire fournit les résultats suivants : %C=64.39 % ; %H=4.42 % et son point de fusion est estimé à 248.6°C.

Le spectre de masse en ionisation chimique montre l'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 409, correspondant à une masse moléculaire de 410 (figure 3, annexe 2), en accord avec la formule brute $C_{22}H_{18}O_8$.

Le spectre RMN 1H de AUT3 montre un système aromatique complexe entre 6.6 et 8.03 ppm correspondant à sept protons. Les signaux à 6.76, 6.66 et 6.62 ppm (H-2', H-3', H-6') indiquent la présence d'un cycle aromatique tri-substitué. De plus, les signaux à 7.69, 7.75, 7.86 et 8.04 ppm (H-3''', H-4''', H-6''' et H-7''') révèlent la présence d'un cycle aromatique tétra-substitué. Le proton à 5.74 ppm est couplé au proton à 5.89 ppm avec une constante de couplage $J^4 = 4.0$ Hz (couplage *métra* sur le noyau benzénique H-6A et H-8A). Le spectre indique aussi deux signaux (dd, $J^3 = 8.0$ et 16 Hz) attribuables aux deux protons géminés en C-4.

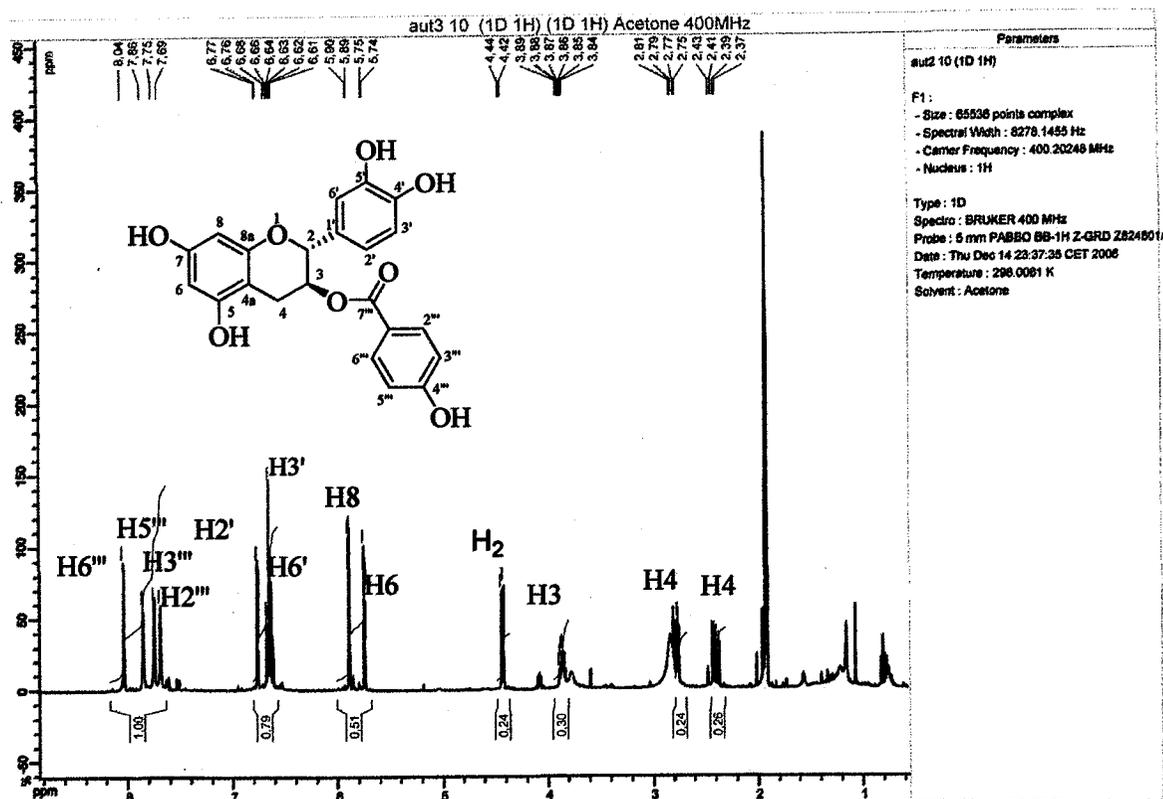


Figure 36 : Spectre RMN 1H de la fraction AUT3.

L'attribution de ces signaux est réalisée à l'aide de la RMN 2D en HSQC.

Tableau 32 : RMN HSQC de la fraction AUT3.

Carbones	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
CH-2	82.75	4.42
CH-3	68.38	3.84
CH ₂ -4	28.86	2.37
		2.75
C-4a	100.47	
C-5	157.86	
CH-6	96.17	5.74
C-7	157.05	
CH-8	95.49	5.89
C-8a	154.25	
C-1'	132.13	
CH-2'	115.75	6.76
CH-3'	115.28	6.66
C-4'	147.67	
C-5'	146.38	
CH-6'	120.10	6.62
C-1''		
C-2''		
C-3'''		
C-4'''		
C-5'''		
C-6'''		
C-1'''	124.38	
CH-2'''	105.70	7.69
CH-3'''	114.08	7.75
C-4'''	147.67	
CH-5'''	114.00	7.86
CH-6'''	108.82	8.04
C-7'''	166.48	

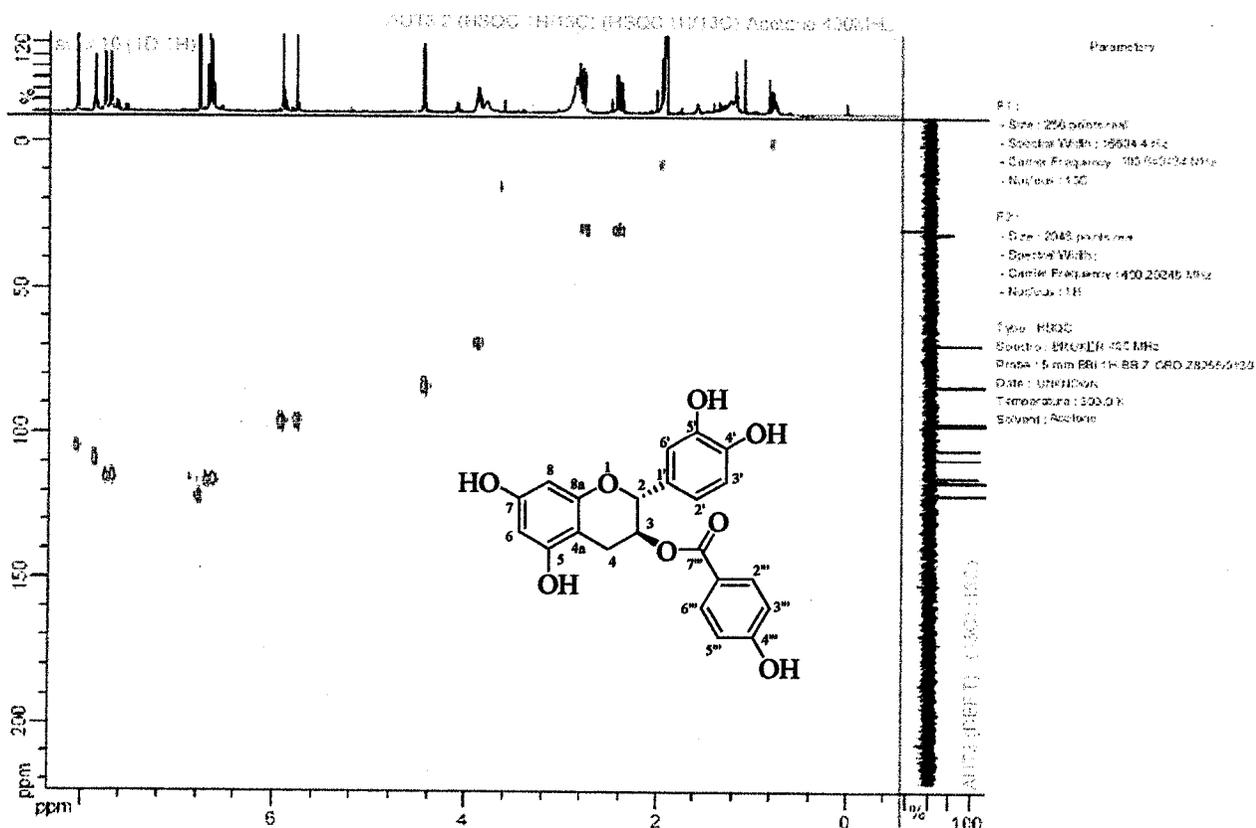


Figure 38 : Spectre RMN HSQC de la fraction AUT3.

Pour caractériser le produit inconnu, nous avons réalisé une étude comparative entre les données spectroscopiques recueillies pour la fraction AUT3 avec ceux de l'(-)-epicatechine 3-*O*-galloyl (4 β →2) phloroglucinol citées dans la littérature [19].

Tableau 33 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹H de AUT3/(-)-epicatechine-3-O-galloyl-(4β→2)-phloroglucinoles.

Protons	RMN ¹ H (400 MHz, Acetone-d6, δ en ppm)	RMN ¹ H (300 MHz, Acetone-d6, δ en ppm) [21]	
2	4.42 (1H, d, 8.0 Hz)	5.45 (s)	Cycle C
3	3.84 (1H, dt, 4.0, 8.0, 4.0 Hz)	5.24 (m)	
4	2.37 (1H, dd, 8.0, 16 Hz)	4.62 (1H, d, 1.5 Hz)	
	2.75 (1H, dd, 8.0, 16 Hz)		
4a			
5			Cycle A
6	5.74 (1H, d, 4.0 Hz)	6.02 (1H, d, 2.3 Hz)	
7			
8	5.89 (1H, d, 4.0 Hz)	6.10 (1H, d, 2.3 Hz)	
8a			
1'			Cycle B
2'	6.76 (1H, d, 4.0 Hz)	6.95 (d 1.8 Hz)	
3'	6.66 (1H, d, 8.0 Hz)	6.73 (1H, d, 8.2 Hz)	
4'			
5'			
6'	6.62 (1H, dd, 8.0, 4.0 Hz)	6.79 (1H, dd, 8.2, 1.8 Hz)	
1''			Cycle D
2''			
3''		5.97 (s)	
4''			
5''		5.97 (s)	
6''			
1'''			
2'''	7.69	7.05 (s)	
3'''	7.75		
4'''			
5'''	7.86		
6'''	8.04	7.05 (s)	
7'''			

Tableau 34 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹³C de AUT3/(-)-epicatechine-3-O-galloyl-(4β→2)-phloroglucinole.

Carbones	RMN ¹³ C (100 MHz, Acetone-d ₆ , δ en ppm)	RMN ¹³ C (75 MHz, Acetone-d ₆ , δ en ppm) [21]	
2	82.75	76.2	Cycle C
3	68.38	75.8	
4	28.86	35.0	
4a	100.47	101.6	Cycle A
5	157.86	159.1	
6	96.17	97.3	
7	157.05	158.4	
8	95.49	96.5	
8a	154.25	158.1	
1'	132.13	132.1	Cycle B
2'	115.75	115.5	
3'	115.28	146.2	
4'	147.67	146.3	
5'	146.38	116.5	
6'	120.10	119.9	
1''		106.7	Cycle D
2''		158.9	
3''		97.6	
4''		159.2	
5''		97.6	
6''		158.9	
1'''	124.38	122.1	
2'''	105.70	110.9	
3'''	114.08	146.7	
4'''	147.67	139.9	
5'''	114.00	146.7	
6'''	108.82	110.9	
7'''	166.48	168.0	

L'analyse du spectre de RMN ¹H et ¹³C permet de conclure que le composé AUT3 appartient à la même classe de composés que l'(-)-epicatechine-3-O-galloyl-(4β→2)-phloroglucinole. D'après tous ces résultats spectroscopiques, nous suggérons la structure suivante pour le composé AUT3 :

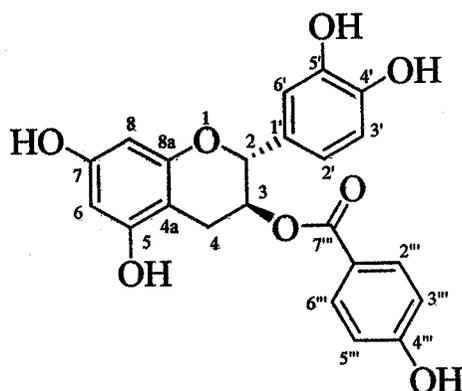


Figure 39 : (2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphényl)-5,7-dihydroxychroman-3-yl 4-hydroxybenzoate.

2.5.2. Les proanthocyanidines dans les racines

Après extraction des tiges d'*Arbutus unedo* L., nous nous sommes intéressés aux racines. Cette partie a trait à l'extraction et à la caractérisation des produits isolés. En effet, deux produits purs désignés par AUR1 et AUR2 sont élucidés.

L'extrait brut des racines se présente sous forme d'un solide rougeâtre (4.5 g, 1.5%). Ce dernier subit une nouvelle extraction avec l'acétate d'éthyle puis un séchage sur $MgSO_4$. Après concentration de la solution, un produit solide rougeâtre est obtenu. Sa chromatographie sur colonne de gel de silice en utilisant, successivement, un mélange $CH_2Cl_2/MeOH$, un mélange acétone/ H_2O puis un mélange $C_6H_{12}/Acétone/H_2O$: 6/3/1 contenant quelques gouttes d'acide acétique 1%, conduit à l'isolement de trois proanthocyanidines dont deux à l'état pur notés AUR1 et AUR2.

Tableau 35 : Chromatographie sur Colonne de l'extrait brut des racines

Aspect physique	Masse utilisée (mg)	Chromatographie sur colonne				
		Eluant	Masse (mg)	Rdt (%)	Tf (°C)	R_f
Solide rouge bordeaux	519		AUR1 : 80	15.41	238-240	0.81
		$C_6H_{12}/Acétone/H_2O$	AUR2 : 15	2.89	264-266	0.66
		6/3/1	AUR3 : 300	57.80	/	mélange

Ces deux composés sont soigneusement caractérisés par RMN 1H , ^{13}C et spectrométrie de masse. Les résultats sont regroupés ci-dessous :

- Analyses spectroscopiques

• AUR1

L'analyse élémentaire et son ion moléculaire $[M-1]^- = 289$ (figure 4, annexe 2) permet de lui assigner la formule brute : $C_{15}H_{14}O_6$.

Son spectre IR (figure 4, annexe 1) montre une bande d'absorption très intense vers 3368 cm^{-1} (O-H), des bandes vers 1281 cm^{-1} (C-O-C) et 1612 cm^{-1} (C=C aromatique).

D'autre part, le spectre de RMN¹H montre un signal à 6.7 ppm (2H, ddd, J=3.0 Hz et 9 Hz) et un autre à 6.85 ppm (1H, s) caractéristique des trois protons C-2', C-3' et C-6' d'un noyau B substitué en position C-4' et C-5'. De plus, il y a deux doublets à 5.94 ppm (1H) et 5.87 ppm (1H) correspondants aux protons en C-6 et C-8 et deux doublets de doublet à 2.83 et 2.48 ppm (2H) attribuables aux deux protons géminés en C-4.

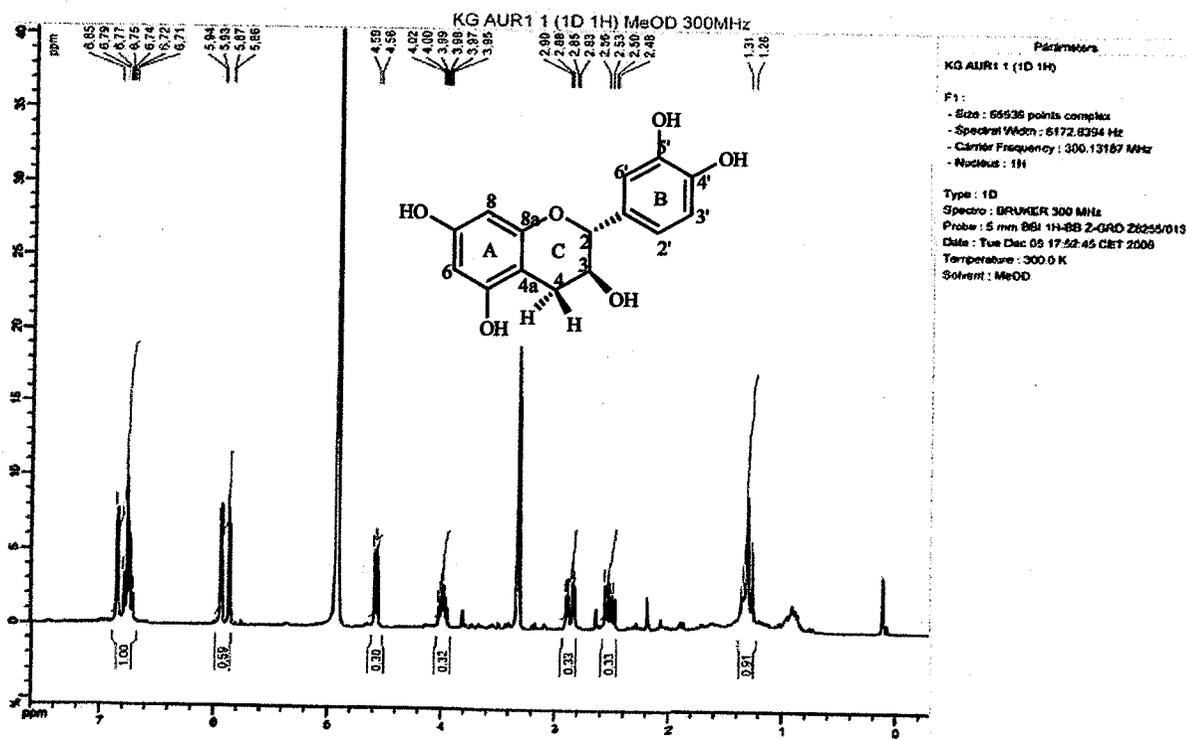


Figure 40 : Spectres RMN¹H de la fraction AUR1.

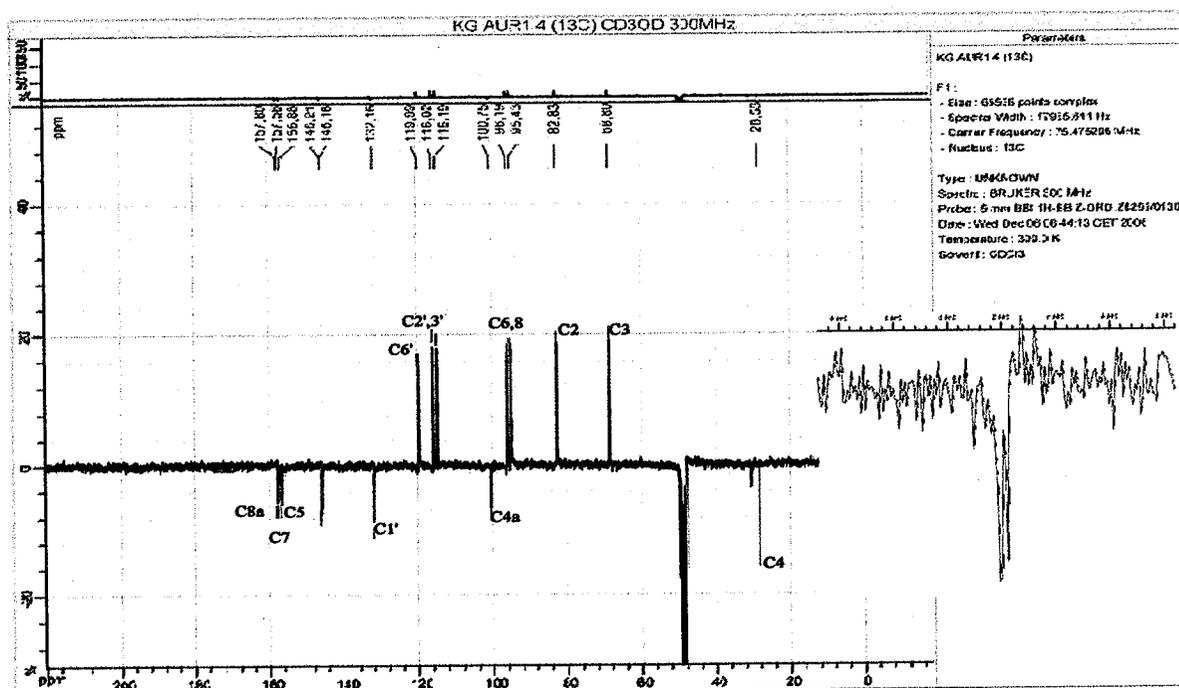


Figure 41 : Spectres RMN ^{13}C de la fraction AUR1.

Le spectre RMN ^{13}C montre :

- Plusieurs carbones très déblindés pouvant être attribués à des phénols δ_{ppm} : 95.43 (C-8), 96.19 (C-6), 115.19 (C-2'), 116.02 (C-3'), 119.99 (C-6').
- Le déblindage des signaux de trois des sept carbones quaternaires indiquent la proximité d'un hétéroatome : 100.75 (C-4a), 156.88 (C-8a), 132.16 (C-1').
- Trois carbones sp^3 dont un secondaire à 28.53 (C-4) et deux autres primaires à 68.80 (C-3), 82.83 (C-2).

Le spectre RMN 2D HSQC (figure 4, annexe 5) de la fraction AUR1 permet de faire les attributions suivantes (tableau 36) :

Tableau 36 : RMN HSQC de la fraction AUR1.

Carbones	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
CH-2	82.83	4.58
CH-3	68.80	3.97
CH ₂ -4	28.53	2.53
		2.88
C-4a	100.75	
C-5	157.56	
CH-6	96.19	5.87
C-7	157.80	
CH-8	95.43	5.94
C-8a	156.88	
C-1'	132.16	
CH-2'	115.19	6.71
CH-3'	116.02	6.79
C-4'	146.21	
C-5'	146.18	
CH-6'	119.99	6.85

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont comparés aux données de la littérature.

Tableau 37 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹H de AUR1/(+)-Catéchine.

Protons	RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD, δ en ppm)	RMN ¹ H (300 MHz, Acetone-d ₆ , δ en ppm) [18]	
2	4.56 (1H, d, 9.0 Hz)	4.55 (1H, d, 6.1 Hz)	Cycle C
3	3.95 (1H, ddd, 9.0,6.0,3.0Hz)	4.00 (m, 1H)	
4	2.48 (1H, dd, 6.0, 15 Hz)	2.49-2.95 (m, 1H)	Cycle A
	2.83 (1H, dd, 6.0, 15 Hz)		
4a			
5			
6	5.86 (1H, d, 3.0 Hz)	5.88 (brs, 1H)	
7			
8	5.93 (1H, d, 3.0 Hz)	6.04 (brs, 1H)	Cycle B
8a			
1'			
2'	6.71 (1H, d, 3.0 Hz)	6.80 (m, 1H)	
3'	6.77 (1H, dd, 3.0, 9.0 Hz)	6.80 (m, 1H)	
4'			
5'			
6'	6.85 (1H, s,)	6.91 (s, 1H)	

Tableau 38 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹³C de AUR1/(+)-Catéchine.

Carbones	RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD, δ en ppm)	RMN ¹³ C (75 MHz, Acetone-d ₆ , δ en ppm) [18]	
2	82.83	82.5	Cycle C
3	68.80	68.2	
4	28.53	28.8	
4a	100.75	100.5	Cycle A
5	157.56	156.7	
6	96.19	96.2	
7	157.80	157.2	
8	95.43	95.2	
8a	156.88	157.6	
1'	132.16	131.9	Cycle B
2'	115.19	115.4	
3'	116.02	115.8	
4'	146.21	145.7	
5'	146.18	145.6	
6'	119.99	119.9	

Les caractéristiques physiques du composé AUR1 sont regroupées dans le tableau 39 ci-dessous :

Tableau 39 : Caractéristiques physiques de la fraction AUR1.

Caractéristiques	Composé AUR1	Littérature	Références
Masse moléculaire (g/mole)	290	290	/
Pouvoir rotatoire	[α] _D = + 3.4° (c 0.10, MeOH)	[α] _D ²⁰ = + 3° (c 0.10, MeOH)	[20]
Indice de réfraction (20°C)	n _D = 1.3420	/	/
T _f (°C)	238	240	[19]

Les valeurs des résultats expérimentaux tirés des spectres RMN ¹H et ¹³C de la fraction AUR1 sont très proches de ceux de la catéchine citée dans la littérature [18]. Sa stéréochimie est 2,3-*trans*, caractérisée dans le spectre RMN ¹H avec ces deux constantes de couplages (*J*₁=9.0 Hz et *J*₂=6.0 Hz).

• AUR2

Le spectre IR (figure 5, annexe 1) de AUR2 montre les bandes d'absorptions suivantes : ν (cm^{-1}) 2934 et 2770 (C-H), 3323 (O-H), 1289 (C-O-C), 1626 (C=C aromatique).

Le spectre de masse ESI enregistré en mode négatif (figure 5, annexe 2) révèle la présence d'un ion moléculaire à $m/z=413$ correspondant à la formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_9$.

Sur le spectre RMN ^1H , nous observons la présence d'un couplage entre le proton H-3 et les protons H-2 et H-4 ((4.04, dd, 1H, H-3, $J_{\text{H-3/H-2}}=8.0$ Hz, $J_{\text{H-3/H-4}}=12$ Hz) et (4.42, d, 1H, H-2, $J_{\text{H-2/H-3}}=8.0$ Hz). Le couplage entre H-4 et H-3 (4.62 d, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}}=12$ Hz) est caractéristique d'une substitution en C-4 d'un seul proton. De plus, il y a aussi deux doublets attribuables aux deux protons aromatiques en C-6 et C-8 [(5.74, d, 1H, H-6, $J_{\text{H-6/H-8}}=4.0$ Hz) et (5.89, d, 1H, H-8, $J_{\text{H-8/H-6}}=4.0$ Hz)]. Le spectre indique, également, un massif [6.76 (m, 2H, H-2', H-3'), 6.65 (d, 1H, H-6') et 6.61 (2s, 2H, H-3'', H-5'')] correspondant aux trois protons aromatiques en C-2', C-3' et C-6' et un singulet à 6.09 ppm, attribuable aux protons H-3'' et H-5'''. (figure 42).

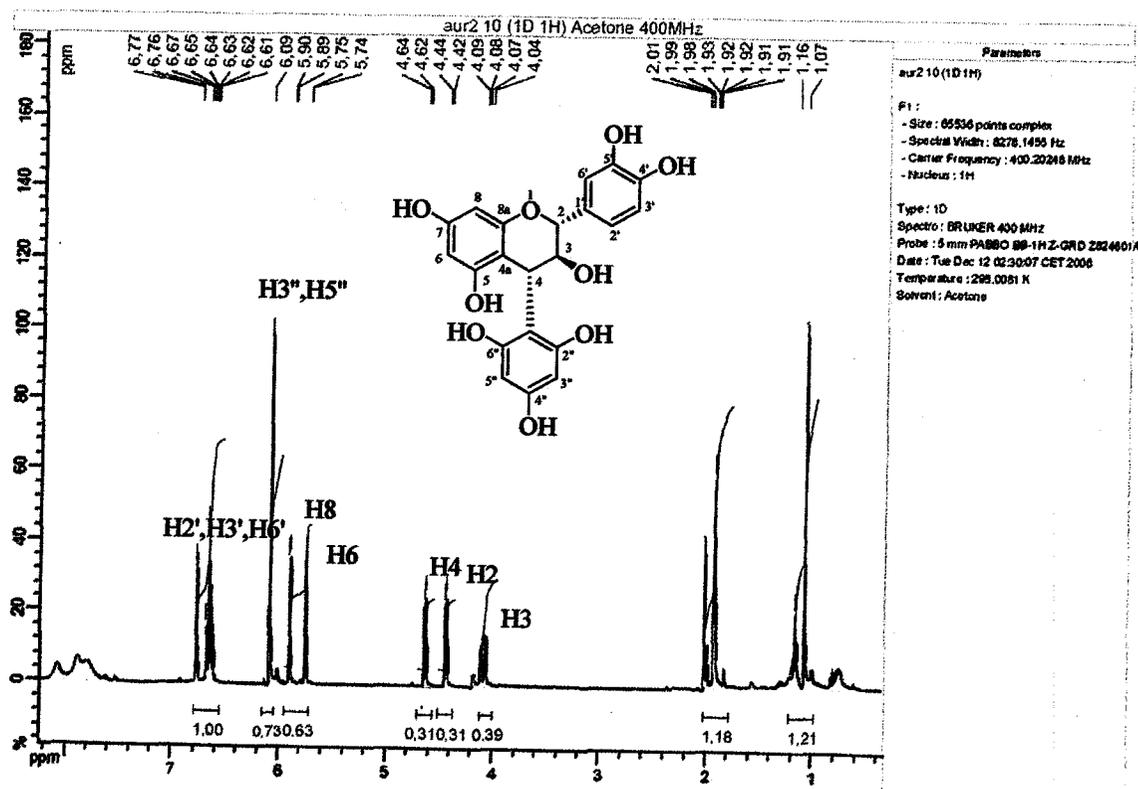


Figure 42 : Spectres RMN ^1H de la fraction AUR2.

Le spectre RMN ^{13}C de AUR2 montre :

- Dix huit carbones sp^2 dont onze quaternaires δ_{ppm} : 107.27 (C-4a), 132.25 (C-1'), 145.73 (C-4'), 145.66 (C-5'), 156.95 (C-8a), 157.24 (C-7), 157.76 (C-5), 102.88 (C-1''), 155.30 (C-2''), 100.70 (C-3''), 100.20 (C-5'') et sept tertiaires δ_{ppm} : 95.50 (C-6), 96.17 (C-8), 115.28 (C-2'), 115.75 (C-3'), 120.10 (C-6'), 155.30 (C-2''), 158.37 (C-4''), 162.12 (C-6'').
- Trois carbones primaires hybridés sp^3 δ_{ppm} : 28.85 (C-4), 68.38 (C-3), 82.75 (C-2).

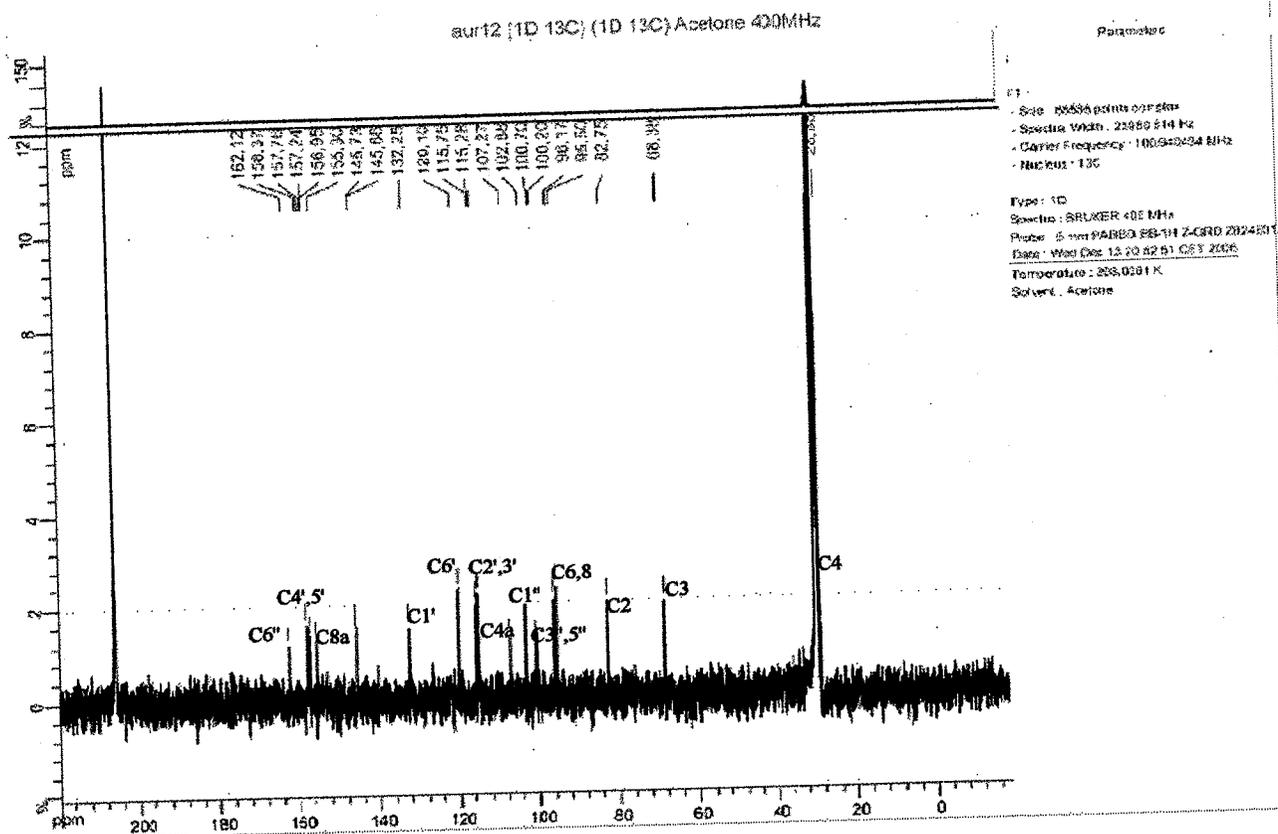


Figure 43 : Spectres RMN ^{13}C de la fraction AUR2.

Pour caractériser le composé AUR2, nous avons engagé une étude comparative entre les résultats recueillis par spectroscopie et les données citées dans la littérature pour la (+)-catéchine-(4 α →2)-phloroglucinole [22].

Tableau 40 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹H de AUR2/(+)-Catéchine-(4α→2)-phloroglucinoles.

Protons	RMN ¹ H (400 MHz, Acétone d6, δ en ppm)	RMN ¹ H (300 MHz, Acétone-d6, δ en ppm) [22]	
2	4.42 (d, 8.0 Hz)	4.38 (d, 9.2)	Cycle C
3	4.04 (dd 8.0, 12.0 Hz)	4.48 (dd, 9.2, 7.8)	
4	4.62 (d, 12 Hz)	4.43 (d, 7.8 Hz)	
4a			Cycle A
5			
6	5.74 (d, 4.0 Hz)	5.89 (d, 2.3 Hz)	
7			
8	5.89 (d, 4.0 Hz)	5.91 (d, 2.3 Hz)	
8a			
1'			Cycle B
2'	6.76 (d, 4.0 Hz)	7.00 (d, 1.8 Hz)	
3'	6.65 (d, 8.0 Hz)	6.79 (d, 8.1 Hz)	
4'			
5'			
6'	6.59 (dd, 8.2, 1.69 Hz)	6.85 (dd, 8.1, 1.8 Hz)	
1''			Cycle D
2''			
3''	6.09 (brs)	5.96 (brs)	
4''			
5''	6.09 (brs)	5.96 (brs)	
6''			

Tableau 41 : Comparaison des données spectroscopiques RMN ¹³C de AUR2/(+)-Catéchine-(4α→2)-phloroglucinole.

Carbones	RMN ¹³ C (100 MHz, Acétone-d ₆ , δ en ppm)	RMN ¹³ C (75 MHz, Acétone-d ₆ , δ en ppm) [22]	
2	82.85	84.7	Cycle C
3	68.38	74.3	
4	28.85	29.0	
4a	107.27	106.4	Cycle A
5	157.76	158.9	
6	95.50	98.1	
7	157.24	158.5	
8	96.17	97.1	
8a	156.95	158.1	
1'	132.25	133.0	Cycle B
2'	115.28	116.6	
3'	115.75	116.3	
4'	145.73	146.2	
5'	145.66	146.5	
6'	120.10	121.5	
1''	102.88	108.0	Cycle D
2''	155.30	158.6	
3''	100.70	97.9	
4''	158.37	159.2	
5''	100.20	96.8	
6''	162.12	158.6	

Les caractéristiques physiques de AUT2 sont résumées dans le tableau 42 :

Tableau 42 : Caractéristiques physiques de la fraction AUR2.

Caractéristiques	Composé AUR2	Littérature	Références
Masse moléculaire (g/mole)	414	414	/
Pouvoir rotatoire	[α] _D ²⁰ = - 148° (c 0.10, MeOH)	[α] _D ²⁰ = - 150° (c 0.10, MeOH)	[20]
Indice de réfraction (20°C)	n _D = 1.3720	/	/
T _f (°C)	264-266	/	[21]

Toutes les analyses réalisées sur l'échantillon AUR2 concordent tout à fait avec ceux de la littérature et nous rassure dans l'idée ou il s'agit bien de l'(-)-catéchine-(4α→2)-phloroglucinole. En effet, nous observons sur le spectre RMN ¹H un seul système

.....
ortho/para à 6.76 et 6.61 ppm (H-2', 3' et 6' B). D'autre part, deux hydrogènes, représentés par des doublets à 5.74 et 5.89 ppm désignent les deux protons H-6A et H-8A ($J=4.0$ Hz). De plus, les protons H-2D et H-6D apparaissent sous forme d'un singulet à 6.09 ppm.

Le spectre RMN ^{13}C montre plusieurs carbones très déblindés pouvant être attribués à des phénols. La structure proposée de AUR2 est donc la suivante :

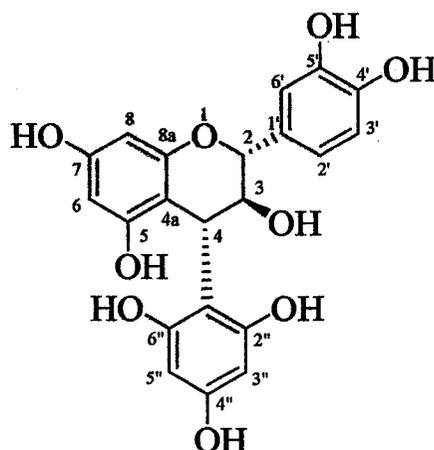


Figure 44 : (-)-Catéchine-(4 α →2)-phloroglucinole.

VI.3. Test d'activité antimicrobienne

3.1. Introduction

La flore algérienne n'a fait l'objet que de très peu de recherches de composés actifs bien que le peuple Algériens utilisent à ce jour une grande diversité de plantes pour soigner toute sorte de maladie et d'affection. Ces connaissances médicinales ancestrales permettent d'orienter et de guider la recherche de molécules bioactives. De plus, face à l'émergence grandissante à l'échelle mondiale du phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques, la découverte de nouveaux composés antimicrobiens est devenue un objectif primordial dans la lutte contre les infections causées par des souches bactériennes résistantes.

3.2. Pouvoir antimicrobien des extraits bruts de *Arbutus unedo*

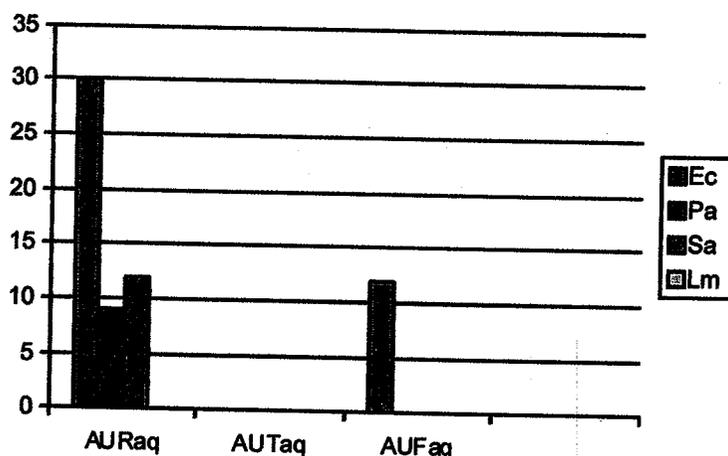
Au cours de cette opération, les extraits de *Arbutus unedo* L., AUT, AUF et AUR obtenus par des solvants de polarités différentes, sont dissous dans le DMSO. Pour chaque échantillon, 25 µl de la solution préparée sont déposés sur un disque en papier filtre de 5 mm de diamètre. Les disques sont, ensuite, séchés dans l'étuve à 37 °C puis les tests sont réalisés selon la méthode de diffusion sur gélose MULLER-HINTON en utilisant comme souche *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Staphylococcus aureus* (Sa) et *Listeria monocytogens* (Lm) qui présentent un degré d'infection important en bactériologie médicale.

Les diamètres d'inhibition, mesurés en millimètres, sont regroupés dans les tableaux 43 et 44 ci-dessous :

Tableau 43 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition de certaines souches vis-à-vis des extraits aqueux des différents organes de *Arbutus unedo* L.

Extraits	Ec	Pa	Sa	Lm
AUR _{aq}	30	9	12	i
AUT _{aq}	I	i	i	i
AUF _{aq}	12	i	i	i

i : inactif



Histogramme 7 : Activité antibactérienne des extraits aqueux.

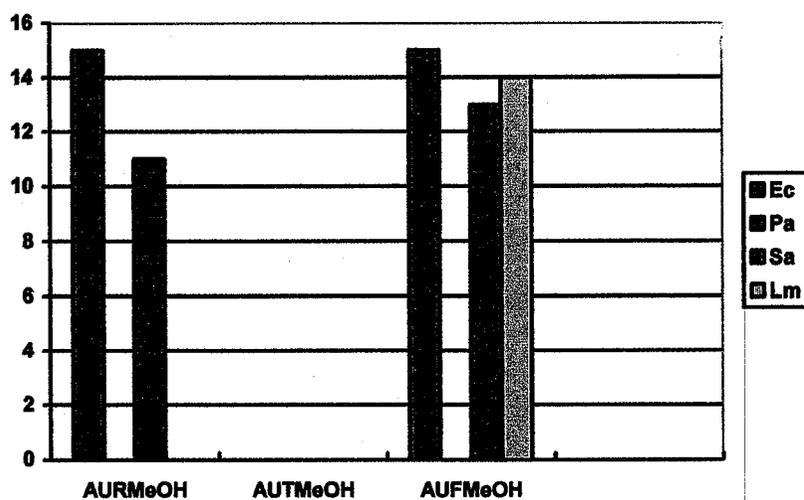
Nous notons les remarques suivantes pour les extraits testés :

- AUR_{aq} : aucune inhibition n'est développée par cet extrait.
- AUF_{aq} : une résistance peu significative d'*Escherichia coli*.
- AUR_{aq} : une inhibition importante de *Escherichia coli* mais peu significative pour *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 44 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition de certaines souches vis-à-vis des extraits méthanoliques des différents organes de *Arbutus unedo* L.

Extraits	Ec	Pa	Sa	Lm
AUR _{MeOH}	15	i	11	i
AUT _{MeOH}	I	i	i	i
AUF _{MeOH}	15	i	13	14

i : inactif



Histogramme 8 : Activité antibactérienne des extraits méthanoliques.

Les résultats obtenus sur les extraits méthanoliques, nous permettent de faire les constatations suivantes :

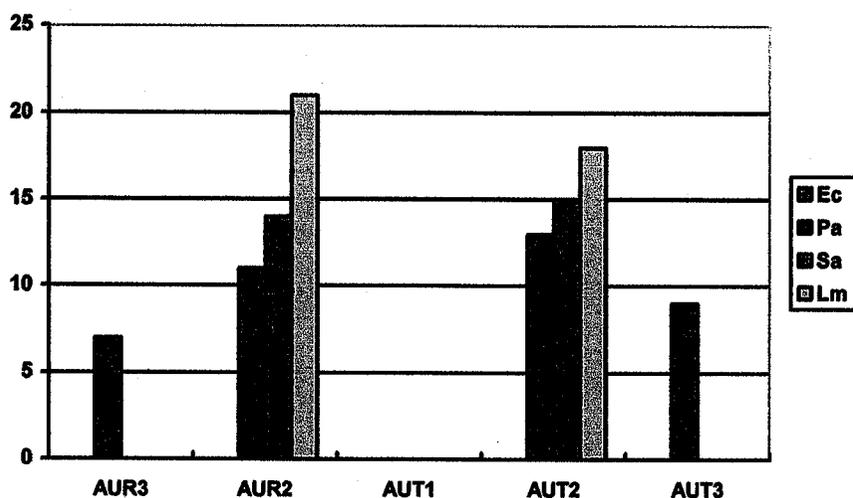
- AUT_{MeOH} : de même que pour AUT_{aq} , toutes les souches utilisées sont résistantes.
- AUF_{MeOH} et AUR_{MeOH} : une inhibition moyenne vis-à-vis de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogens*.

D'autres extraits des tiges et des racines de *Arbutus unedo* L. obtenus par chromatographie sur colonne de gel de silice sont soumis aux mêmes tests et dans les mêmes conditions opératoires. Les résultats des tests sont réunis ci-dessous :

Tableau 45 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches étudiées.

Extraits	Ec	Pa	Sa	Lm
AUR3	I	7	i	i
AUR2	I	11	14	21
AUT1	I	i	i	i
AUT2	I	13	15	18
AUT3	I	9	i	i

i : inactif



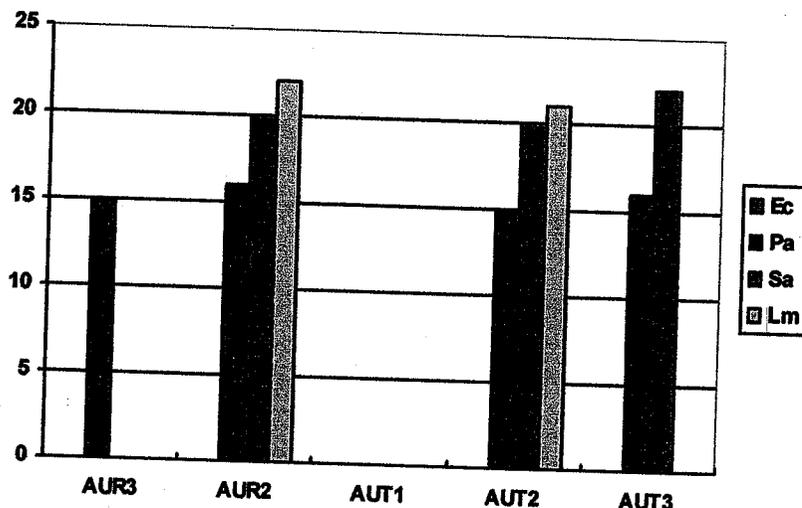
Histogramme 9 : Activité antibactérienne des fractions obtenues après chromatographie.

L'effet antibactérien des extraits sur les souches précitées dans le tableau 45 est comparé à celui des antibiotiques (ATB) et des antifongiques (ATF) considérés comme molécules inhibitrices de référence montrent selon les résultats fournis par la méthode de diffusion des écarts assez larges dans les valeurs des diamètres des zones d'inhibition, allant de 7 à 21 mm selon les extraits testés. Nous remarquons que la plupart des souches bactériennes étudiées sont résistantes vis-à-vis des extraits de *Arbutus unedo* L. utilisés.

Etant donné que ces résultats soient prometteurs, nous nous sommes intéressés de près à leurs améliorations en vérifiant l'impact de la concentration des extraits sur l'activité antibactérienne. En effet, après un premier dépôt de 25 µl sur les disques puis séchage, un second dépôt appelé surcharge de même quantité est, ensuite, déposé. Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 46 : Diamètres d'inhibitions des souches par des disques surchargés.

Extraits	Ec	Pa	Sa	Lm
AUR3	i	15	i	i
AUR2	i	16	20	22
AUT1	i	i	i	i
AUT2	i	15	20	21
AUT3	i	16	22	i



Histogramme 10 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches par des disques surchargés.

D'après le tableau 46, nous remarquons que les diamètres d'inhibition des souches, avant et après la surcharge des disques, accusent une nette augmentation suite à une concentration élevée en principe actif. En effet, les valeurs des diamètres passent de 7-15 mm à 15-22 mm.

L'étude comparative, de nos résultats à ceux obtenus avec les ATB, conduit aux constatations suivantes :

- l'extrait aqueux des racines d'*Arbutus unedo* L. montre une activité antibactérienne significative sur *Escherichia coli*. Cette activité se traduit par un diamètre d'inhibition de 30 mm comparable à celui des antibiotiques (la gentamicine, la pipéracilline et l'acide pipémidique) (tableau43).

- des diamètres d'inhibition moyens compris entre 20 et 22 mm sont obtenus avec les divers extraits sur le *Staphylococcus aureus*, germe réputé très dangereux et très difficile à éliminer.

- la fraction AUR2 révèle aussi une très intéressante activité sur *Listeria monocytogens*.

- une activité peu significative des extraits contre *Pseudomonas aeruginosa* révélée par des diamètres d'inhibition variant entre 9 et 16 mm.

Enfin, les extraits des racines et des tiges de *Arbutus unedo* L. ont montré une activité antibactérienne variable selon la nature de la souche. Par ailleurs cette activité est accentuée suite à l'élévation des concentrations en extraits.

3.3. Pouvoir antifongique des extraits en milieu solide

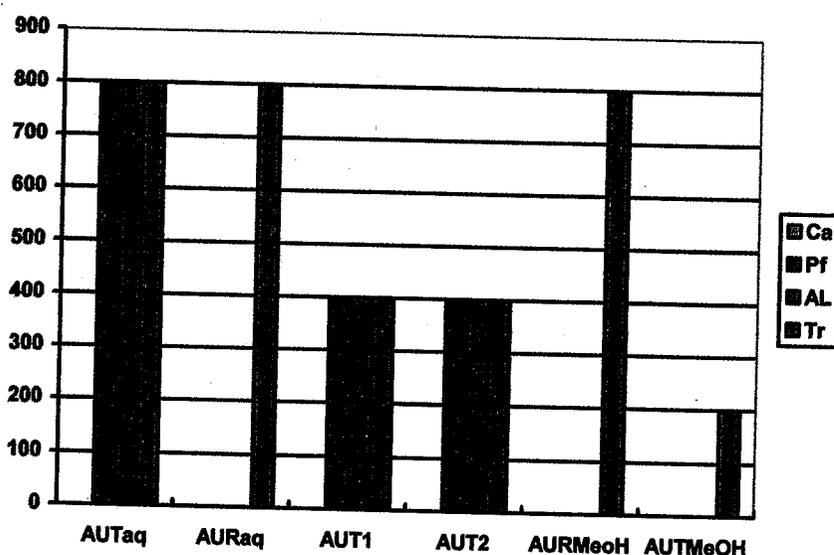
Pour évaluer le pouvoir antifongique de nos extraits, nous avons appliqué la même méthode déjà décrite précédemment pour les ATB. La seule différence réside dans la dissolution des extraits directement dans le milieu. Il est à noter que, dans ce cas précis, la lecture des résultats est faite selon la présence ou l'absence des germes.

Les résultats des C.M.I des différents extraits obtenus par la méthode de contact direct en milieu gélosé sur les bactéries, les levures et les moisissures sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 47 : Résultats de l'effet des extraits sur la croissance des champignons en $\mu\text{g/ml}$ par la méthode de contact direct.

Extraits	Ca	Pf	Al.	Tr.
AUR _{aq}	+	+	+	800
AUT _{aq}	+	800	800	800
AUF _{aq}	+	+	+	+
AUR _{MeOH}	+	+	+	800
AUT _{MeOH}	+	+	+	200
AUF _{MeOH}	+	+	+	+
AUR3	+	+	+	+
AUR2	+	+	+	+
AUT1	+	400	400	400
AUT2	+	400	400	400
AUT3	+	+	+	+

+ : Croissance



Histogramme 11 : Développement des souches par la méthode de contact direct ($\mu\text{g/ml}$).

D'après le tableau 47, nous remarquons que l'extrait méthanolique des tiges (AUT_{MeOH}) possède une remarquable activité sur *Trichoderma* sp. De plus, les fractions AUT1 et AUT2 révèlent une action thérapeutique antifongique sur *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. et *Trichoderma* sp.

3.4. Conclusion

Les résultats obtenus après comparaison des diamètres d'inhibition de nos extraits à ceux des ATB montrent que :

- 1) l'extrait aqueux des racines présente une activité antibactérienne intéressante sur *E. Coli*. Cette activité, caractérisée par un diamètre d'inhibition de 30 mm, est comparable à celles de la PIP et de PI.
- 2) D'autre part, les extraits des racines présentent une activité antibactérienne variable selon la nature de la souche et dont l'efficacité dépend de la quantité engagée dans le test antibactérien.
- 3) Enfin, les tiges présentent une activité antifongique significative sur *Trichoderma* sp.

Références bibliographiques

- [1] J. Karchesy, Y. Bae, L. Chalker Scott, R. F. Helm, L. Yeap Foo, Chromatography of proanthocyanidins, in "Plant polyphenols : synthesis, properties, significance", Ed. R. W. Hemingway and P. E. Laks, New-York, 1992.
- [2] D. Rao, G. Bories, Simple gas chromatographie method for the determination of medicagenic acid in alfalfa (*Medicago sativa*), *J. Chromato.*, 1987, 410, 169-175.
- [3] N. Dohou, K. Yamni, S. Tahraouch, L. M. Idrissi-Hassani, A. Badoc, N. Gmira, Screening phytochimique d'une endémique Ibro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2003, 142, 61-78.
- [4] G. E. Dubois, G. A. Grosby, P. Saffron, Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones, *Science*, 1977, 195, 397-399.
- [5] R. Brouillard, P. Figueiredo, M. Elhabiri, O. Dangles, Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruits and vegetables, 1997, p. 30-49.
- [6] P. Lebreton, M. Jay, B. Voirin, Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes, *Chim. Anal.*, 1967, 49(7), 375-383.
- [7] L. M. Idrissi-Hassani, Etude de la variabilité flavonique chez deux conifères méditerranéennes: le pin maritime *Pinus pinaster* Ait et le genévrier *thurifère Juniperus thurifera* L, Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle. Université Claude Bernard, Lyon I, 1985, p. 171.
- [8] J. Riberau-Gayon, Les composés phénoliques des végétaux, *Traité d'œnologie*, Edition Dunod, Paris, 1968, p. 254.
- [9] E. C. Bate-Smith, The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance, *J. Linn. Soc. London*, 1954, 58(371), 95.
- [10] P. Camille. Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers.: F, thèse de Doctorat ès Science, Université de Neuchâtel, 2001.
- [11] V. Cheynier, J. M. Souquet, E. Le Roux, S. Guyot, J. Rigaud, Size separation of condensed tannins, *Methods in Enzymology*, 1999, 299, 178-183.
- [12] G. E. Adamson, S. A. Lazarus, A. E. Mitchell, R. L. Prior, HPLC method for the quantification of procyanidins in Cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 4184-4188.

- [13] T. Tanaka, H. Fujisaki, G. I. Nonaka, I. Nishioka, Tanins and related compounds CXVII, Structures, Preparation, High Performance Liquid Chromatography and some reactions of dehydroellagitanin-acetone condensates, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 40(1), 2937- 2944.
- [14] V. Cheynier, T. Doco, H. Fulcrand, S. Guyot, E. Le Roux, J. M. Souquet, J. Rigaud, M. Moutounet, ESI-MS analysis of polyphenolic oligomers and polymers, *Analysis Magazine*, **1997**, 25(8), 32-37.
- [15] H. Fulcrand, S. Guyot, S. Remy, J. M. Souquet, T. Doco, V. Cheynier, Electrospray contribution to structural analysis of condensed tanins oligomers and polymers, in "Plant polyphenols 2, Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology", Ed. G. G. Gross, Dordrecht Kluwer Academic Publisher, **1999**.
- [16] P. Miketova, K. H. Schram, J. Li M. Withney, R. Huang, E. Kerns, S. Valcic, B. N. Timmermann, R. Rourick, S. Klohr, Tandem mass spectrometry studies on green tea catechins, Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea, *J. Mass. Spectro.*, **2000**, 35, 860-869.
- [17] W. Friedrich, A. Eberhardt, R. Galensa, Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry, *European Food Research and Technology*, **2000**, 211(1), 56-64.
- [18] L. Y. Foo, R. Newman, G. Waghorn, W. C. Mc Nabb, M. J. Ulyatt, Proanthocyanidins from *Lotus corniculatus*, *Phytochem.*, **1996**, 41(2), 617-624.
- [19] S. D. Verma, A. Mizuno, T.H. Kino Shita, Cataract and flavanoids, *Science*, **1976**, p.75.
- [20] M. J. Pascual-Villalobos, B. Rodriguez, Constituents of *Musa balbisiana* seeds and their activity against *Cryptolestes pusillus*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **2007**, 35, 11.
- [21] M. Boukharta, M. Girardin, M. Metche, Procyandines galloylées du sarment de la vigne (*Vitis vinifera*): séparation et identification par chromatographie liquide à haute performance et chromatographie en phase gazeuse, *J. Chromato.*, **1988**, 455, 406-409.
- [22] N. Köhler, P. Winterhalter, Large-scale isolation of flavan-3-ol phloroglucinol adducts by high-speed counter-current chromatography, *J. Chromato. A*, **2005**, 1072, 217-222.

Généralités

La matière végétale utilisée pour le développement de méthodes analytiques a été récoltée le 02.10.2005 à Terny (Algérie) située à une altitude de 800 m et à 10 km au sud de Tlemcen. Elle a été identifiée par le Pr Benabadji N., du Laboratoire de Botanique, Département de Biologie, Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen. Un échantillon est déposé au niveau de l'herbarium du laboratoire de botanique.

Après sa récolte, les différentes parties de la plante sont séchées dans un espace couvert et à l'abri de la lumière. Les échantillons broyés (tiges, feuilles et fruits) ou sous forme de morceaux (racines et rameaux) sont mis dans des bocaux en verres hermétiquement fermés et conservés au congélateur.

Les solvants organiques utilisés pour la solubilisation, dilution et extraction sont de qualité technique. Ils sont distillés deux fois sur une colonne Vigreux.

Les dosages des saponosides et des polyphénols sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible, type HP VECTRA, (Chemstations software)

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) sont effectuées sur plaques de silice kieselgel 60 F254 Art. 5554 MERCK. La révélation est effectuée selon les cas sous la lumière ultraviolette (UV), les vapeurs d'iode, la vanilline sulfurique etc.

Les purifications par chromatographie sur colonne sont effectuées sur gel de silice MERCK-gel de silice 60 avec une granulométrie de 0.063-0.2 mm.

Les chromatographies sur couche mince à support en verre sont réalisées sur plaques de silice Kieselgel 60 pf254 Art. 7747 MERCK.

Les points de fusion sont mesurés à l'aide d'un appareil WAGNER EMUNZ Nr 6666, HEIZBANK, System KOFLEER Type WME au niveau du laboratoire du Département de chimie -Université Abou Bekr Belkaïd-.

Les pouvoirs rotatoires sont mesurés à l'aide d'un polarimètre de type SCHMIDT HAENSCH 22955 dans le méthanol 0.1% au niveau du laboratoire du Département de chimie -Université Abou Bekr Belkaïd-.

Les indices de réfraction réalisés au niveau du laboratoire du Département de chimie -Université Abou Bekr Belkaïd- sont mesurés à l'aide d'un Abbe réfractomètre 1T/4T Ata GO'S ITABSHI K Tokyo Japon dans l'éthanol 1%.

Les analyses élémentaires réalisées au sein du laboratoire -COSNA- Université Abou Bekr Belkaïd- sont effectuées sur un appareil LECO Corporation ST. Joseph MI USA. LECO CHN-900

Les spectres infrarouges (IR) mesurés au niveau du laboratoire -COSNA- Université Abou Bekr Belkaïd- sont enregistrés sur un Appareil GENESIS (MATTSON) M Ftir de marque mono-faisceau, en pastille KBr. Les valeurs des bandes d'absorption les plus caractéristiques sont données en cm^{-1} .

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (^1H) (400 MHz ou 300 MHz) et du carbone (^{13}C) (100.6 MHz ou 75.45 MHz) sont réalisés à Bordeaux respectivement aux niveaux du laboratoire de chimie des polymères organiques CNRS-ENSCP- et du laboratoire -COMIPSO- et qui sont enregistrés sur un appareil BRUKER AMX 400 ou AMX 300. Les références internes des déplacements chimiques sont données en ppm par rapport à l'acétone- d_6 et au MeOD.

L'analyse des extraits bruts des racines et des tiges de l'*Arbutus unedo* L. par CLHP en phase normale est réalisée dans les conditions suivantes :

Colonne: Nucleosil-100, 7 μm , 250x7 mm

Flux: 1 ml/min

λ : 280, 254 nm

A: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$: 10/86/2/0.005 (v/v/v/v)

B: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$: 82/18/2/0.005 (v/v/v/v)

Injection : 20 μl

Tableau 48 : Caractéristiques opératoires de la CLHP.

Temps (min)	% A	% B
0	0	0
50	40	60
55	55	45
60	100	0
65	100	0
66	0	100
70	0	100

La spectroscopie de masse ESI-MS réalisée au sein du laboratoire -COMIPSO- à Bordeaux est effectuée sur un appareil LCQ de type Thermofinnigan (USA) équipé d'une source électrospray et d'un analyseur Ion Trap. Les paramètres de l'appareil sont ajustés en fonction de la méthode utilisée. En général, les conditions suivantes sont appliquées :

Tension de la source : 5 KV en positif et -3.5 KV en négatif

Température du capillaire : 300 °C

Flux d'azote : 900 ml/min

Flux auxiliaire d'azote : 300 ml/min

Tube lens offset : -40 à +40 V

Tension du capillaire : -30 à +30 V

Pour des raisons d'ordre pratique (meilleure lisibilité) la numérotation utilisée lors de la description des spectres RMN ^1H et ^{13}C n'est pas celle préconisée par la nomenclature systématique.

Chapitre VII

Chapitre VII : Partie expérimentale

VII.1. Screening phytochimique de l'*Arbutus unedo* L.

1.1. Caractérisation des différentes familles de composés dans l'*Arbutus unedo* L.

- **Saponosides**

Préparer une décoction avec 2 g de matière végétale sèche dans 100 ml d'eau. Porter à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, ajouter à 2 ml de la solution aqueuse un peu d'eau et ensuite agiter d'une manière forte. Une écume persistante confirme la présence des saponosides. Abandonner le mélange pendant 20 min et classer la teneur en saponosides :

- Pas de mousse = Test négatif ;
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif ;
- Mousse de 1-2 cm = test positif ;
- Mousse plus de 2 cm = test très positif.

- **Tanins**

Placer 2 g de matière végétale sèche dans 15 ml d'une solution aqueuse de MeOH à 80 %. Après 15 min d'agitation, filtrer l'extrait méthanolique puis mettre le filtrat dans un tube à essai. L'ajout de FeCl₃ 1 % permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques.

- **Composés flavoniques**

Placer 2 g de matière végétale sèche dans 15 ml de MeOH 80 %. Après 15 min d'agitation, filtrer l'extrait puis mettre 5 ml du filtrat dans un tube à essai. Traiter, ensuite, l'extrait méthanolique avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5 g de tournure de magnésium.

- **Anthocyanes**

Mettre 1 g de la matière végétale sèche en contact avec 10 ml de propanol avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré dans un bain-marie pendant 3 min. Révéler les anthocyanes avec une solution de vanilline chlorhydrique 1 %.

- **Anthracénosides**

Mettre 2 g de la matière végétale sèche dans 50 ml d'éthanol puis porter à reflux pendant 1 h. Mélanger, ensuite, 25 ml de l'extrait éthanolique à 15 ml de HCl 10% puis porter à reflux pendant 30 min. Refroidir la solution et l'extraire avec l'éther éthylique. Traiter la solution éthérique avec une solution de NaOH.

1.2. Dosage des saponosides

- Analyse qualitative

Dans un ballon équipé d'une agitation et d'un réfrigérant, mettre 5 g de la matière végétale dans 100 ml de méthanol. Chauffer le mélange entre 80-85 °C à reflux pendant 1 h. Après filtration, soumettre l'extrait méthanolique à une CCM puis révéler à l'aide de la vanilline sulfurique [1]. Les résultats sont résumés ci-dessous :

Tableau 49 : CCM de l'extrait méthanolique des différents organes.

Organes	Aspect physique	Eluant	Proportion	Taches	R _f	
Racines	Solide rouge	AcOEt/MeOH/H ₂ O	6/3/1	2	0.58	
	bordeaux				0.33	
Rameaux	Solide rouge					0.60
	bordeaux			3	0.50	
Tiges	Solide jaunâtre vert					0.32
				2	0.80	
Feuilles	Solide verdâtre					0.22
				2	0.54	
Fruits	Solide rouge					0.28
				1	0.88	

- Analyse quantitative

Dans un ballon équipé d'une agitation magnétique, mettre 10g de matière végétale sèche dans 100 ml d'eau. Porter à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, réajuster le volume à 100 ml. À partir de cette solution mère, préparer 10 tubes à essai (1.3 cm de diamètre interne) avec 1, 2, ... 10 ml. Réajuster le volume final à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter chacun des tubes vigoureusement en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, mesurer la hauteur de la mousse persistante en cm. Si elle est proche de 1 cm dans le *x*e tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante : $I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le } x\text{e tube} \times 5 / 0.0x$. Confirmer la présence de saponines dans la partie étudiée de la plante quand l'indice est supérieur à 100 [2].

Tableau 50 : Indice de mousse.

Organes	Racines									
Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration %	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Hauteur (cm)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.5
Indice de mousse (cm)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	25
Organes	Rameaux									
Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration %	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Hauteur (cm)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.4
Indice de mousse (cm)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	20
Organes	Tiges									
Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration %	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Hauteur (cm)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.6
Indice de mousse (cm)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	30
Organes	Feuilles									
Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration %	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Hauteur (cm)	/	/	/	/	/	/	/	1.6	1.6	1.7
Indice de mousse (cm)	/	/	/	/	/	/	/	100	88	85
Organes	Fruits									
Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration %	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Hauteur (cm)	/	/	/	/	/	/	/	/	1.4	1.8
Indice de mousse (cm)	/	/	/	/	/	/	/	/	77	80

1.3. Dosages des flavonoïdes totaux

- Détermination qualitative

Dans un ballon équipé d'une agitation et d'un réfrigérant, mettre 2 g de la matière végétale dans 30 ml de méthanol 80%. Après une agitation à TA, filtrer l'extrait puis soumettre à une CCM. Révéler, ensuite, la CCM à $\lambda = 365$ nm après pulvérisation avec le réactif de Neu (2-aminoéthyl-diphényl borate) 1% dans du MeOH pur [3].

Tableau 51 : CCM des flavonoïdes totaux.

Organes	Aspect physique	Eluant	Proportion	Taches	R _f
Racines	Solide rouge bordeaux	CH ₂ Cl ₂ /MeOH/NH ₄ OH 50 %	8/1/1		0.88
				3	0.82
					0.42
Rameaux	Solide rouge bordeaux	CH ₂ Cl ₂ /MeOH/NH ₄ OH 50 %	8/1/1		0.88
					0.84
				4	0.38
					0.24
Tiges	Solide jaunâtre vert			1	0.84
Feuilles	Solide verdâtre				0.52
				2	0.11
Fruits	Solide rouge				0.88
				3	0.62
					0.33

- Détermination quantitative

Dans un ballon équipé d'une agitation magnétique et d'un réfrigérant, extraire 1 g de matière végétale avec 100 ml de méthanol 80 %. Après agitation et filtration, mélanger 2 ml de l'extrait méthanolique à 100 µl d'une solution du réactif de Neu (2-aminoéthyl-diphényl borate) 1% dans du MeOH pur. Déterminer l'absorption à λ = 404 nm et comparer la valeur trouvée à celle du quercétol standard (0.05 mg/ml). Calculer le pourcentage des flavonoïdes totaux en équivalent quercétol selon la formule suivante [1,3] :

$$F (\%) = (0.05 \times A_{ext.} / A_{q.}) \times 100 / C_{ext.}$$

A_{ext.} : Absorption de l'extrait ;

A_{q.} : Absorption du quercétol (254.10⁻³) ;

C_{ext.} : Concentration de l'extrait exprimée en mg/ml.

Tableau 52 : Absorbance des différents extraits de *Arbutus unedo* L.

Organes	λ (nm)	Cext. (mg/ml)	Aext. (10 ⁻³)
Racines	404	10	285
Rameaux	404	10	216
Tiges	404	10	165
Feuilles	404	10	106
Fruits	404	10	190

1.4. Dosage des anthocyanes

- Analyse qualitative

Dans un erlen de 500 ml, mettre 2 g de matière végétale sèche en présence de 160 ml de HCl 2N à TA. Porter le mélange à 100°C pendant 40 min. Après refroidissement et filtration, extraire les anthocyanes (anthocyanidols de couleur rouge) avec 2x20 ml de *n*-butanol. Caractériser les anthocyanes par CCM sur cellulose en utilisant comme solvant de migration le Forestal (HCl/CH₃CO₂H/H₂O : 3/1/20), puis visualiser à la lumière visible [1,3].

Tableau 53 : CCM des anthocyanes.

Organes	Aspect physique	Eluant	Proportion	Taches	R _f
Racines	Solide rouge			2	0.31
	bordeaux				0.48
Rameaux	Solide rouge	HCl/CH ₃ CO ₂ H/H ₂ O	3/1/20	2	0.32
	bordeaux				0.50
Tiges	Solide jaunâtre vert			1	0.48
Feuilles	Solide verdâtre			Pas de migration	
Fruits	Solide rouge			2	0.33
					0.49

- Analyse quantitative

Faire un balayage des valeurs de longueurs d'ondes (λ) dans un intervalle compris entre 480 et 600 nm et retenir l'absorbance maximale (A_{Max}) des extraits obtenus lors de l'hydrolyse de la matière végétale décrite ci-dessus. Calculer la teneur en anthocyanes en utilisant l'expression suivante [1,4] :

$$T_{\text{anthocyanes}} \text{ (mg/g)} = (\gamma A / \epsilon) \times M \times V \times d / p$$

γ : Facteur de correction, égal à 6 ;

A : Absorbance à la longueur d'onde d'absorption maximale ;

ϵ : Coefficient d'absorption molaire du cyanidol ($\epsilon = 34700$) ;

M : Masse molaire du leucocyanidol (306) ;

V : Volume de la solution butanolique (40 ml) ;

d : Facteur de dilution ;

p : Poids de matière végétale sèche hydrolysée (2 g).

Tableau 54 : Absorbance maximale des différents extraits de *Arbutus unedo* L.

Organes	d	λ (nm)	A_{Max} (10^{-3})
Racines	10	530-560	345
Rameaux	10	530-560	326
Tiges	1	530-560	973
Feuilles	1	530-560	886
Fruits	10	530-560	265

1.5. Dosage différentiel des flavones et des flavonols

- Analyse qualitative

Dans un erlen de 500 ml, mettre 2 g de la matière végétale en présence de 160 ml de HCl 2N à TA. Porter le mélange pendant 40 min à une température de 100°C. Après refroidissement et filtration, extraire la phase aqueuse acide avec 2x150 ml d'éther diéthylique. Evaporer, ensuite, sous hotte ventilée puis reprendre les extraits obtenus dans 40 ml d'éthanol 95 % [1,3]. Faire une CCM des aglycones flavoniques en utilisant comme mélange éluant $CHCl_3/MeOH/H_2O/AcOH$: 7/1/2 puis visualiser à $\lambda=365$ nm.

Tableau 55 : CCM des aglycones flavoniques.

Organes	Aspect physique	Eluant	Proportion	Taches	R_f
Racines	Solide rouge	$CHCl_3/MeOH/H_2O$ Quelques gouttes d'AcOH	7/1/2	1	0.35
	bordeaux				
Rameaux	Solide rouge			2	0.28
	bordeaux				
Tiges	Solide jaunâtre vert			Pas de migration	
Feuilles	Solide verdâtre				
Fruits	Solide rouge	2	0.56		
			0.42		
			0.64		

- Analyse quantitative

Dans un erlen de 50 ml, introduire 10 ml de l'extrait éthanolique et 1 g d' $AlCl_3$. Après agitation et un repos de 10 min, mettre 1 μ l dans la cellule puis faire un balayage des longueurs d'ondes dans un intervalle compris entre 380 et 460 nm. Noter l'absorbance maximale.

L'absorbance du pic différentiel est proportionnelle à la concentration de l'échantillon en aglycones flavoniques. La teneur en aglycones, exprimée en équivalent de quercétol, est calculée selon la formule [1,5] :

$$T_{\text{aglycones}} \text{ (mg/g)} = (A / \epsilon) \times M \times V \times d / p$$

A : Absorbance du pic différentiel ;

ϵ : Coefficient d'absorption molaire du quercétol ($\epsilon = 23000$) ;

M : Masse molaire du quercétol (302) ;

V : Volume de la solution éthanolique d'aglycones (40 ml) ;

d : Facteur de dilution ;

p : Poids de matière végétale sèche hydrolysée (2g).

Tableau 56 : Absorbance du pic différentiel des extraits préparés.

Organes	d	λ (nm)	$A_{\text{Max}} (10^{-3})$	$A_b (10^{-3})$	$A = (A_{\text{Max}} - A_b) (10^{-3})$
			(avec AlCl_3)	(sans AlCl_3)	
Racines	1	390-415	685	43.5	641.5
Rameaux	1	390-415	596	38.6	557.4
Tiges	1	390-415	465	25.4	439.6
Feuilles	10	420-440	425	32.5	392.5
Fruits	10	420-440	452	29.8	422.2

VII.2. Dégraissage de la matière végétale

Dans un ballon de 1000 ml surmonté d'un réfrigérant à reflux, mettre 100 g de la matière végétale (tiges, racines) dans 400 ml d'hexane ou d'éther de pétrole. Porter l'ensemble à reflux pendant 10 h. Filtrer, ensuite, évaporer le solvant. Le résidu obtenu, sous forme d'un extrait huileux, représente généralement la matière grasse.

VII.3. Analyse des extraits bruts des tiges et des racines par CLHP

Dans un ballon de 500 ml surmonté d'un réfrigérant, extraire 30 g de la matière végétale à TA avec un mélange de solvants constitué de 85 ml d'eau distillée, 50 ml de méthanol et 60 ml d'acétone. Après filtration et évaporation de l'acétone et du méthanol, extraire la phase aqueuse avec 3x80 ml de CH_2Cl_2 pour éliminer les composants apolaires. Congeler puis sublimer l'eau (procédé de lyophilisation) pour obtenir l'extrait brut.

Avant de procéder à l'injection dans la colonne CLHP, les extraits obtenus sont filtrer du papier filtre.

Les temps de rétention figurant sur le chromatogramme sont regroupés ci-après :

Tableau 57 : Temps de rétention

Organes	Temps de rétention (min)		
Racines	0-10	10-18	18-52
Tiges	0-12	12-18	18-50

VII.4. Extraction et fractionnement des tanins oligomériques des racines par ESI-MS

Dans un ballon de 1000 ml, extraire 100g de la matière végétale sèche à TA avec un mélange constitué de 280 ml d'eau distillée, 200 ml de méthanol et 180 ml d'acétone. Après filtration et évaporation de l'acétone et du méthanol, extraire la phase aqueuse avec 3x300 ml de CH₂Cl₂ pour éliminer les composants apolaires. Congeler puis sublimer l'eau. Recueillir l'extrait brut sous forme d'un solide rouge bordeaux (0.8g, 0.8 %). Chromatographier l'extrait brut sur une colonne de silice. Eluer les acides phénoliques et les anthocyanes avec un mélange EtOH/H₂O. Récupérer, ensuite, la fraction oligomérique par élution au MeOH, puis. Lyophiliser la dernière fraction pour obtenir une poudre de couleur rouge bordeaux (fraction oligomérique) [6].

Tableau 58 : Chromatographie sur colonne des tanins oligomériques des racines.

Eluant	Nbre de fraction de 500 ml versée	Poids brut (en g) du résidu obtenu	N° de la fraction	Produits séparés
EtOH/H ₂ O : 80/50 (v/v)	2	0.121	F1	Acides phénoliques et sucres
EtOH/H ₂ O : 65/ 35 (v/v)	6	0.055	F2	} Mélange d'acides phénoliques + anthocyanidines
	3	0.102	F3	
EtOH/H ₂ O : 50/50 (v/v)	4	0.096	F4	anthocyanidines + tanins oligomériques
MeOH	2	0.083	F5	} Tanins oligomériques
	3	0.343	F6	

L'analyse du mélange de tanins oligomériques contenus dans la fraction F6 par ESI-MS fournit les différents fragments suivants : [M-H]⁻ : 289.1 ; 407.1 ; 425.1 ; 543.1 ; 559.1 ; 577.1 ; 695.1 ; 729.1 ; 865.1 ; 989.3 ; 1017.2 ; 1092.2 ; 1106.1 ; 1192.1 ; 1206.1 ; 1292.1 ; 1306.1 ; 1392.1 ; 1455.8 ; 1505.9 ; 1555.7 ; 1605.9 ; 1655.7 ; 1705.8 ; 1755.6 ; 1756.7 ; 1765.7 ; 1855.5 ; 1857.5 ; 1885.6.

VII.5. Fractionnement des tanins par chromatographie sur colonne

5.1. Fractionnement des proanthocyanidines des tiges

Dans un ballon de 1000 ml équipé d'une agitation magnétique et d'un réfrigérant, mettre 300 g de la matière végétale dans 280 ml d'eau distillée, 200 ml de méthanol et 180 ml d'acétone et porter à reflux pendant 3 jours. Après filtration et évaporation de l'acétone et du méthanol, la phase aqueuse est extraite 3x300 ml de CH₂Cl₂ pour éliminer les composants apolaires. Congeler puis sublimer l'eau. Recueillir l'extrait sous forme d'un solide jaunâtre (2g, 0.66 %). Extraire le solide obtenu, ensuite, avec 3x50 ml d'acétate d'éthyle puis sécher sur MgSO₄ (0.9 g) [7]. Après évaporation du solvant, chromatographier l'extrait sur une colonne de gel de silice. Eluer une première fois avec un mélange MeOH/H₂O : 1/1 (v/v) pour éliminer les acides phénoliques, les anthocyanes et les sucres puis une seconde fois avec un mélange CH₂Cl₂/MeOH : 1/1 (v/v).

Tableau 59 : Chromatographie sur colonne des proanthocyanidines des tiges.

Eluant	Nbre de fraction de 500 ml versée	Poids brut (en g) du résidu obtenu	N° de la fraction	Produits séparés
MeOH/H ₂ O : 50/50 (v/v)	3	0.125	F1	Acides phénoliques et sucres
MeOH/H ₂ O : 45/55 (v/v)	5	0.225	F2	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH : 8.5/1.5 (v/v)	2	0.053	F3	Mélange des anthocyanes et tanins
CH ₂ Cl ₂ /MeOH : 8/2 (v/v)	1	0.025	F4	Tanins ou proanthocyanidines
CH ₂ Cl ₂ /MeOH : 7.5/2.5 (v/v)	1	0.072	F5	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH : 7/3 (v/v)	7	0.400	F6	

Les résultats de la chromatographie sur colonne de gel de silice des fractions oligomériques (F4, F5 et F6) sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 60 : CCM des fractions oligomériques.

Aspect physique	Masse (mg)	Eluant	Fractions	Masse (mg)	Rdt (%)	R _f
						0.35
						0.54
			F4	25	1.67	0.62
						0.61
						0.86
						0.24
Solide jaunâtre	1500 mg	C ₆ H ₁₂ /Acétone/H ₂ O 7/3/1	F5	72	4.80	0.26
						0.54
						0.81
						0.45
			F6	400	26.67	0.60
						0.84

La fraction F6 est, ensuite, purifiée par chromatographie sur couche mince sur gel de silice à support en verre, en utilisant comme éluant *n*-C₆H₁₂/Acétone/H₂O : 6/3/1 contenant quelque goutte d'une solution d'acide acétique 1%. Ce fractionnement conduit à l'obtention de trois proanthocyanidines notées AUT1, AUT2 et AUT3.

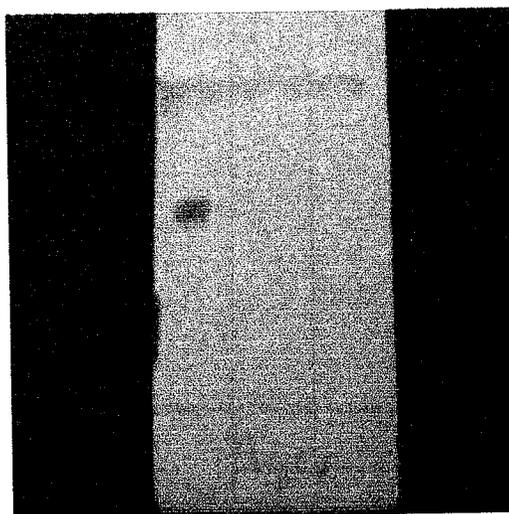


Figure 45 : CCM des tanins séparés à partir des tiges d'*Arbutus unedo* L.

5.2. Analyses spectroscopiques

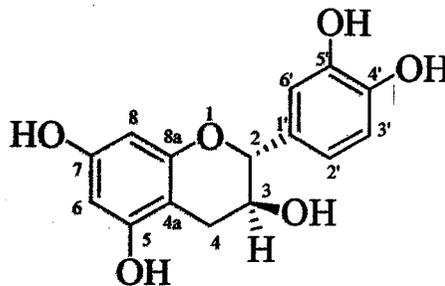
- AUT1 :

Formule brute : $C_{15}H_{14}O_6$

Masse molaire : $290.08 \text{ g.mol}^{-1}$

Aspect : solide jaunâtre

T_f : $240 \text{ }^\circ\text{C}$



(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphényl)chroman-3,5,7-triol (Catéchine)

Analyse élémentaire : Calc : C 61.98% ; H 4.75%

Tr : C 62.07% ; H 4.86%

IR : $\nu \text{ max (cm}^{-1}\text{)}$ (KBr) : 3363, 2955, 2924, 2854, 1686, 1609, 1518, 1456, 1363, 1281, 1141, 1101, 1031, 869, 818, 764.

RMN ^1H (MeOD) δ_{ppm} : 2.48 (dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}} = 6 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-4/H-4}} = 15 \text{ Hz}$), 2.85 (dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}} = 6$, $J_{\text{H-4/H-4}} = 15 \text{ Hz}$), 3.96 (ddd, 1H, H-3, $J_{\text{H-3/H-2}} = 9 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-3/H-4}} = 6 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-3/H-4}} = 3 \text{ Hz}$), 4.58 (d, 1H, H-2, $J_{\text{H-2/H-3}} = 9 \text{ Hz}$), 5.87 (d, 1H, H-6, $J_{\text{H-6/H-8}} = 3 \text{ Hz}$), 5.94 (d, 1H, H-8, $J_{\text{H-8/H-6}} = 3 \text{ Hz}$), 6.74 (m, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, 1H, H-3').

RMN ^{13}C (MeOD) δ_{ppm} : 28.51 (C-4), 68.81 (C-3), 82.85 (C-2), 95.49 (C-8), 96.30 (C-6), 100.83 (C-4a), 115.25 (C-2'), 146.21 (C-5'), 120.01 (C-6'), 132.23 (C-1'), 116.07 (C-3'), 146.23 (C-4'), 157.54 (C-5), 157.81 (C-7), 156.89 (C-8a).

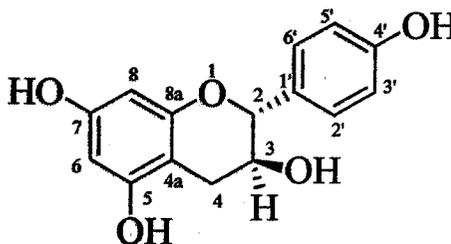
- AUT2 :

Formule brute : $C_{15}H_{14}O_5$

Masse molaire : $274.08 \text{ g.mol}^{-1}$

Aspect : solide jaunâtre

T_f : $247 \text{ }^\circ\text{C}$



(2R,3S)-2-(4-hydroxyphényl)chroman-3,5,7-triol (Afzeléchine)

Analyse élémentaire : Calc : C 65.69% ; H 5.15%

Tr : C 65.58% ; H 5.08%

IR : $\nu \text{ max (cm}^{-1}\text{)}$ (KBr) : 3338, 2958, 2927, 2856, 1626, 1518, 1466, 1373, 1284, 1142, 1045, 818, 668.

RMN ^1H (acetone- d_6) δ_{ppm} : 2.38 (dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}} = 8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-4/H-4}} = 16 \text{ Hz}$), 2.76 (dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}} = 4 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-4/H-4}} = 16 \text{ Hz}$), 3.84 (ddd, 1H, H-3, $J_{\text{H-3/H-2}} = 8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-3/H-4}} = 4 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-3/H-4}} = 8 \text{ Hz}$), 4.42 (d, 1H, H-2, $J_{\text{H-2/H-3}} = 8 \text{ Hz}$), 5.74 (d, 1H, H-6, $J_{\text{H-6/H-8}} = 4 \text{ Hz}$), 5.89 (d, 1H, H-8, $J_{\text{H-8/H-6}} = 4 \text{ Hz}$), 6.65 (m, 3H, H-3', H-5', H-6'), 6.76 (d, 1H, H-2').

RMN ¹³C (acétone-d₆) δ_{ppm} : 29.01 (C-4), 68.38 (C-3), 82.75 (C-2), 95.50 (C-8), 96.17 (C-6), 100.70 (C-4a), 120.11 (C-2'), 115.28 (C-5'), 120.32 (C-6'), 132.25 (C-1'), 115.75 (C-3'), 145.71 (C-4'), 157.24 (C-5), 157.76 (C-7), 156.95 (C-8a).

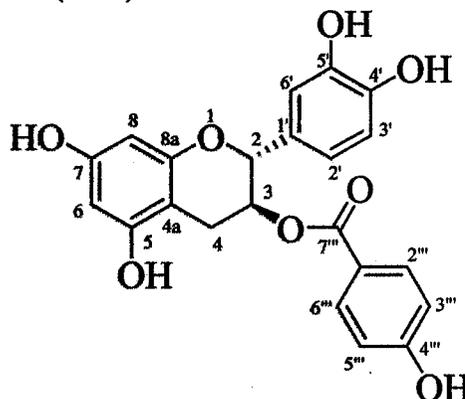
- AUT3 :

Formule brute : C₂₂H₁₈O₈

Masse molaire : 410.1 g.mol⁻¹

Aspect : solide jaunâtre

T_f : 248.6 °C



(2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihydroxyphényl)-5,7-dihydroxychroman-3-yl 4-hydroxybenzoate

Analyse élémentaire : Calc : C 64.39% ; H 4.42%

Tr : C 64.28%; H 4.35 %

IR : ν max (cm⁻¹) (KBr) : 3378, 2955, 2859, 1723, 1611, 1518, 1461, 1378, 1278, 1136, 1073, 959, 816, 816, 737.

RMN ¹H (acetone-d₆) δ_{ppm} : 2.37 (dd, 1H, H-4, J_{H-4/H-3} = 8 Hz, J_{H-4/H-4} = 16 Hz), 2.75 (dd, 1H, H-4, J_{H-4/H-3} = 8 Hz, J_{H-4/H-4} = 16 Hz), 3.84 (dt, 1H, H-3, J_{H-3/H-2} = 4 Hz, J_{H-3/H-4} = 8 Hz, J_{H-3/H-4} = 4 Hz), 4.42 (d, 1H, H-2, J_{H-2/H-3} = 8 Hz), 5.75 (d, 1H, H-6, J_{H-6/H-8} = 4 Hz), 5.89 (d, 1H, H-8, J_{H-8/H-6} = 4 Hz), 6.62 (m, 2H, H-3', H-6'), 6.76 (d, 1H, H-2'), 7.69 (s, H-2'''), 7.75 (s, H-3'''), 7.86 (s, H-5'''), 8.04 (s, H-6''').

RMN ¹³C (acetone-d₆) δ_{ppm} : 28.86 (C-4), 68.38 (C-3), 82.75 (C-2), 95.49 (C-8), 96.17 (C-6), 100.47 (C-4a), 115.75 (C-2'), 146.38 (C-5'), 120.10 (C-6'), 132.13 (C-1'), 115.28 (C-3'), 147.67 (C-4'), 157.86 (C-5), 157.05 (C-7), 154.25 (C-8a), 124.38 (C-1'''), 166.48 (C-7'''), 105.70 (C-2'''), 114.08 (C-3'''), 147.67 (C-4'''), 114.00 (C-5'''), 108.82 (C-6''').

5.3. Fractionnement des proanthocyanidines des racines

Même mode opératoire que celui appliqué lors de l'extraction des tiges. L'extrait de racines se présente sous forme d'un solide rouge bordeaux (4.5 g, 1.5%). Ce dernier subit une nouvelle extraction avec 3x50 ml d'acétate d'éthyle suivie d'un séchage sur MgSO₄. Après concentration de la solution, 1.5 g de produit, sous forme d'un solide rougeâtre, sont obtenus. La chromatographie sur colonne est réalisée dans les conditions employées précédemment.

Tableau 61 : Résultats de la chromatographie sur colonne de silice.

Eluant	Nbre de fraction de 500 ml versée	Poids brut (en g) du résidu obtenu	N° de la fraction	Produits séparés
MeOH/H ₂ O : 9.5/0.5 (v/v)	5	0.323	F1	Acides phénoliques et sucres
CH ₂ Cl ₂ /MeOH : 8/2 (v/v)	7	0.225	F2	} Mélange
CH ₂ Cl ₂ /MeOH : 7.5/2.5(v/v)	1	0.328	F3	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH : 7/3 (v/v)	4	0.519	F4	} Tanins ou Proanthocyanidines
CH ₂ Cl ₂ /MeOH : 6.5/3.5(v/v)	3	0.105	F5	

Les résultats du fractionnement de F4 et F5 (fractions oligomériques) sont résumés ci-dessous :

Tableau 62 : CCM des fractions oligomériques.

Aspect physique	Masse (mg)	Eluant	Fraction	Masse (mg)	Rdt (%)	R _f
Solide rouge bordeaux	1500mg	C ₆ H ₁₂ /Acétone/H ₂ O 6/3/1				0.22
			F4	519	34.6	0.68
						0.80
			F5	105	7.0	0.38
						0.56
						0.81

La purification de la fraction F4, par chromatographie sur colonne de silice en utilisant le mélange éluant C₆H₁₂/Acétone/H₂O : 6/3/1 contenant quelques gouttes d'acide acétique 1%, permet l'isolement de trois proanthocyanidines dont deux à l'état pur notés AUR1 et AUR2.

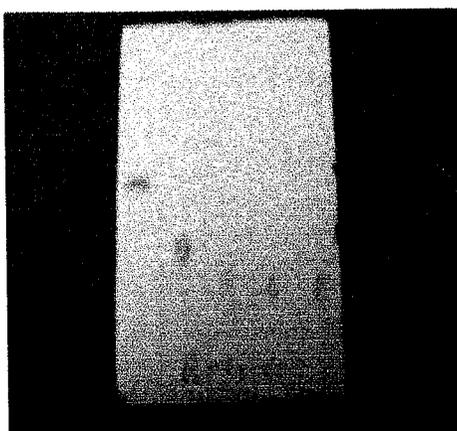


Figure 46 : CCM des tanins séparés par colonne à partir des racines d'*Arbutus unedo* L.

5.4. Analyses spectroscopiques

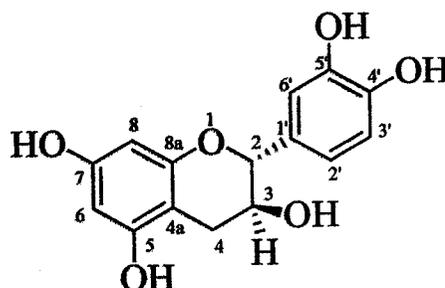
- AUR1 :

Formule brute : $C_{15}H_{14}O_6$

Masse molaire : $290.08 \text{ g.mol}^{-1}$

Aspect : solide jaunâtre

T_f : $238 \text{ }^\circ\text{C}$



(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphényl)chroman-3,5,7-triol (Catéchine)

IR : $\nu \text{ max (cm}^{-1}\text{)}$ (KBr) : 3368, 2929, 1612, 1520, 1449, 1365, 1281, 1144, 1061, 817, 663.

RMN ^1H (MeOD) δ_{ppm} : 2.48 (dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}} = 6 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-4/H-4}} = 15 \text{ Hz}$), 2.83 (dd, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}} = 6 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-4/H-4}} = 15 \text{ Hz}$), 4.56 (ddd, 1H, H-3, $J_{\text{H-3/H-2}} = 3 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-3/H-4}} = 6 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-3/H-4}} = 9 \text{ Hz}$), 4.56 (d, 1H, H-2, $J_{\text{H-2/H-3}} = 9 \text{ Hz}$), 5.86 (d, 1H, H-6, $J_{\text{H-6/H-8}} = 3 \text{ Hz}$), 5.93 (d, 1H, H-8, $J_{\text{H-8/H-6}} = 3 \text{ Hz}$), 6.71 (m, 2H, H-2', H-3'), 6.85 (d, 1H, H-6').

RMN ^{13}C (MeOD) δ_{ppm} : 28.53 (C-4), 68.80 (C-3), 82.83 (C-2), 95.43 (C-8), 96.19 (C-6), 100.75 (C-4a), 115.19 (C-2'), 146.18 (C-5'), 119.99 (C-6'), 132.16 (C-1'), 116.02 (C-3'), 146.21 (C-4'), 157.56 (C-5), 157.80 (C-7), 156.88 (C-8a).

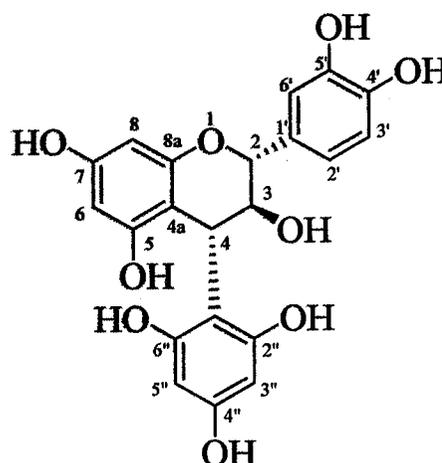
- AUR2 :

Formule brute : $C_{21}H_{18}O_9$

Masse molaire : 414.1 g.mol^{-1}

Aspect : solide orangé

T_f : $264\text{-}266 \text{ }^\circ\text{C}$



(2R,3S,4R)-2-(3,4-dihydroxyphényl)-4-(2,4,6-trihydroxyphényl)chroman-3,5,7-triol (Catéchine-(4 α →2)-phloroglucinole)

IR : $\nu \text{ max (cm}^{-1}\text{)}$ (KBr) : 3323, 2934, 2854, 2770, 1626, 1522, 1469, 1377, 1289, 1147, 1080, 1030, 868, 819.

RMN ^1H (acétone- d_6) δ_{ppm} : 4.04 (dd, 1H, H-3, $J_{\text{H-3/H-2}} = 8 \text{ Hz}$, $J_{\text{H-3/H-4}} = 12 \text{ Hz}$), 4.42 (d, 1H, H-2, $J_{\text{H-2/H-3}} = 8 \text{ Hz}$), 4.62 (d, 1H, H-4, $J_{\text{H-4/H-3}} = 12.0 \text{ Hz}$), 5.74 (d, 1H, H-6, $J_{\text{H-6/H-8}} = 4 \text{ Hz}$), 5.89 (d, 1H, H-8, $J_{\text{H-8/H-6}} = 4 \text{ Hz}$), 6.62 (m, 2H, H-3', H-6'), 6.76 (d, 1H, H-2'), 6.09 (2s, 2H, H-3'', H-5'').

RMN ¹³C (acétone-d₆) δ_{ppm} : 28.85 (C-4), 68.38 (C-3), 82.75 (C-2), 96.17 (C-8), 95.50 (C-6), 107.27 (C-4a), 115.28 (C-2'), 145.66 (C-5'), 120.10 (C-6'), 132.25 (C-1'), 115.75 (C-3'), 145.73 (C-4'), 157.76 (C-5), 157.24 (C-7), 156.95 (C-8a), 102.88 (C-1''), 155.30 (C-2''), 100.70 (C-3''), 158.37 (C-4''), 100.20 (C-5''), 162.12 (C-6'').

VII.6. Etude du pouvoir antimicrobien et antifongique de l'*Arbutus unedo* L.

6.1. Introduction

Au cours de cette étude, plusieurs extraits de l'*Arbutus unedo* L. obtenus par l'emploi de plusieurs solvants de polarité différente et par chromatographie sur colonne sont testés sur différents micro-organismes :

- Six extraits d'*Arbutus unedo* L. : Extrait aqueux des racines (AUR_{aq}), extrait aqueux des tiges (AUT_{aq}), extrait aqueux des feuilles (AUF_{aq}), extrait méthanolique des racines (AUR_{MeOH}), extrait méthanolique des tiges (AUT_{MeOH}), extrait méthanolique des feuilles (AUF_{MeOH}).

- Cinq fractions obtenues par chromatographie sur colonne : AUR3, AUR2, AUT1, AUT2, AUT3.

Lors de l'évaluation de l'activité antimicrobienne, les extraits d'arbousier sont dissous dans le DMSO. Pour chaque échantillon, 25 µl de la solution préparée sont déposés sur un disque en papier filtre de 5 mm de diamètre.

6.2. Provenance des germes

Les souches utilisées proviennent du laboratoire de microbiologie du département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen. Elles sont à l'origine de maladies courantes (infections urinaires, broncho-pulmonaires, cutanées, digestives etc...) et constituent aussi des contaminants fréquents (comme les champignons), provoquant ainsi d'importantes mycoses (comme les levures).

Les germes utilisés sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 63 : Les micro-organismes utilisés

Micro-organismes	Nature	Sigle	Type
<i>Escherichia coli</i>	Bactérie	Ec	Gram (-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie	Pa	Gram (-)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie	Sa	Gram (+)
<i>Listeria monocytogens</i>	Bactérie	Lm	Gram (+)
<i>Candida albicans</i> 444	Levure	Ca	/
<i>Penicillium</i> sp.	Moisissure	Pf	/
<i>Alternaria</i> sp.	Moisissure	Al	/
<i>Trichoderma</i> sp.	Moisissure	Tr	/

6.3. Effet antimicrobien des antibiotiques & des antifongiques

Nous avons testé la sensibilité des souches retenues vis-à-vis des ATB et des ATF couramment employés. Plusieurs tests sont effectués sur différents microorganismes (bactéries, levures et moisissures) au niveau du Laboratoire de microbiologie du Centre hospitalo-universitaire (CHU) de Tlemcen.

Tableau 64 : Les ATB/ATF utilisés.

Groupe microbien	ATB/ATF	Sigle	Charge du disque
Bactéries	Gentamicine	GT	25µg
	Pristinamycine	PT	15µg
	Pipéracilline	PIP	100µg
	Ampicilline	AM	10µg
	Acide pipémidique	PI	20µg
Levures	Pénicilline	P	6µg
	Amphotéricine B	AB	100 µg
Moisissures	Econazole	Ec	50 µg

Le choix des antibiotiques et des antifongiques repose sur leur emploi courant au CHU et leur disponibilité. Les résultats des antibiogrammes sur les souches de références étudiées sont résumés sur le tableau suivant :

Tableau 65 : Résultats des tests des ATB/ATF sur les différentes souches.

	GT	PT	PIP	AM	PI	P	AB	EC
<i>Escherichia coli</i>	22	i	30	i	30	i	nd	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	i	20	i	i	i	nd	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	30	27	17	i	i	nd	nd
<i>Listeria monocytogens</i>	20	nd	i	i	i	i	nd	nd
<i>Candida albicans</i> 444	nd	22	nd	nd	nd	nd	22	nd
<i>Penicillium</i> sp.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	42
<i>Alternaria</i> sp.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	39
<i>Trichoderma</i> sp.	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	42

nd : non déterminé, i : inactif, les valeurs des diamètres d'inhibition sont données en mm

6.4. Méthodes employées pour l'étude de l'activité antibactérienne

6.4.1. Méthodes de dilution

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes d'antibiotiques.

En milieu liquide, l'inoculum bactérien est distribué dans une série de tubes (méthode de macro-dilution) ou de cupules (méthode de micro-dilution) contenant l'antibiotique. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antibiotique et où aucune croissance n'est visible.

En milieu solide, l'antibiotique est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose est ensemencée avec un inoculum des souches à étudier (un inoculateur à têtes multiples, appareil de STEERS, permet d'ensemencer de 20 à 30 souches différentes par boîte). Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antibiotique.

Dans la pratique courante, les méthodes de dilution sont de mises en œuvre délicates et/ou onéreuses et elles sont réservées à des laboratoires spécialisés.

6.4.2. Méthodes de diffusion : antibiogrammes standards

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard, imprégnés des antibiotiques à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe [8,9].

6.4.3. Étude de l'activité antibactérienne

- Méthode de VINCENT

La méthode utilisée est celle de la diffusion des ATB sur gélose ou méthode des disques : Après préparation des inoculums et l'ensemencement de la gélose MULLER-HINTON (MH) par inondation, aspirer l'excès du liquide à la surface de la gélose, puis sécher pendant 15 à 20 min à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. A l'aide d'un distributeur de disques, placer plusieurs disques d'ATB, préalablement choisis, sur la surface de la gélose. Laisser les boîtes pendant 20 min à TA pour permettre une bonne diffusion de l'ATB. Incuber, ensuite, les boîtes à $37 \pm 1^\circ\text{C}$

pendant 18 à 24 h. Faire la lecture par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque, puis comparer à une échelle étalonnée fournie par l'institut Pasteur.

- Composition du milieu MULLER-HINTON

Infusion de viande de boeuf 300.0 g/l

Hydrolysate de caséine 17.5 g/l

Amidon 1.5 g/l

Agar 17.0 g/l

Eau distillée 1l

pH =7.4

Le pH du milieu MULLER-HINTON, sa concentration en magnésium et en calcium, et l'épaisseur de sa gélose une fois coulée en boîte de Pétri, sont adaptés à la pratique de l'antibiogramme ainsi qu'aux tests de sensibilité à diverses substances.

6.5. Effet antifongique des extraits en milieux solide

La même technique utilisée pour les antibiotiques est appliquée pour les antifongiques (ATF). Ces derniers sont déposés sous forme de petits disques à la surface du milieu de culture. Les boîtes sont ensuite incubées (levures : $30\pm 1^\circ\text{C}/48$ h, moisissures : $25\pm 1^\circ\text{C}/12$ h).

Dans le cas des champignons, l'inoculum se présente sous forme d'une suspension de spores dans l'eau physiologique stérile à 0.1% de TWEEN 80 pour que la suspension soit bonne, car les spores sont souvent hydrophobes. Ces derniers proviennent d'une culture de 7 jours en boîtes de Pétri.

Les inoculums sont, ensuite, dilués et soumis à des numérations cellulaires à l'aide d'une cellule de THOMAS afin de rechercher la dilution qui correspond à spores/ml pour les champignons et moisissures.

En ce qui concerne la CMI en aromathérapie nous avons :

CMI < 50 µg /ml : excellent pouvoir inhibiteur

CMI < 50 µg /ml < 250 µg /ml : pouvoir inhibiteur intéressant.

CMI < 250 µg /ml < 500 µg /ml : faible pouvoir inhibiteur

CMI > 500 µg /ml : pouvoir inhibiteur médiocre ou nulle.

Références bibliographiques

- [1] N. Dohou, K. Yamani, S. Tahrouch, L.M. Idrissi Hassani, A. Badoc, N. Gmira, Screening phytochimique d'une endémique Ibero-Marocaine, *Thymelaea lythroïdes*, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **2003**, 142, 61-78.
- [2] A. Garcia, A. Granados, A. Saenz de Buruaga, Diterpenes, triterpenes and sterols of *Thymelea hirsuta* L. leaves. *Thymeleacea* photochemistry, *Annales Quim., Ser. C: Quim. Org. Biochim*, **1980**, 76(1), 94-95.
- [3] E.B. Hariri, G. Sallé, C. Andary, Involvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.), *Protoplasma*, **1991**, 162(1), 20-26.
- [4] P. Lebreton, M. Jay, B. Voirin, Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes, *Chim. Anal.*, **1967**, 49(7), 375-383.
- [5] K. Randerath, *Chromatographie sur couches minces*, Paris: Édition Gauthier-Villars, **1971**, p. 337-339.
- [6] P. Camille. Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers.: F, thèse de Doctorat ès Science, Université de Neuchâtel, **2001**.
- [7] J. Karchesy, Y. Bae, L. Chalker-Scott, R. F. Helm and L. Yeap Foo, Chromatography of proanthocyanidins, in "Plant polyphenols: synthesis, properties, significance", Ed. R. W. Hemingway and P. E. Laks, New-York, **1992**.
- [8] Leminor, L., Veron, M. *Bactériologie médicale*, Edition Flammarion, 2^e Ed. **1989**.
- [9] Duval, J., Soussy, C.J. *Antibiothérapie*, Edition Masson, 4^e Ed., Paris. **1990**.

Conclusion

Conclusion générale

Le présent travail contribue et participe à une connaissance scientifique de plus en plus approfondie sur *Arbutus unedo* L., une plante connue dans la région de Tlemcen pour ses vertus thérapeutiques. Cette étude permet d'établir les relations entre l'utilisation empirique de cette plante par la population et les connaissances scientifiques associant la chimie organique, la chimie analytique et la biologie.

Elle débute par l'identification des groupes chimiques présents dans les différentes parties de la plante (tiges, racines etc.) par des réactions (coloration, précipitation) facilement réalisables dans des tubes à essais. Ce triage préliminaire met en évidence la présence des tanins catéchiques, des flavonoïdes, des acides phénols, des composés flavoniques, des anthocyanes et des anthracénosides. La teneur en flavonoïdes totaux, mesurée par référence au quercétol, est de 0.56% dans les racines et de 0.34 % dans les tiges. De plus, les teneurs moyennes en anthocyanes dans les tiges et les racines sont égales respectivement à 3.65 et 1.02 mg/g, alors que celles des aglycones flavoniques sont estimées à 0.168 mg/g pour les racines et 0.115 mg/g pour les tiges.

Les méthodes d'extraction et de fractionnement employées permettent de séparer les tanins oligomériques et les tanins polymériques. Ces derniers sont obtenus par plusieurs fractionnements sur colonne de gel de silice dans le but d'obtenir un gradient DPM élevé. Il est à noter que leur séparation par CLHP est difficile pour la simple raison du grand nombre d'isomères et de dérivés possibles pour chaque polymère.

L'emploi de la ESI-MS montre la présence de la catéchine, la catéchine phloroglucinole et la catéchine-*O*-gallate dont les mécanismes de fragmentation sont presque semblables. D'autre part, les tanins à hauts poids moléculaires sont difficilement détectables.

La chromatographie sur colonne des extraits bruts permet d'isoler trois composés à partir des tiges et deux des racines de *Arbutus unedo* L. La caractérisation structurale de ces composés est réalisée au moyen des méthodes modernes d'analyses spectroscopiques, particulièrement la RMN ^1H et ^{13}C et la RMN 2D (HSQC). Ces analyses fines ont abouti, d'une part, à l'identification de la catéchine, l'afzeléchine et le (2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychroman-3-yl-4-hydroxy benzoate, dans les tiges, et d'autre part, à la catéchine et la catéchine-(4 α →2)-phloroglucinole dans les racines.

- Conclusion générale -

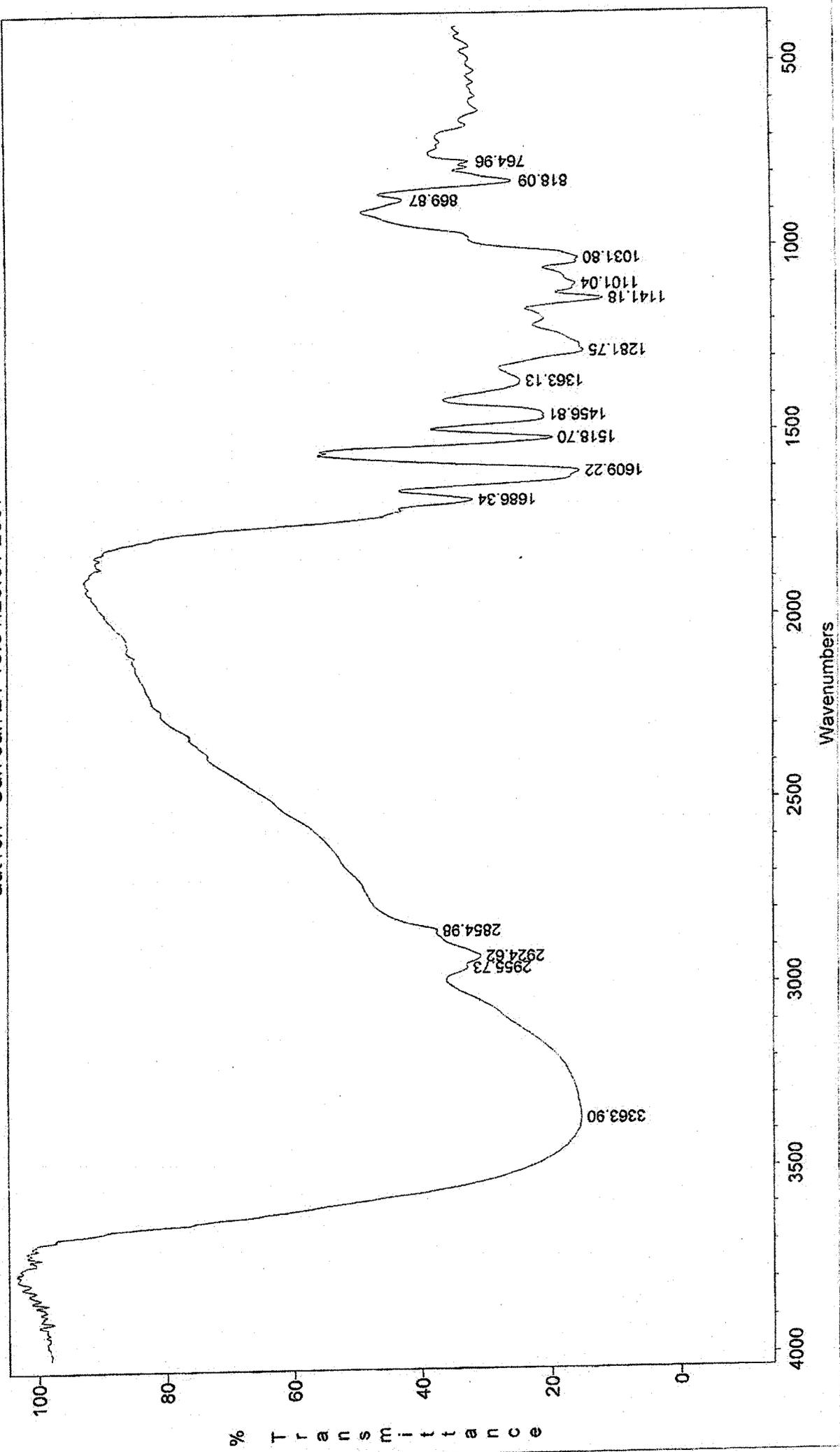
Afin de pouvoir exploiter une éventuelle activité thérapeutique de *Arbutus unedo* L., les extraits aqueux des racines, des tiges et des feuilles ainsi que cinq autres fractions obtenues par chromatographie sur colonne à partir des extraits bruts de polyphénols (AUR3, AUR2, AUT1, AUT2 et AUT3) sont soumis aux tests d'activité antibactérienne. Les résultats obtenus après comparaison des diamètres d'inhibition des extraits avec ceux des ATB montrent que l'extrait aqueux des racines présente une activité antibactérienne intéressante sur *E. Coli*. Cette activité, caractérisée par un diamètre d'inhibition de 30 mm, est comparable à celles de la PIP et de PI.

Il est à noter que la plupart des extraits présentent une activité antibactérienne variable d'une souche à une autre, dont l'importance dépend de la quantité d'extraits engagée dans le test antibactérien. De plus, l'extrait méthanolique et les fractions AUT1 et AUT2 révèlent une activité antifongique sur les souches de *Penicillium* sp., de *Alternaria* sp. et *Trichoderma* sp. Les résultats indiquent aussi une résistance de *C. albicans* 444, souche fongique pathogène difficile à combattre, vis-à-vis de tous les extraits soumis à nos investigations.

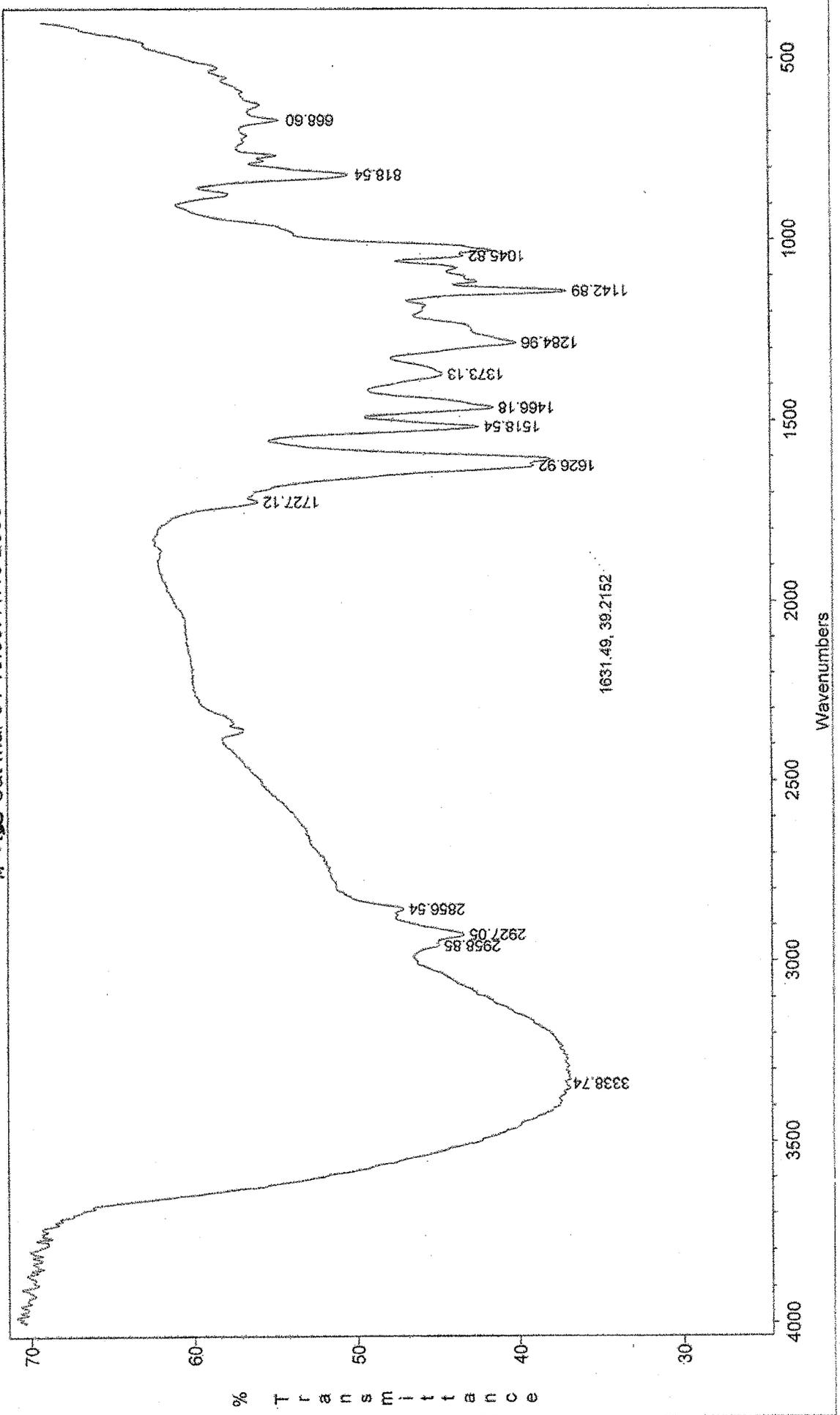
Enfin, ce travail initié sur l'une des plantes locales souligne que les usages thérapeutiques empiriques dans un domaine précis ne limitent pas l'ouverture des recherches vers de nouvelles applications potentielles. De ce point de vue, les médecines traditionnelles constituent un potentiel très intéressant pour la recherche dans le futur.

Annexe 1

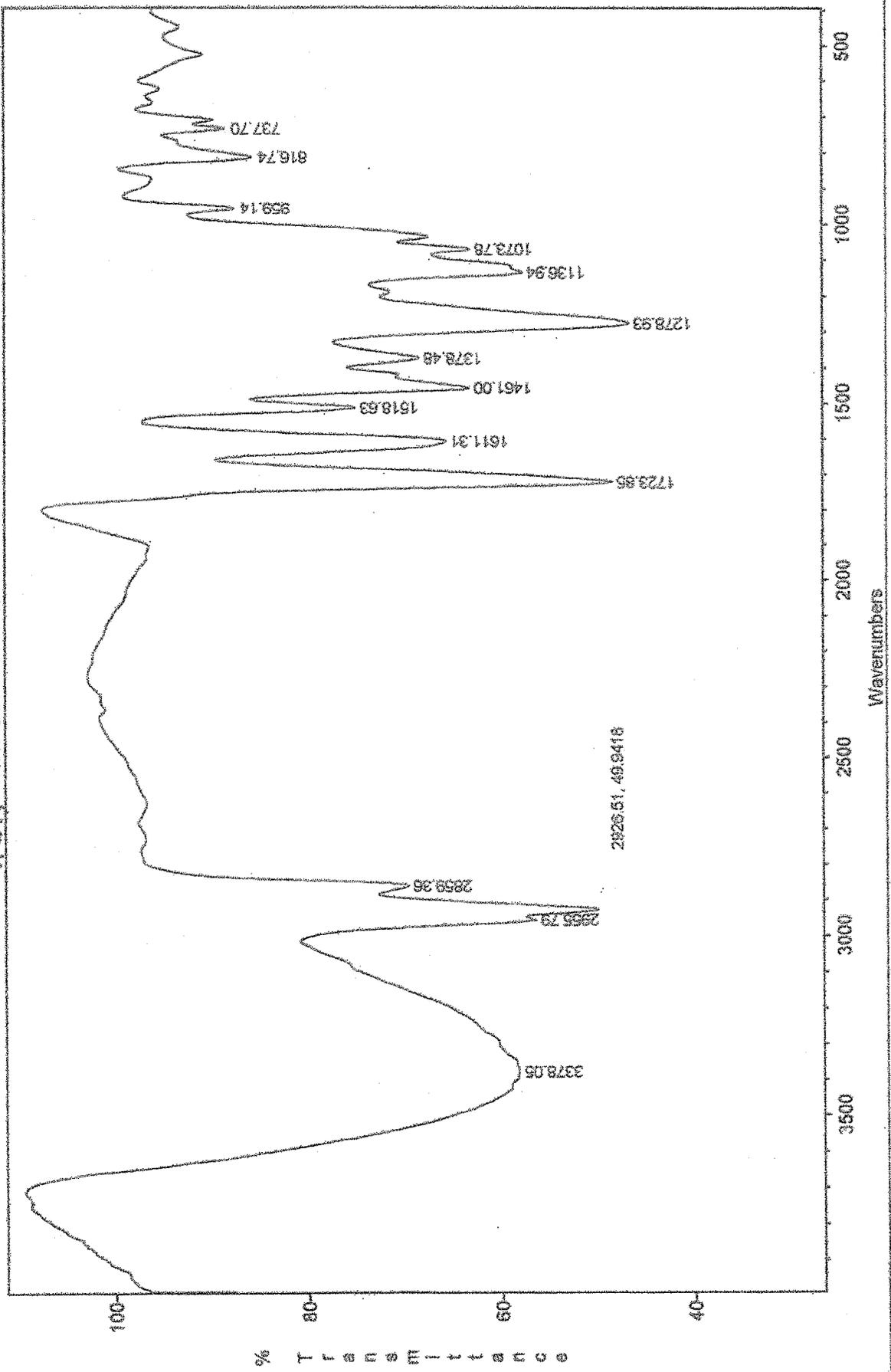
aut1ch Sun Jan 21 16:31:28:81 2007



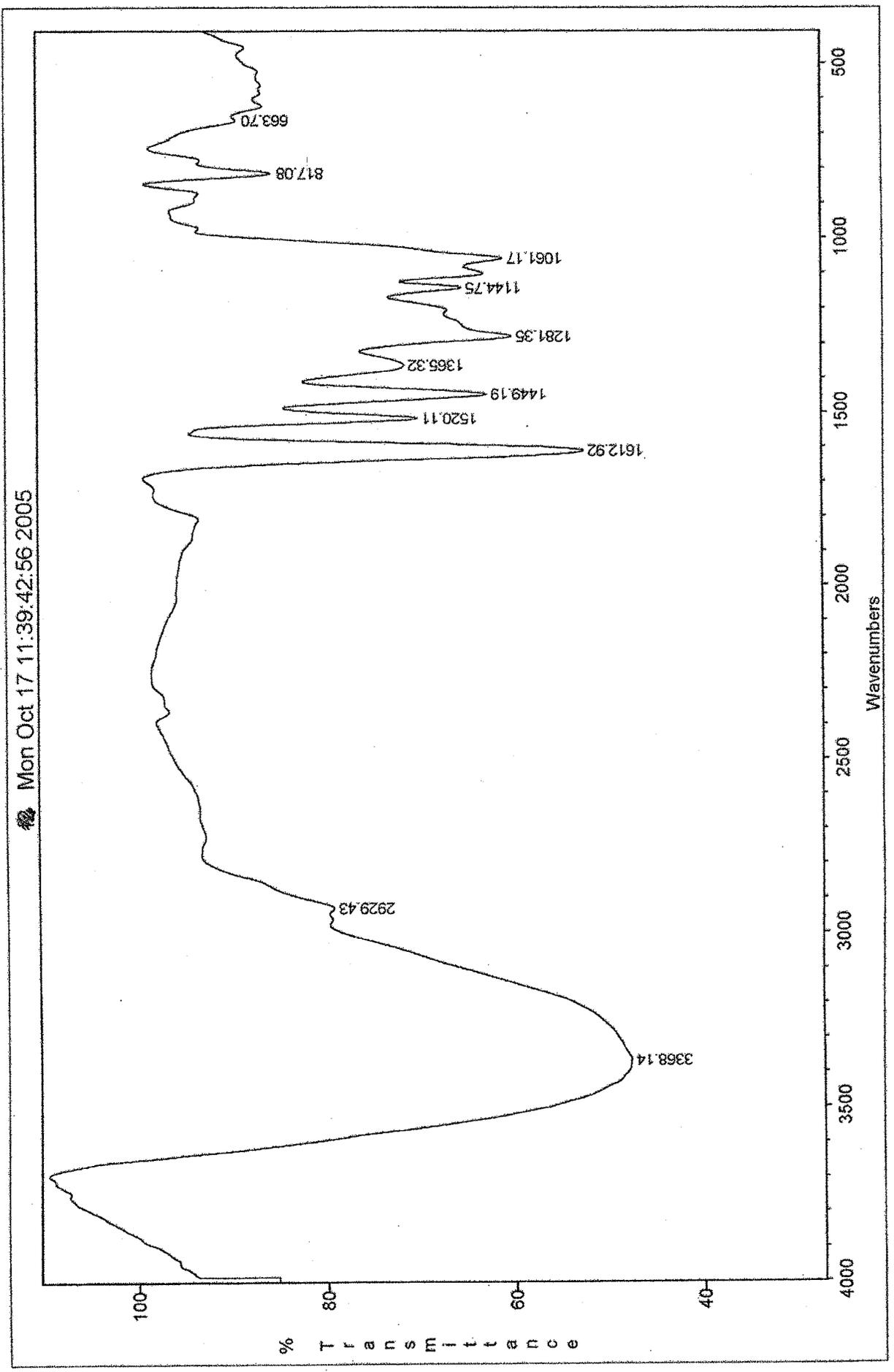
19 Sat Mar 04 10:39:41:18 2006



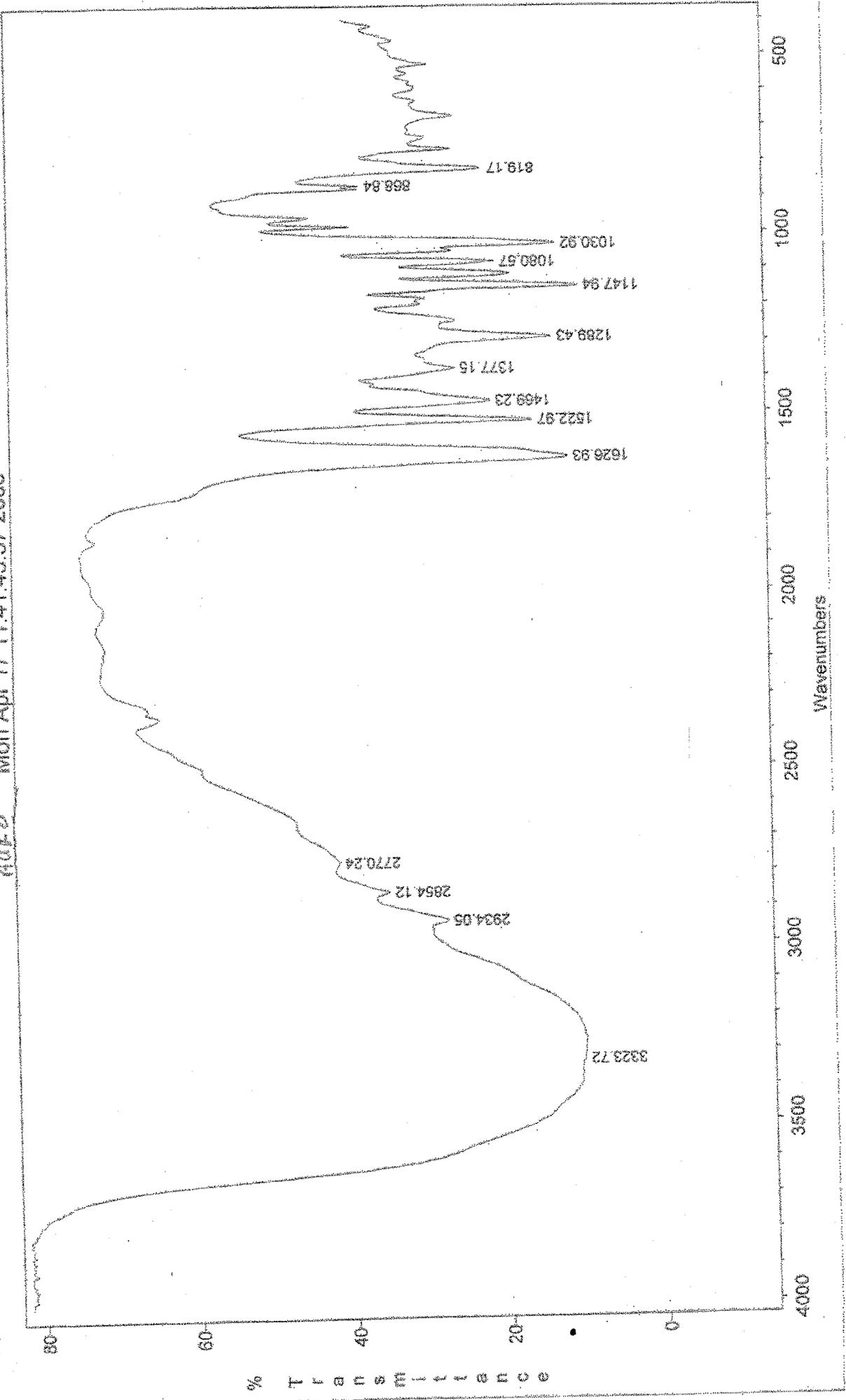
AUT Mon Oct 17 11:02:14:96 2005



FRP Zirconium Acrylate



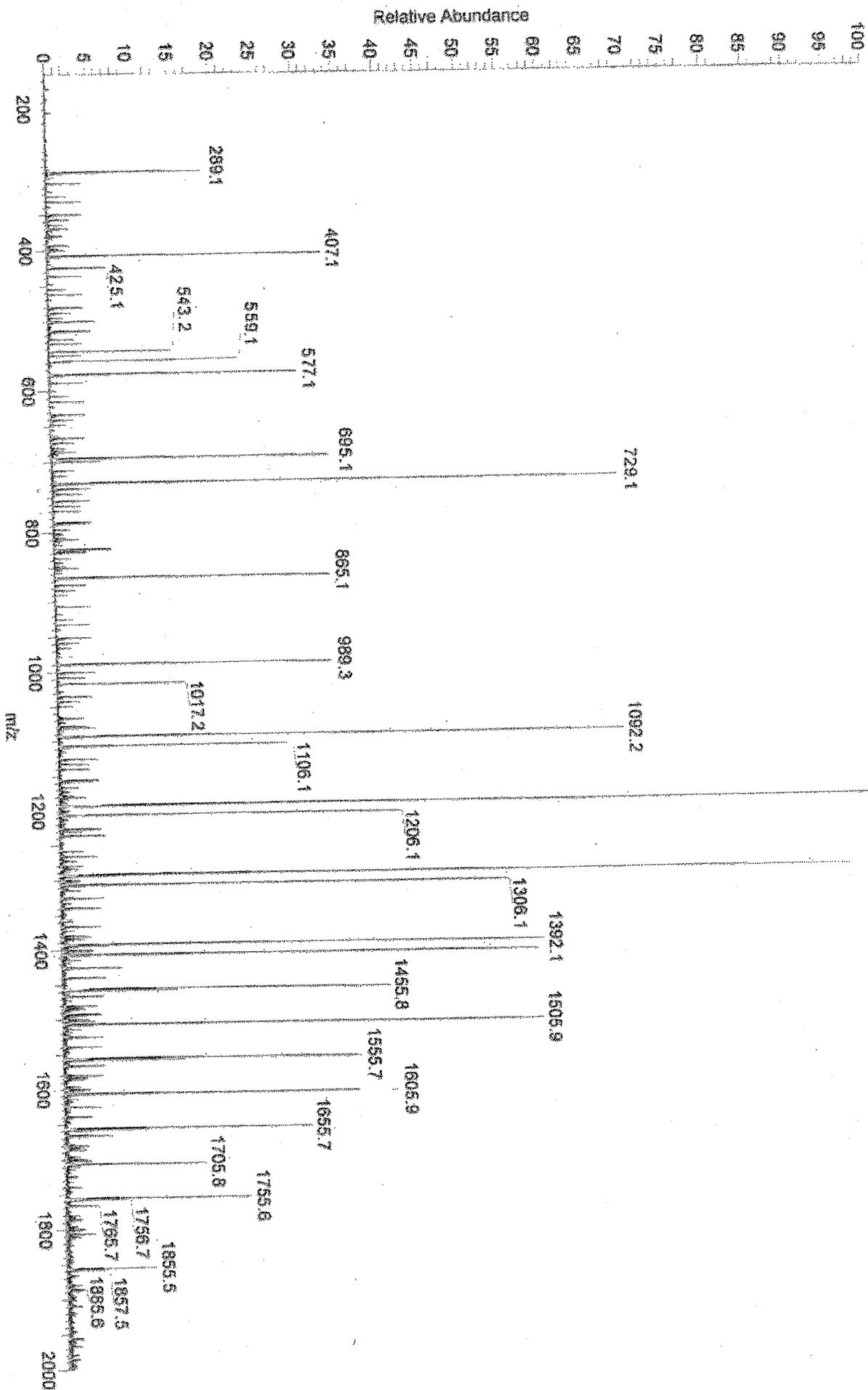
4082 Mon Apr 17 11:41:45:57 2006



Annexe 2

2006320RAW #88-180 RT: 2.775-98 AV: 103 NL: 281E5
T: -p.ms [150.00-2000.00]

1192.1 1292.1

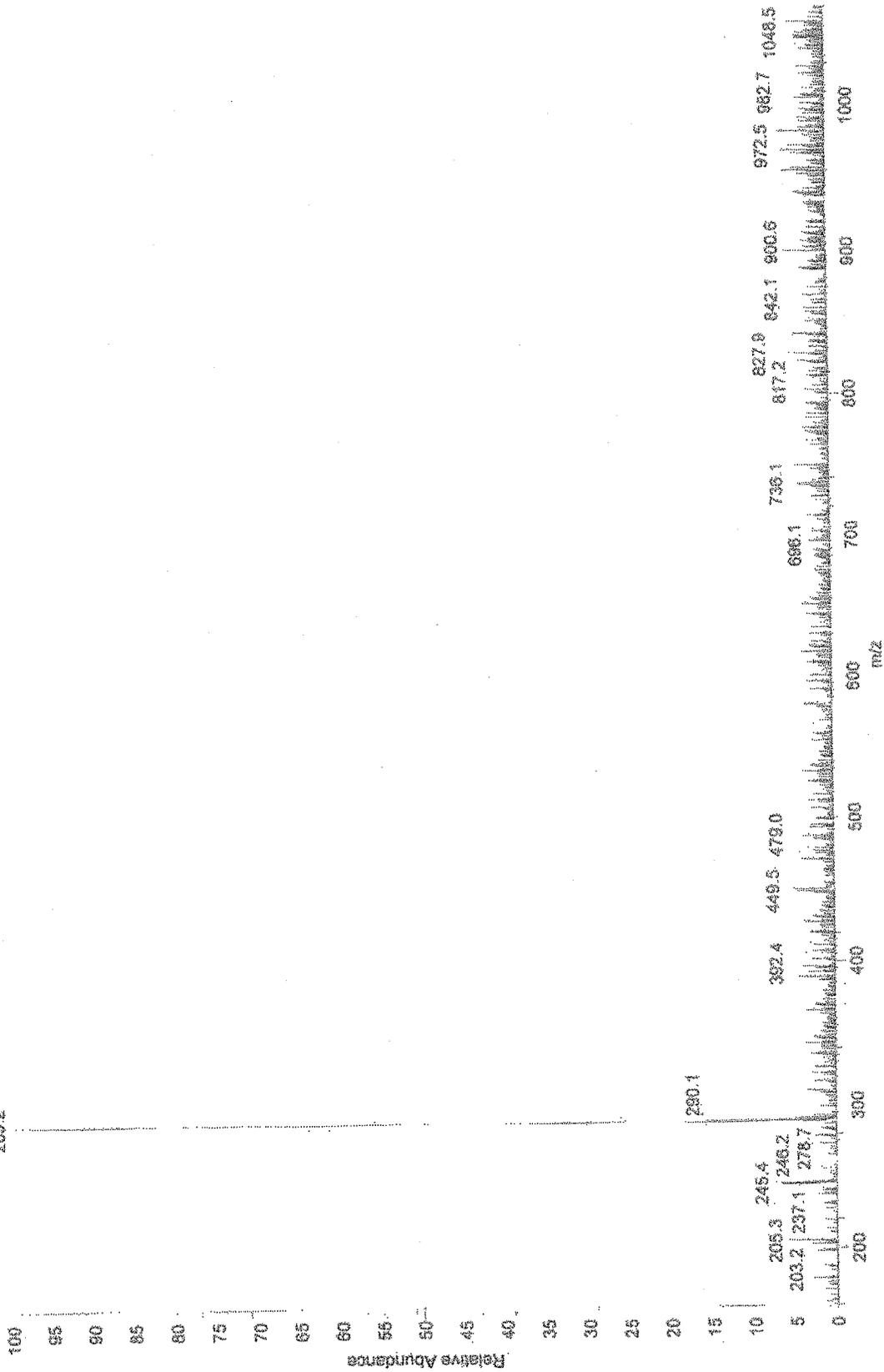


12/15/2006 02:51:26 PM AUT1

C:\calibur\data\2006327

2006327#16-88 RT: 0.52-2.67 AV: 70 NL: 4.84E3

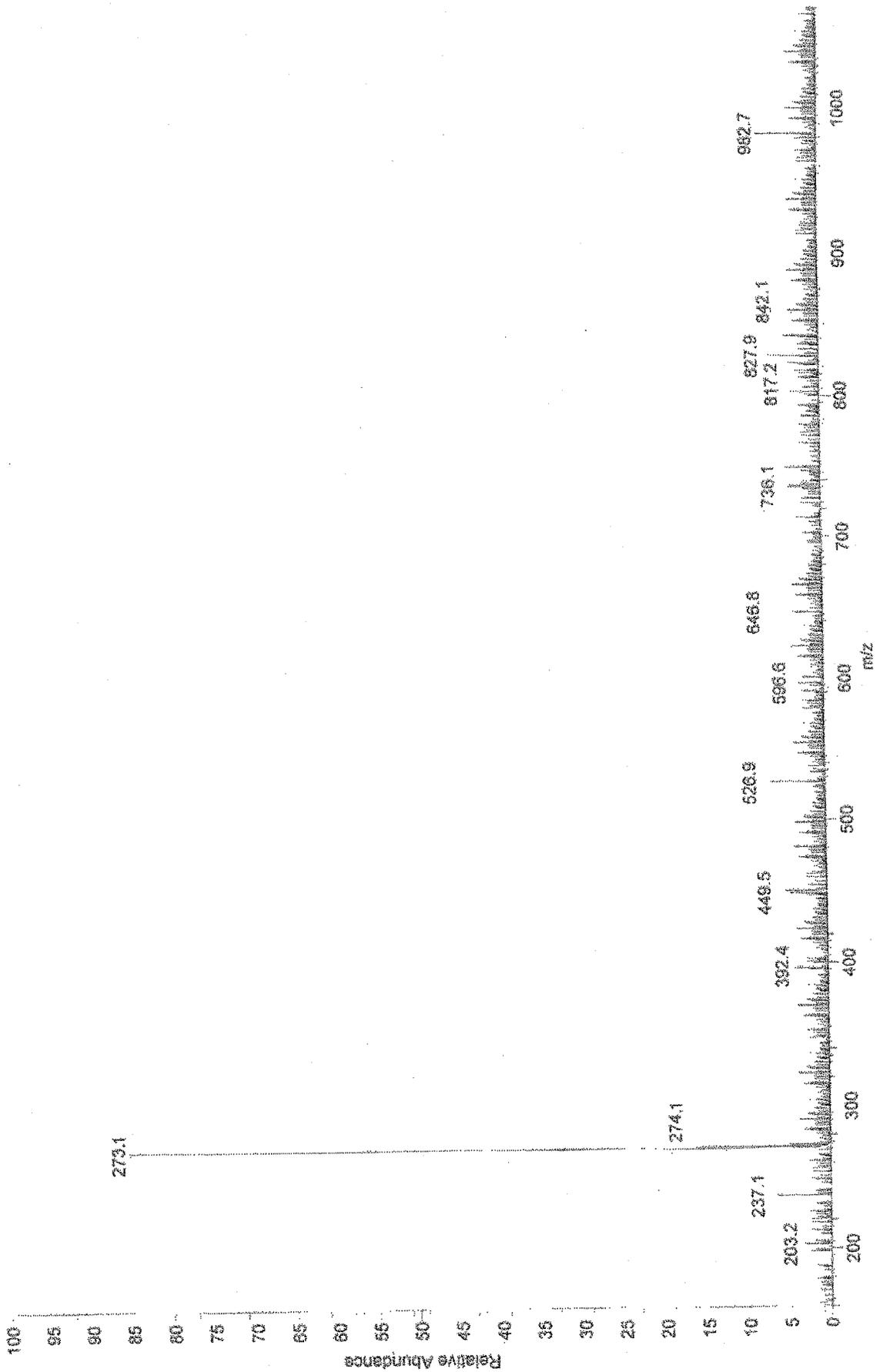
T: -p.ms [150.00-2000.00] 289.2



12/13/2006 03:26:19 PM AUT2

C:\Xcalibur\data\2006324

2006324 #16-85 RT: 0.42-2.77 AM: 70 NL: 3.84ES
T: - p.ms [150.00-2000.00]



d 300°C

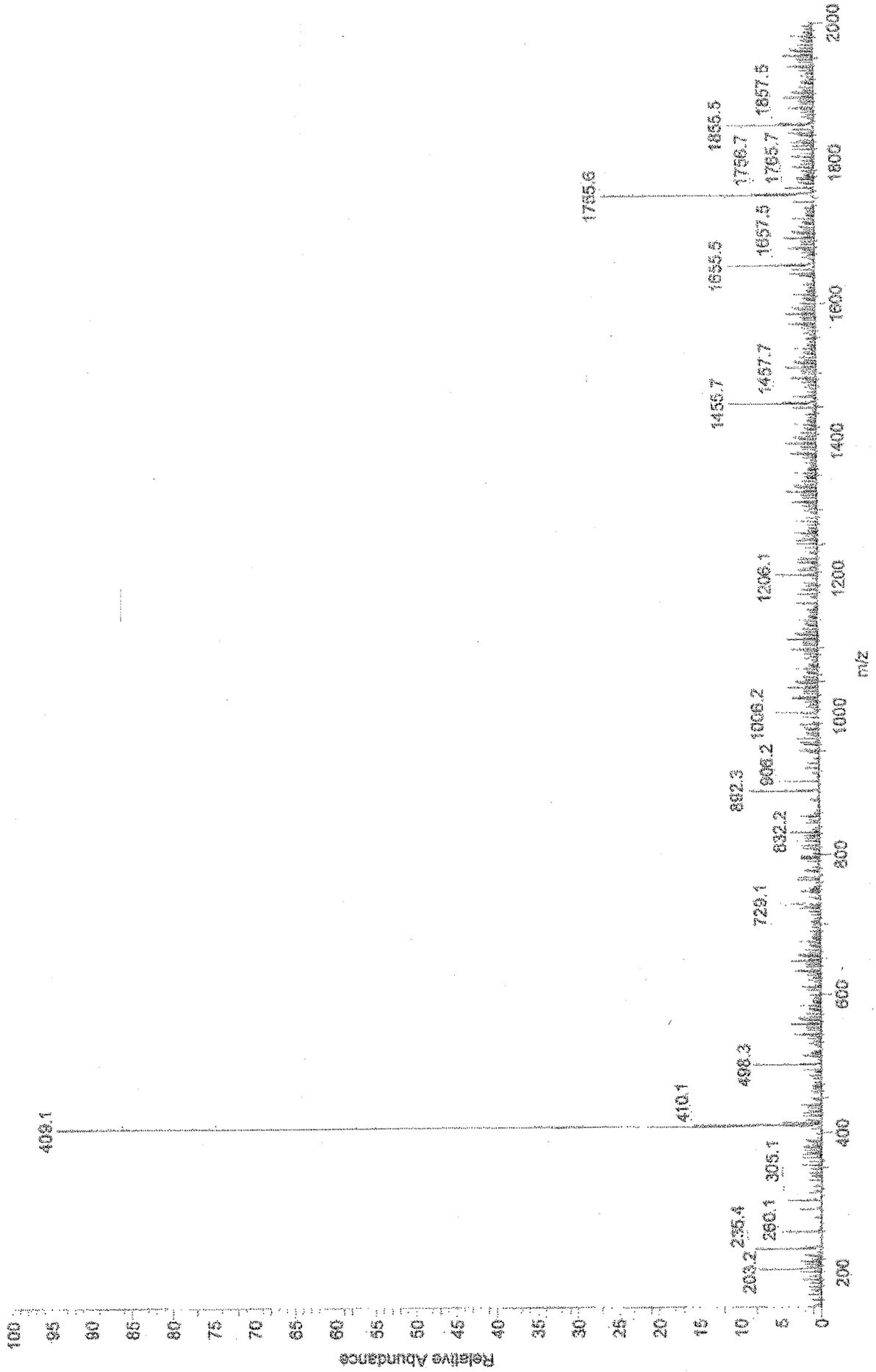
AUT3

12/12/2008 02:26:18 PM

C:\Cellbur\data\2006319

2006319 #88-190 RT: 0.64-5.86 AV: 103 NL: 9.53E5

T: - p ms [150.00-2000.00]



C:\Xcalibur\data\2006325

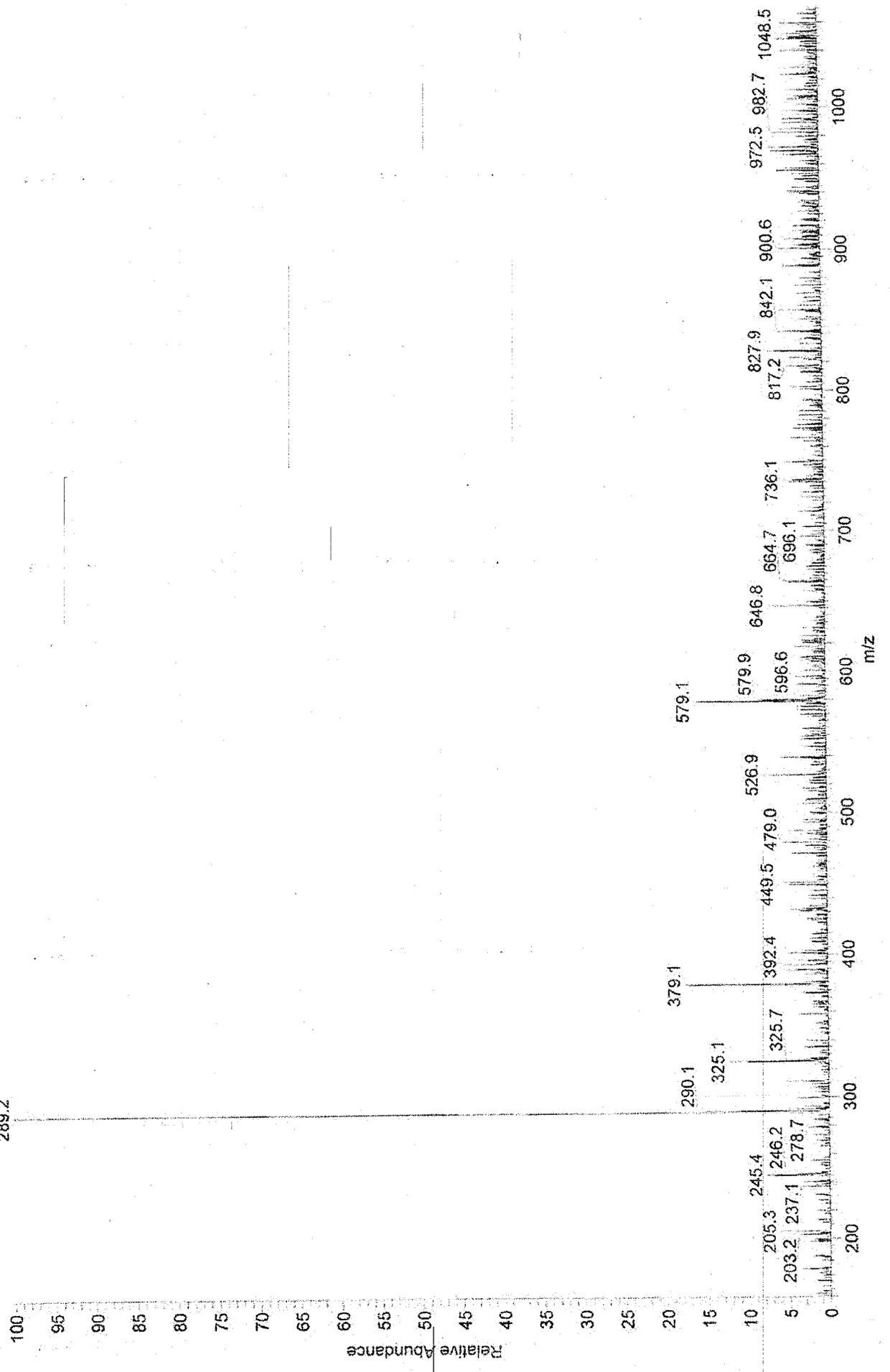
12/14/2006 03:54:22 PM

AUR

2006325 #16-85 RT: 0.54-2.87 AV: 70 NL: 4.84E3

T: - p.ms [150.00-2000.00]

289.2



300 °C

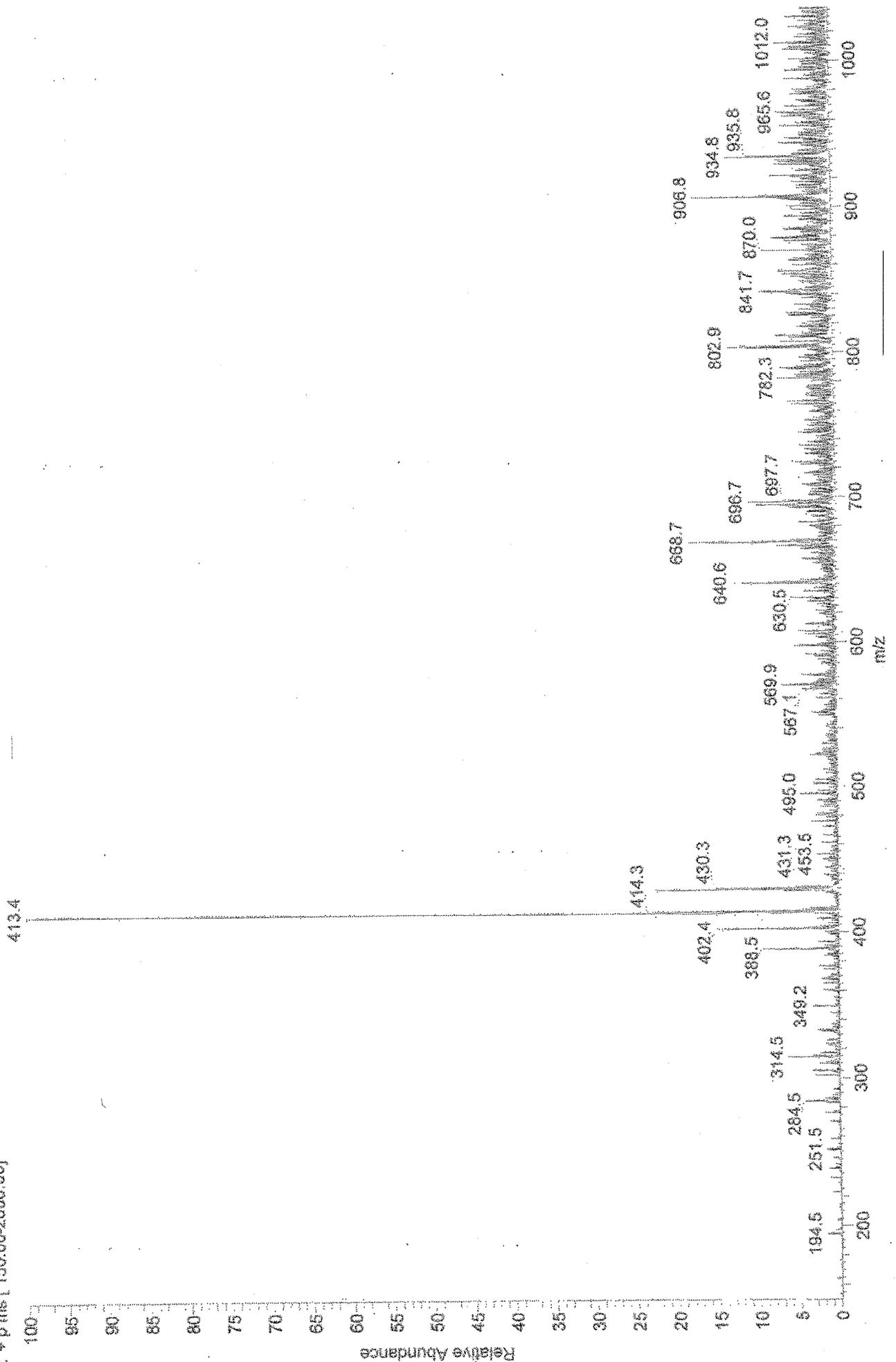
AUR

12/13/2006 04:57:20 PM

\\Xcalibur\data\2006323RAW_061213165720

006323RAW_061213165720 #13 RT: 0.40 AV: 1 NL: 1.17E5

: + p ms [150.00-2000.00]



A New Proanthocyanidins from *Arbutus unedo* L. Stems

M.A. DIB, H. ALLALI*, B. TABTI, A. BENDIABDELLAH and N. DJABOU
Laboratory of Organic Chemistry, Natural Products and Analysis (COSNA),
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University Aboubekr Belkaid BP 119,
Tlemcen 13000, Algeria
Fax: (213)43286530; E-mail: h_allali72@yahoo.fr

Proanthocyanidins extraction using a water/methanol/acetone mixture of the *Arbutus unedo* L. was followed by structural study, indicating the presence of (+)-catechin, (+)-afzelechin and of the unknown (3,4-dihydroxy-phenyl)-5,7-dihydroxychroman-3-yl 4-hydroxybenzoate.

Key Words: Proanthocyanidins, (+)-Catechin, *Arbutus unedo* L., (+)-Afzelechin.

INTRODUCTION

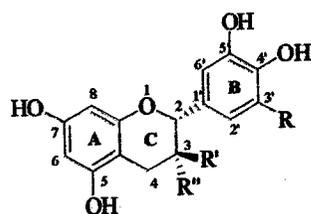
The *Arbutus unedo* L. is a large shrub that belongs to the Ericaceae family and originates in America. Yet, it is found in the garrigue, the hills of the Mediterranean areas, as well as in the Middle-East and Transcaucasia^{1,2}.

Arbutus unedo L. is a small tree of 4 m height, sometimes called strawberry tree due to the resemblance of its red and warty fruits to strawberries. The fruits are spherical with an approximate 2 cm diameter. The leaves are persistent and the flowers generally pinkish or white, joined together in small buckets, which makes it decorative. Fruits with yellow pulp are comestible and generally consumed fresh in frozen or in liquor form³. The fruits of the *Arbutus unedo* L. are used in traditional medicine as antiseptics, diuretics and laxatives. Moreover, the leaves and stems are used as antiseptics, diuretics, urinaries, astringents, depuratives and hypotensors⁴.

Catechin and epicatechin (Fig. 1) are known members of the proanthocyanidin family, a term used by the international scientific community to designate a broad family of oligomers and polymers belonging to the flavonoïds class. It is also synonymous with condensed tannins.

In fact, the procyanidins are polymers of catechin and of epicatechin, while prodelphinidines consist of galocatechin and epigallocatechin. They differ in the degree of hydroxylation on the B core, respectively dihydroxylated and trihydroxylated⁵.

The flavanols units and more particularly the epicatechin can be esterified by gallic acid at the carbon 3 position. The inter-monomeric bond is of B type connecting the C4 carbon of the first monomer to the C6 or C8 position of the second monomer⁶.



Catechin: $R=H, R'=OH, R''=H$
 Gallocatechin: $R=OH, R'=OH, R''=H$
 Epicatechin: $R=H, R'=H, R''=OH$
 Epigallocatechin: $R=OH, R'=H, R''=OH$
 Epicatechin 3-O-gallate: $R=H, R'=H,$
 $R''=O\text{-galloyl}$

Fig. 1. Constitutive monomeric units of the proanthocyanidins

Phytochemical research on leaves and bark of the *Arbutus unedo* L. led to the isolation of the monotropeinal iridoids⁷, unedide⁸, unedoside⁹, stilbericoside¹⁰ and geiposide⁷. The isolation of anthocyanes, glucolic acid and carotenoids from the fruits of this plant was also reported in the literature¹¹. The fruit contains *ca.* 14 % of carbohydrates and 150 to 280 mg of vitamin C¹².

Arbutus unedo L. is widespread in Terny forest, a study zone located in the proximity of Tlemcen city, west of Algeria. Its broad use in traditional medicine prompted us to isolate the stems tannins, suspected to possess antioxidant, antimicrobial and anti-hypertensive activities.

EXPERIMENTAL

The stems of *Arbutus unedo* L. were collected in the Terny forest (at about 20 km south of Tlemcen) at various vegetative stages. A portion was preserved at 4 °C for eventual further studies. The rest was air shade-dried, far from any humidity and then carefully stored. Samples were deposited and identified at the Botanical Laboratory of the Tlemcen University.

General experimental procedures: Melting points were determined on a Kofler block and are uncorrected. Optical rotations were measured on a Small Universal polarimeter. NMR spectra were recorded on a Bruker AMX 300 apparatus, operating with 300 MHz for ¹H spectra and with 75 MHz for ¹³C spectra. Chemical shifts are given in ppm, by comparison to the acetone-*d*₆ signal. IR spectra (KBr) were recorded on a Pye Unicam spectrophotometer. Mass spectra were recorded on a standard LCQ Thermo ion-trap spectrometer, operating on an ESI mode. The index of refraction was measured using Abbe refractometer 1T/4T ATA GO' S Itabshi K, Tokyo, Japan in 1% ethanol solution. Elementary analysis was performed on a LECO CHN-900 at 1000 °C, using 2.1 mg of sample under oxygen and helium atmosphere. Merck silica gel (230-400 mesh) was used for column chromatography. Merck 5554 Kieselgel 60 F254 0.25 mm thickness plate were used for TLC analysis. The chromatogram reading was done in daylight and under UV light ($\lambda = 350$ nm) before and after staining using a 1% FeCl₃ solution.

Extraction and isolation of compounds: 300 g of stems were crushed and extracted with 850 mL of water, 360 mL of methanol, then 650 mL of acetone at room temperature during 24 h. After filtration, acetone and methanol were removed *in vacuo*. The aqueous phase was extracted twice with 150 mL of methylene chloride in order to eliminate pigments and lipids and then lyophilized. The dry powder obtained was extracted 4 times with 150 mL of ethyl acetate. The combined organic layers were subsequently dried on MgSO₄. Filtration and concentration *in vacuo* yielded in 1.65 g of a yellowish solid (0.55 % yield). A part (1.50 g) of the ethyl acetate extract was subjected to column chromatography through silica gel (65 g). Elution with methanol/water (1/1) containing 0.1 % (v/v) acetic acid gave three fractions F1, F2 and F3, all being mixtures (Table-1).

TABLE-1
CHROMATOGRAPHIC FEATURES OF PROANTHOCYANIDINS

Fractions	Fluorescence	
	Before FeCl ₃	After FeCl ₃
F1	Yellowish	Blue green
F2	Yellowish	Blue green
F3	Yellowish	Blue green

Our efforts subsequently turned to the study of the F1 fraction (1.0 g). The two dimensional TLC performed on silica gel using hexane/acetone/water (1/2/1) containing 0.1 % (v/v/v) acetic acid yielded three compounds 1, 2 and 3 with different masses. The following data thus represents the results obtained after such study (Table-2).

TABLE-2
SEPARATION OF THE F1 FRACTION USING A
COLUMN CHROMATOGRAPHY

Physical aspect	Sample weight (g)	Column chromatography				
		Compd.	Weight (g)	Yield (%)	m.p. (°C)	R _f
Yellowish solid	1.0	1	0.38	38	240.0	0.84
		2	0.26	26	247.0	0.60
		3	0.18	18	248.6	0.34

It should be duly noted that out of the 1.0 g, a total of 0.82 g were obtained in the form of the three compounds, while 0.18 g was lost in the process. The structures of the isolated stem components are shown in Fig. 2.

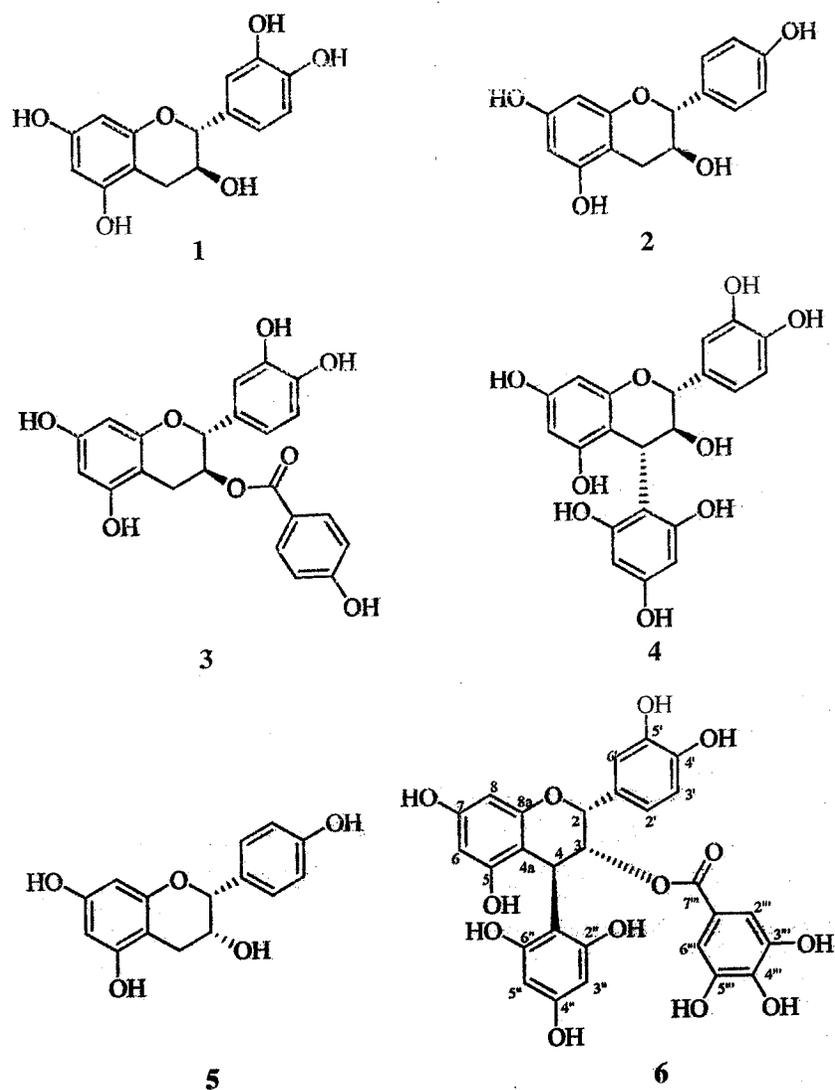


Fig. 2. Formulae: (+)-catechin (1), (+)-afzelechin (2), (+)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydrochroman-3-yl-4-hydroxybenzoate (3), (+)-catechin-(4 α →2) phloroglucinol (4), (+)-epiafzelechin (5), (-)-epicatechin-3-O-galloyl-(4 β →2) phloroglucinol (6)

As logically presumed, the isolated stems components 1, 2 and 3 were subsequently submitted to full identification, mostly relying on spectral analysis. The following represent the obtained data for each of those three compounds.

Compound 1: Yellowish solid; m.p. 240 °C (lit.¹³ 242 °C); $[\alpha]_D^{20} + 3.1^\circ$ (c 0.10, MeOH) (lit.¹⁴ $[\alpha]_D^{20} + 3^\circ$ (c 0.10, MeOH)); $n_D = 1.3420$; IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3363, 2955, 2924, 2854, 1609, 1518, 1456, 1363, 1281, 1141, 1101, 869, 818; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6) δ : 2.52-2.85 (m, H-4), 3.98 (ddd, H-3), 4.58 (d, H-2), 5.87 (d, H-6), 5.94 (d, H-8), 6.75 (dd, H-2', H-3'), 6.85 (d, H-6'), 9.60 (4H, m, exchangeable proton), signals that disappear after adding a D_2O drop. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6) δ : 28.50 (C-4), 68.80 (C-3), 82.84 (C-2), 95.51 (C-8), 96.30 (C-6), 100.82 (C-4a), 115.25 (C-2'), 146.20 (C-5'), 120.02 (C-6'), 132.22 (C-1'), 116.07 (C-3'), 146.23 (C-4'), 157.55 (C-5), 157.82 (C-7), 156.90 (C-8a); EIMS 70 eV, m/z 290 (M^+ , rel. int. 100); Anal. Calcd. (%) for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$: C 62.07, H 4.86; Found (%): C 61.98, H 4.75.

Compound 2: White needles; m.p. 247 °C (lit.¹⁵ 248-251 °C); $[\alpha]_D^{20} + 9^\circ$ (c 0.10, MeOH) (lit.¹⁵ $[\alpha]_D^{20} + 59.3^\circ$ (c 1.23, MeOH)); $n_D = 1.3360$; IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3326, 2958, 2924, 2853, 1609, 1520, 1466, 1369, 1283, 1140, 1100, 974, 870, 816; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6) δ : 2.40-2.78 (m, H-4), 3.86 (ddd, H-3), 4.42 (d, H-2), 5.74 (d, H-6), 5.89 (d, H-8), 6.75 (dd, H-2', H-3') 6.65 (dd, H-5', H-6'), 9.20 (3H, m, exchangeable proton), signals that disappear after adding a D_2O drop. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6) δ : 30.45 (C-4), 68.38 (C-3), 82.75 (C-2), 96.17 (C-8), 95.49 (C-6), 100.69 (C-4a), 120.04 (C-2'), 115.75 (C-5'), 120.10 (C-6'), 132.25 (C-1'), 115.28 (C-3'), 145.66 (C-4'), 157.23 (C-5), 157.76 (C-7), 156.95 (C-8a); EIMS 70 eV, m/z 274 (M^+ , rel. int. 100); Anal. Calcd. (%) for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$: C 65.69, H 5.15; found (%): C 65.58, H 5.08.

Compound 3: Yellowish solid; m.p. 248 °C; $[\alpha]_D^{20} + 132^\circ$ (c 0.10, MeOH); $n_D = 1.3460$; IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3382, 2987, 2932, 1704, 1624, 1522, 1468, 1357, 1283, 1142, 1081, 1031, 960, 869, 816, 766, 622; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6) δ : 2.39-2.79 (m, H-4), 3.86 (ddd, H-3), 4.42 (d, H-2), 5.75 (d, H-6), 5.89 (d, H-8), 6.66 (dd, H-2', H-3'), 6.76 (d, H-6'), 7.69 (s, H-2'''), 7.75 (s, H-3'''), 7.85 (s, H-5'''), 8.03 (s, H-6'''). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6) δ : 28.85 (C-4), 68.38 (C-3), 82.74 (C-2), 95.49 (C-8), 96.17 (C-6), 100.69 (C-4a), 115.22 (C-2'), 145.66 (C-5') 115.75 (C-6').., 132.55 (C-1'), 115.28 (C-3'), 145.73 (C-4'), 156.95 (C-5), 155.71 (C-7), 157.23 (C-8a), 126.79 (C-1'''), 157.76 (C-7'''), 120.03 (C-2'''), 120.28 (C-3'''), 140.10 (C-4'''), 120.52 (C-5'''), 120.10 (C-6'''); EIMS 70 eV, m/z 410 (M^+ , rel. int. 100); Anal. Calcd. (%) for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_8$: C 64.39, H 4.42; found (%): C 64.28, H 4.35.

RESULTS AND DISCUSSION

In view of identifying these three compounds, a comparative study of their spectral data with those of (+)-catechin-(4 α - \rightarrow 2) phloroglucinol (4)¹⁶, (+)-epiafzelechin (5)^{15,17} and (-)-epicatechin-3-O-galloyl-(4 β - \rightarrow 2) phloroglucinol (6)¹⁷ was achieved (Tables 3 and 4).

TABLE-3
¹H RMN DATA OF COMPOUNDS 1, 2, 3, (+)-CATECHIN-(4*α*→2) PHILORGLUCINOL (4)¹⁶, (+)-EPICATECHIN (5)¹⁷ AND
 (-)-EPICATECHIN-3-O-GALLOYL-(4*β*→2) PHILORGLUCINOL (6)¹⁷, CHEMICAL SHIFTS δ IN ppm AND COUPLING CONSTANT IN Hz

H	1	2	3	4	5	6	
2	4.58 (d 7.5)	4.42 (d 7.6)	4.42 (d 8.0)	4.38 (d 9.2)	4.85 (d 1.1)	5.45 (br)	C Ring
3	3.98 (ddd 9.8, 7.6, 2.3)	3.86 (ddd 8.0, 5.6, 2.5)	3.86 (ddd 8.0, 5.6, 2.4)	4.48 (dd 9.27, 7.8)	4.17 (ddd 4.3, 3.5, 1.1)	5.24 (m)	
4	2.52 (dd 8.1, 16)	2.40 (dd 8.8, 16)	2.39 (dd 8.4, 16.4)	4.43 (d 7.8)	3.53 (dd 4.3, 16)	4.62 (d 1.5)	
	2.85 (dd 5.4, 16)	2.78 (dd 5.6, 16)	2.79 (dd 5.6, 16.4)		3.64 (dd 3.5, 16)		A Ring
4 ^a							
5	5.87 (d 2.25) ^a	5.74 (d 2.4) ^a	5.75 (d 2.0) ^a	5.89 (d 2.3) ^a	5.98 (d 2.3) ^a	6.02 (d 2.3) ^a	
6							
7							
8	5.94 (d 2.27) ^a	5.89 (d 2.0) ^a	5.89 (d 2.4) ^a	5.91 (d 2.3) ^a	5.94 (d 2.3) ^a	6.10 (d 2.3) ^a	
8 ^a							
1'							B Ring
2'	6.75 (d 1.76)	6.76 (d 8.0)	6.63 (d 2.0)	7.00 (d 1.8)	7.28 (d 8.4)	6.95 (d 1.8)	
3'	6.72 (d 8.08)	6.71 (d 8.0)	6.66 (d 8.4)	6.79 (d 8.1)	6.75 (d 8.4)	6.73 (d 8.2)	
4'							
5'		6.66 (d 8.4)			6.78 (d 8.4)		
6'	6.85 (dd 8.1, 1.77)	6.62 (d 8.4)	6.76 (dd 8.4, 2.0)	6.85 (dd 8.1, 1.8)	7.28 (d 8.4)	6.79 (dd 8.2, 1.8)	D Ring
1''							
2''				5.96 (brs)		7.97 (brs)	
3''							
4''				6.00 (brs)		7.97 (brs)	
5''							
6''							
1'''							
2'''		7.69 (s)				7.05 (s)	
3'''		7.75 (s)					
4'''							
5'''		7.85 (s)				7.05 (s)	
6'''		8.03 (s)					

^aAssignments with the same footnote are interchangeable.

TABLE-4
¹³C RMN DATA OF COMPOUNDS 1, 2, 3, (+)-CATECHIN-(4 α - \rightarrow 2)
 PHLOROGLUCINOL (4)¹⁶, (+)-EPIAFZELECHIN (5)^{15,17} AND
 (-)-EPICATECHIN-3-O-GALLOYL-(4 β - \rightarrow 2) PHLOROGLUCINOL (6)¹⁷;
 CHEMICAL SHIFTS δ IN ppm

C	1	2	3	4	5	6	
2	82.84	82.75	82.74	84.70	80.00	76.20	C Ring
3	68.80	68.38	68.38	74.30	66.80	75.80	
4	28.50	30.45	28.85	39.00	29.80	35.00	
4a	100.82	100.69	100.69	106.40	100.10	101.60	A Ring
5	157.55	157.23	156.95	158.90	158.80	159.10	
6	96.30	95.49	96.17	98.10	96.70	97.30	
7	157.82	157.76	155.71	158.50	158.70	158.40	
8	95.51	96.17	95.49	97.10	95.80	96.50	
8a	156.90	156.95	157.23	158.10	157.60	158.10	
1'	132.22	132.25	132.55	133.00	131.30	132.10	B Ring
2'	115.25	120.4	115.22	116.60	129.50	115.50	
3'	116.07	115.28	115.28	116.30	115.80	116.50	
4'	146.23	145.66	145.73	146.20	158.50	146.30	
5'	146.20	115.75	145.66	146.50	115.80	146.20	
6'	120.02	120.10	115.75	121.50	129.50	119.90	
1''				108.00		106.70	D Ring
2''				158.60		158.90	
3''				97.90		97.60	
4''				159.20		159.20	
5''				96.80		97.60	
6''				158.60		158.90	
1'''			126.79			122.10	
2'''			120.03			110.90	
3'''			120.28			146.70	
4'''			140.10			139.90	
5'''			120.52			146.70	
6'''			120.10			110.90	
7'''			157.76			168.00	

The comparison of the spectral data and especially those of ¹H and ¹³C of the compounds 1, 2 and 3 with those cited in literature¹⁴⁻¹⁷ allowed us to conclude the following:

Compound 1 is (+)-catechin with the *trans* stereochemistry at the 2-3 position; this configuration was deduced from the ¹H spectrum which related two great coupling constants (J_1 9.8 and J_2 7.6 Hz) (Fig. 2). As far as compound 2, the ¹³C NMR spectrum indicated the presence of 12 *sp*² carbons (six quaternary and six tertiary carbons). The signal deshielding of 3 out of 6 quaternary carbons showed well that these latest are all bonded

to a hetero atom. Moreover, proton NMR indicated the presence of a broad around 6.76 ppm. Taken together, the structure of **2** was determined to be the (+)-afzelechin. Its stereochemistry was also determined as being *trans* through coupling constants (J_1 8.0 and J_2 5.6 Hz) (Fig. 2).

Finally, compound **3** structure was determined on the basis of the following: first, ^{13}C NMR showed a total of 19 sp^2 carbons, ten of which are quaternary, the nine others being tertiary carbons. Secondly, signal deshielding of six out of the ten quaternary carbons showed that these ones are bonded to a heteroatom. Contrary to **1** and **2**, ^1H NMR of **3** indicated the presence of four protons in the form of one singlet. Finally, a multiplet at 6.66 ppm suggested three aromatic protons. Taken together, all these information suggested the structure of **3** as being 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxychroman-3-yl-4-hydroxybenzoate, a compound previously unknown (Fig. 2). However, its stereochemistry remains to be fully proven through further studies.

Conclusion

The work presented herein made it possible to conclude that the products resulting from the water/methanol/acetone extraction contain (+)-catechin, (+)-afzelechin and (+)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy chroman-3-yl-4-hydroxybenzoate a compound never quoted in the literature up to now and identified for the first time in the stems of the *Arbutus unedo* L.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Prof. N. Benabadji of the Botanical Laboratory, Biology Department, Aboubekr Belkaïd University for the identification of the vegetable matter. Thanks are also due to Dr. C. Ziani-Cherif and Dr. S. Bedrane for their assistance in preparation of this article.

REFERENCES

1. P.F. Stevens, *Arbutus* L. In Flora of Turkey and the East Aegean Islands; Edinburgh University Press: Edinburgh, p. 99 (1978).
2. J. Seidemann, Zur Kenntnis von wenig bekannten exotischen Früchten. 5. (Mitt.): Baumerdbeere (*Arbutus unedo* L.). Dtsch. Lebensmitt. Rundsch., 91, p.110 (1995).
3. T. Baytop, Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. In Gecmiste VeGünümüzde; Istanbul Univ.: Yayinlari, Istanbul, p. 99 (1984).
4. T. Baytop, Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present), Istanbul University: Istanbul, edn. 1, p. 305 (1984).
5. E.C. Bate-Smith, *Food*, 23, 124 (1954).
6. E. Haslam, Practical Polyphenolic, Cambridge University Press, Cambridge (1998).
7. G.A. Karikas, M.R. Fuerby and R.D. Waigh, *Plant. Med.*, 2, 223 (1987).
8. E. Davini, P. Esposito and C. Iavarone, *Phytochemistry*, 20, 98 (1983).
9. T.A. Geissman, W.F. Knaack and J.O. Knight, *Tetrahedron Lett.*, 7, 1245 (1966).
10. A. Drolic and J. Raymoni, *Plant. Med. Phytotherap.*, 15, 109 (1981).
11. J. Balausard, *Biochemistry*, 29, 28 (1985).

12. F.A. Ayaz, M. Kucukislamoglu and M. Reunanen, *J. Food Compos. Anal.*, **13**, 171 (2000).
13. S.D. Verma, A. Mizuno and T.H. Kino Shita, *Science*, Vol. 75 (1976).
14. L.Y. Foo, R. Newman, G. Waghorn, W.C. McNabb and M.J. Ulyatt, *Phytochemistry*, **41**, 617 (1996).
15. M.J. Pascual-Villalobos and B. Rodriguez, *Biochem. System. Ecol.*, **35**, 11 (2007).
16. N. Köhler and P. Winterhalter, *J. Chromatogr. A*, **1072**, 217 (2005).
17. S.B. Wan and T.H. Chan, *Tetrahedron*, **60**, 8207 (2004).

(Received: 22 October 2007;

Accepted: 8 February 2008)

AJC-6331

Phytotherapy of Diabetes in West Algeria

H. ALLALI*, H. BENMEHDI, M.A. DIB, B. TABTI, S. GHALEM and N. BENABADJI†

Laboratory of Organic Chemistry, Natural Products and Analysis (COSNA)
Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Aboubekr Belkaid
BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

Fax: (213)43286530; E-mail: h_allali72@yahoo.fr

Medicinal plants have been used since remote times in folk medicine and they are now a part of the people inheritance. Through North African countries, today's folk medicine has been boosted as a consequence of hard economic conditions. Because of its geographical situation, climate and soil composition, Tlemcen's region offers a wide variety of plants and flowers. The frequent usage of medicinal plants in the Tlemcen's region by diabetics prompted us in development of these plants. This induced us to set up traditional hypoglycaemic plants sample survey with a view to setting forth the benefit they could bring about for patients affected by diabetes. The results gathered from 634 inquiry forms (435 women and 199 men) were separated into two groups: diabetics using medicinal plants (62 %) and using industrial hypoglycaemic medicines (38 %). Those results showed that phytotherapy was widely adopted by west Algerian society. The survey undertaken allowed us to observe that more than 58 plants were used in traditional care of diabetes of which the most used were *Trigonella foenum graecum* L. (Leguminosae), *Citrullus colocynthis* L. Schrad. (Cucurbitaceae), *Saccocalyx satureioides* Coss. and Dur. (Labiatae), *Berberis vulgaris* L. (Berberidaceae) and *Aloe vera* Trabut (Liliaceae). Moreover, present findings showed that non-insulin dependent patients used more medicinal plants than insulin-dependent patients.

Key Words: Phytotherapy, Diabetes, Medicinal plants, Ethnopharmacology, Tlemcen.

INTRODUCTION

Among all endocrinal diseases, diabetes is the most commonly encountered and many people are hit whichever their social background. The main characteristic of the disease is a chronic syndrome related to a failure in carbohydrates metabolism that brings about a high level glycaemia.

†Laboratory of Botany, Department of Biology, University of Aboubekr Belkaid, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria.

According to a 1998 WHO's report, 140 million people were hit by this disease all over the world and this figure would reach a peak of 300 million people by 2025. In Algeria, a 1997 national survey indicated a 7.1 % of people hit by the disease¹. In 2002, at touareges of the South Algerian, the prevalence is 0.7 %².

Occurrence of insulin-dependent diabetes was usually situated between 5 and 40 years (one case out of two before the age of 20 years).

Non insulin-dependent diabetes represents 80 to 85 % of all known diabetes and was found mainly in people over 40 years. In Tlemcen region, we have observed an important increase of the number of diabetics in recent years. Some endogenous and environmental factors such as obesity might increase the incidence of non insulin-dependent diabetes. The latter was most frequently encountered when some conditions such as a settled way of life, stress, inadequate diet, ageing and change in the habits (food untake, sedentarity) especially for the women were joined. These results clearly showed that Tlemcen society was well accustomed with phytotherapy^{3,4}. Another investigation was carried out at the hospital during 14 years (1986-1999). The results showed that there were more than 15000 diabetics in Tlemcen area.

Tlemcen region is located at the North-West of Algeria next to Mediterranean Sea. It is bordered to the West by Morocco, to the East by the Department of Ain Temouchent and to the South by the department of Naama. The average altitude is 800 m and the region is situated at latitude 34°52' North and at longitude 1°21' West. The present investigations were carried out all over Tlemcen Mounts where the weather is hot and dry during 6 months, whereas it is rainy (570 mm) and cold the remaining time of the year.

Tlemcen soil is fertile so that people settled there from remote times setting up some important manufactures in the recent years. The census of 1998 indicated a figure of 325864 people that made about 140 people by square km whereas the 2000 census showed a moderated increase of population (338 971 people).

Because of its geographical position Tlemcen's region is characterized by a climatic diversity which is favourable to the growth and development of medicinal plants⁵.

The aim of the present work is to identify species of plants that are commonly used by the population to treat the diabetes mellitus.

EXPERIMENTAL

The survey was undertaken in different areas of Tlemcen and carried out by means of a questionnaire based on such data as sex, age, pathology of persons interviewed and the frequency medicinal consultations and type of diabetes and kind of treatment. It also contained data on name and used

part plants, dose, mode of preparation and administration, duration of treatment, treatment number, patients' health condition and glycaemia level after treatment as well as any secondary effects which might have been observed after treatment with medicinal plants.

The survey and data collection was undertaken in collaboration with the Hospital's Internal Medicine Department and the Tlemcen Diabetic Association. The present survey was completed with interviews made with as many people affected by the disease as possible.

We did a sampling of the whole plants deducted and represented on floristic lists. By definition, the sampling is the whole of operations which have for object to take from population samples⁶. Vegetal formations of the studied region (West Algeria) are enough diversified. One can meet: (1) raised formation: it is ligneous species formed by vegetals of 2 meters of height. One can allege to title of example: *Quercus ilex*, *Quercus suber*. (2) sylvical formation: it concerns ligneous species of less than 2 meters height, let us allege to title of example: *Cistus ladaniferus* (Ciste), *Calycotome spinosa* (Calycotome). (3) herbaceous formation: it regroups the whole vegetals of which the aerial part is not ligneous, for example: *Plantago lagopus* (Plantin), *Papaver rhoeas* (Poppy).

Knowing those different formations, we have been brought to prospect places in order to mark those different vegetal species. The prelevments has been realized during spring and summer periods, *i.e.*, the time when the plants in question are to their optimum development with presence of inflorescences (flowers).

After having done prelevments on the field, we have proceeded to their identification from botanic flora⁷⁻¹². Sampling was carried out on the original area of growth and according to usual procedures, especially the Braun-Blanquet's method¹³. Braun-Blanquet method is a method that consists in taking the plant species *in situ*. On every floristic card, are mentioned the general characters of the place (altitude, slope, exhibition, nature of the substratum, middle height of vegetation and the surface). Every species is affected of two indications (abundance-dominance, sociability).

Species harvested on the land have been dried then identified from the botanical flora. Characteristics of different species under survey were determined on spring since it is the period as many taxonomic features as possible can be encountered¹¹. Plants were collected by students and the investigators in biology over the year. These species were kept in nylon bags. The harvest was carried out all over the different Tlemcen mounts and in the South West Algerian Region.

Taxonomic identification of plants was performed in collaboration with the Botany Laboratory of the Department of Biology at Aboubekr Belkaid-Tlemcen University. Glycaemia level was measured in Tlemcen's Hospital in presence of medical qualified staves.

RESULTS AND DISCUSSION

The survey identified 634 diabetics (435 women and 199 men) of which 394 used just the plants and 240 used oral hypoglycaemic medicines with no plants. On the average, 62 % of patients regularly use medicinal plants.

The patients were categorized into sex and age. In present sampling, Table- 1 shows that women (68.6 %) were more exposed to diabetes than men (31.4 %). This might be related to some factors like: sedentarity, stress, obesity *etc.* Besides that, it has been observed in present survey that women (70 %) used more plants than men (30 %). It is probably related to their rich knowledge and deep faith in traditional medicine (Table-2). All the data gathered showed that for both sexes, the non-insulin dependent diabetics (NIDD) patients (66.2 %) used more plants than insulin dependent diabetics (IDD) patients (33.8 %). However IDD patients mainly used insulin and when necessary, they treated themselves with plants or their extracts^{14,15}. In all categories, the proportions of the plant users remain high and appear to be independent of sex and age of the patients (Table-1). These results clearly show that phytotherapy is widely adopted by west Algerian society.

TABLE-1
DISTRIBUTION OF PATIENTS ACCORDING TO SEX, AGE AND
PROPORTION OF PLANT USERS IN EACH CATEGORY

	Sex		Age	
	Women	Men	Young	Adults
Per cent	68.6	31.4	3.0	97.0
% of plant users	63.4	59.3	47.4	62.6

TABLE-2
IDD AND NIDD DIABETES USING PLANTS

Sex	Diabete		% of plant users
	NIDD	IDD	
Women	48.7	21.3	70
Men	17.5	12.5	30
Total	66.2	33.8	-

Inventory of medicinal plants: During the ethnopharmacological survey, we made an inventory of 58 plants that were of common use in the folk therapy of diabetes. The indexed plants were harvested and collected on the basis of their vernacular name. Table-3 provides the following data: local name (Arabic), botanical name, botanical family and the parts of the plant used, dose, preparation procedure and administration, treatment duration, number of treatment and glycaemia results.

TABLE-3
MEDICINAL PLANTS USED FOR TREATMENT OF DIABETES MELLITUS IN TLEMCCEN REGION

Scientific name	Vernacular name	Ecological distribution		Part used and dose	Number of use	Mode of administration	AA	Duration of treatment	Glycemia results (g/L)
		North	South						
<i>Trigonella foenum graecum</i> L. (Leguminosae)	Holba	C(++)	C(+)	One cup of leaves or seeds in decoction	Once to twice a day	Oral	4.00	25 min to 1 h	0.90
<i>Citrullus colocynthis</i> L. (Cucurbitaceae)	Pastèque	S(+)	S(+++)	One fresh fruits parts	Once to three times a month	Under feet in bath	3.00	10 to 15 min	1.20
<i>Saccocalyx saturoioides</i> Coss. et Dur. (Labiatae)	Zaater	S(+)	S(++)	One cup of leaves decoction	Once a day	Oral	2.00	0.5 to 1 h	1.20
<i>Berberis vulgaris</i> L. (Berberidaceae)	Epinevinette	S(++)	S(+)	One spoon of bark in decoction	Twice a day	Oral	3.00	1 to 2 h	1.87
<i>Aloe vera</i> Trabut (Liliaceae)	Sbeur	S(+)	S(+)	One cup of leaves infusion extract or seed	Once a day	Oral	3.00	0.5 to 2 h	1.50
<i>Nerium oleander</i> L. (Apocynaceae)	Defla	C(+++)	S(+)	Vegetal bath	Once a week	Vegetal bath	4.50	1 h	1.20
<i>Annoïdes verticillata</i> (Desf.) Briq. (Ombeliferaceae)	Annoïdes	S(+)		One spoon of leaves powder and honey	Once a day	Oral	2.00	4h	0.80
<i>Globularia atypum</i> L. (Globulariaceae)	Chebra	S(+++)	S(+)	A big cup of leaves decoction and small amount of sugar	Once a day	Oral	3.50	1h	1.70
<i>Juniperus phoenicea</i> L. (Cupressaceae)	Genevrier rouge	S(++)	S(+)	One cup of leaves decoction extract	Once to four times a month	Oral	3.50	1 h 30	1.10
<i>Ajuga reptans</i> L. Schreb (Labiatae)	Ivette	S(+++)	S(+)	One spoon of leaves powder	Once a day	Oral	2.50	25 min to 1 h	1.15
<i>Artemisia herba-alba</i> Asso. (Compositae)	Armoise blanche	S(++)	S(+++)	One cup of leaves infusion	Once to twice a day	Oral	3.00	1 to 3 h	1.87
<i>Inula viscosa</i> L. Ait. (Compositae)	Inule	S(+++)	S(+)	One cup of leaves infusion	Once a week	Oral	3.80	4 h	2.00
<i>Marrubium vulgare</i> L. (Labiatae)	Marrube	S(+++)	S(+)	One cup of leaves infusion or vegetal bath	Twice a day	Oral	3.00	0.5 to 1 h	1.20

	Pouliot	S(+++)	One cup of leaves infusion	Once a day	Oral	1.60	2h to 4h	0.80
<i>Mentha pulegium</i> L. (Labiace)	Pouliot	S(+++)	One cup of leaves infusion	Once a day	Oral	1.60	2h to 4h	0.80
<i>Armi visnaga</i> Lamk (Apiaceae)	Curedent du Prophète	C(+)	One cup of stems decoction extract	Once to three times a week	Oral	2.28	5 h	1.74
<i>Olea europaea</i> L. (Oleaceae)	Olivier	C(+++)	Big cup of leaves decoction	Once to three times a day	Oral	2.00	2 to 5 h	1.20
<i>Myrtus communis</i> L. (Myrtaceae)	Myrte	S(+++)	One spoon of seeds powder	Three times a day	Oral	1.60	10 min to 1 h	1.50
<i>Ziziphus lotus</i> L. Desf. (Rhamnaceae)	Jubier sauvage	S(+++)	One cup of roots decoction.	Once to twice a week	Oral	1.50	1 to 6 h	0.80
<i>Prunus amygdalus</i> Stokes var. amara CD. (Rosaceae)	Amandier	C(+++)	Half spoon of fruit powder with milk	Seven times a week	Oral	2.50	1 to 2 h	1.20
<i>Ruta chalepensis</i> L. (Rutaceae)	Rue	S(+)	One cup of leaves infusion	Once week	Oral	1.80	3 to 5 h	1.10
<i>Peganum harmala</i> L. (Zygophyllaceae)	Harmel	S(+)	One spoon of fruit powder	Once to twice a day	Oral	2.10	1 to 2 h	1.52
<i>Zygophyllum album</i> L. (Zygophyllaceae)	Bougribba	S(+++)	One cup of leaves infusion or one spoon of leaves powder	Once a day	Oral	3.00	4 h	1.80
<i>Papaver rhoeas</i> L. (Papaveraceae)	Coquelicot	S(+++)	One cup of stems decoction extract	Three times a day	Oral	2.70	4 h	1.00
<i>Mentha rotundifolia</i> L. (Labiatae)	Timija	S(+++)	One cup maceration of aerial parts	Once to three times a week	Oral	3.15	2 h	1.40
<i>Lawsonia alba</i> Trabut (Lythraceae)	Henné	C(+)	Leaves	Once day	Massage	3.00	9 h	1.20
<i>Lavandula staechas</i> L. (Labiatae)	Helhal	S(+++)	One cup of leaves infusion.	Once day	Oral	3.00	10 min to 1 h	1.20
<i>Ferula foetida</i> Asso. (Ombelliferae)	Férule	S(+++)	One cup of aerial parts decoction	Once week	Oral	3.00	12 h	1.60
<i>Arbutus unedo</i> L. (Ericaceae)	Arbousier	S(+++)	One cup roots infusion extract	Once to three times a week	Oral	3.35	4 to 7 h	1.68
<i>Rhamnus alaternus</i> L. (Rhamnaceae)	Alateme	S(++)	One cup of leaves infusion extract	In case of need	Oral	1.60	0.5 to 1 h	1.40

<i>Juglans regia</i> L. (Juglandaceae)	Noyer	C(+++)	One cup of leaves decoction extract	Once to three times a week	Oral	2.20	3 to 6 h	1.40
<i>Laurus nobilis</i> L. (Lauraceae)	Laurier	S(+)	One cup of leaves infusion extract	In case of need	Oral	2.00	Indetermi nate	1.50
<i>Punica granatum</i> L. (Punicaceae)	Grenadier	C(+++)	Barks decoction extract	In case of need	Oral	4.50	Indetermi nate	1.50
<i>Nigella sativa arvensis</i> L. (Ranunculaceae)	Nigelle	C(+++)	One spoon of seeds powder	Once a day	Oral	2.30	2 h	1.20
<i>Anacyclus pyrethrum</i> L. Coss. (Compositae)	Pyrethre	C(+)	One cup of leaves infusion	Once a day	Oral	2.85	1 h	2.18
<i>Arthrophyllum scoparium</i> (pome) Ijlin (Chenopodiaceae)	Remt	S(+)	Stems infusion	In case of need	Oral	1.85	Indetermi nate	1.20
<i>Stipa tenacissima</i> L. (Gramineae)	Alfa	S(+)	One cup of roots decoction extract	Once to twice a week	Oral	3.00	25 min to 1 h	1.30
<i>Juniperus oxycedrus</i> L. (Cupressaceae)	Oxycedre	S(++)	One cup of leaves decoction extract	Once to three times a week	Oral	2.00	4 to 7 h	1.50
<i>Pinus halepensis</i> Mill. (Pinaceae)	Pin d'Alep	S(+++)	One cup leaves infusion	In case of need	Oral	2.00	Indetermi nate	1.80
<i>Pistacia lentiscus</i> L. (Anacardiaceae)	Lentisque	S(+++)	Leaves decoction extract	Once a day	Oral	2.00	1 h	1.30
<i>Bryonia dioica</i> Jacq. (Cucurbitaceae)	Bryone	C(++)	One spoon of aerial parts powder	In case of need	Oral	2.45	2 h	1.64
<i>Anvillea radiata</i> Coss. et Dur. (Compositae)	Horf	S(++)	Fruit	Twice a day	Oral	3.50	2 to 4 h	1.80
<i>Capsicum frutescens</i> Medik (Solanaceae)	Piment de cayenne	C(+)	Hot pepper's seeds	In case of need	Oral	2.80	Indetermi nate	1.65
<i>Artemisia arborescens</i> L. (Compositae)	Chiba	S(+++)	One spoon of seeds powder	In case of need	Oral	2.36	1 to 3 h	1.40
<i>Satureja calamintha</i> Scheele (Rubiaceae)	Calament	S(++)	One cup of roots decoction extract	In case of need	Oral	2.00	Indetermi nate	1.10
<i>Rubus ulmifolius</i> Schott (Rubiaceae)	Ronce	S(+++)	One cup of leaves infusion extract	Twice a day	Oral	1.50	1 to 4 h	0.75

<i>Chamaerops humilis</i> L. (Palmaeaceae)	Palmer nain	S(+++)	One cup of roots decoction extract	In case of need	Oral	3.00	1 day	1.90		
<i>Calycotome spinosa</i> L. (Papilionaceae)	Gendoul	S(+++) S(+)	One spoon of roots decoction extract	In case of need	Oral	2.90	6 h	1.50		
<i>Musa paradisiaca</i> Trabut (Musaceae)	Mouza	S(+)	One spoon of leaves decoction extract	In case of need	Oral	1.88	4 h	1.10		
<i>Eucalyptus globulus</i> L. (Myrtaceae)	Eucalyptus	S(+++) S(+)	One spoon of leaves infusion extract	In case of need	Oral	5.00	8 h	1.50		
<i>Ficus carica</i> L. (Moraceae)	Figuier	C(+++) C(+)	One cup of leaves infusion extract	Three times a week	Oral	4.00	1 h	1.60		
<i>Allium cepa</i> Cupani Raf. (Liliaceae)	Ail	C(+++) C(++)	One spoon of leaves decoction extract	In case of need	Oral	1.80	6 h	0.57		
<i>Cynara scolymus cardunculus</i> L. (Compositae)	Cardon sauvage	C(+++) C(+)	One cup of leaves infusion extract	Once a day	Oral	1.95	0.5 h	1.55		
<i>Zea mays Assengas</i> Trabut (Gramineae)	Maïs	C(+++) C(+)	One cup leaves infusion extract	In case of need	Oral	2.30	7 h	0.50		
<i>Urtica urens</i> L. (Urticaceae)	Ortie	S(+++) S(+)	One spoon of leaves and stems decoction extract	In case of need	Oral	1.80	4 h	1.20		
<i>Cortandrum sativum</i> L. (Umbelliferae)	Gousbir	C(+++) C(+)	One cup of aerial parts maceration	In case of need	Oral	1.75	2 h	1.36		
<i>Quercus ilex</i> L. (Fagaceae)	Chêne vert	S(+++) S(+)	Roots decoction extract	In case of need	Oral	1.90	Indetermi nate	1.10		
<i>Appelodesma mauritanicum</i> (Poiret) Dur. et Sch. (Gramineae)	Diss	S(+++)	Roots decoction extract	In case of need	Oral	2.60	Indetermi nate	1.15		
<i>Opuntia ficus-indica</i> Trabut (Cactaceae)	Figuier de barbarie	C(+++) C(+)	Flowers decoction extract	In case of need	Oral	2.50	Indetermi nate	1.40		

S, spontaneous; C, cultivated; +, very abundant; ++, moderate; +, scarce.

Notice: - In Table-3, the authors have mentioned the average values of glycaemia results.

- Decoction, maceration and infusion of different parts plant were made up in water.

AA = Blood glucose level before treatment with plants (g/L)

Among the 58 plants reported the most used in Tlemcen's region as antidiabetic were: *Trigonella foenum graecum* (Leguminosae), *Citrullus colocynthis* (Cucurbitaceae), *Saccocalyx satureioides* (Labiatae), *Berberis vulgaris* (Berberidaceae), *Aloe vera* (Liliaceae) and *Globularia alypum* (Globulariaceae).

As regards in present interviews conclusions, we can set forth that patients generally use more than one plant to cope with their illness. Methods usually in practice to prepare folk medicine include maceration, infusion, decoction and powdering of leaves, roots and stems. As results obtained, the treatment is made through oral administration, massage or by means of baths with water which contains the part of the plant of interest. These data are correlated by bibliographical source^{16,17}.

According to the data collected in present investigation, we observed that the frequency of use of plants by patients was either once to three times a day, once to seven times a week or once to four times a month. They checked their glycaemia within 10 min to 12 h after treatment. Besides, there were patients who used plants and hypoglycaemic tablets on the same time. On the other hand, patients who used insulin also treated themselves with plants in case of need. We have also observed that patients took into account instructions about plants uses that were provided by the herbalists, older women *etc.* Sometimes the patients use more than one plant to treat their pathology. So we observed for example that some patients use for example mixtures of three to four plants (*Citrullus colocynthis*, *Trigonella foenum graecum*, *Saccocalyx satureioides*, *Berberis vulgaris*) or mixture of two plants such as (*Trigonella foenum graecum*, *Saccocalyx satureioides*) in the same time.

Conclusion

The present survey has revealed the importance of folk medicine as a useful tool for the development of new strategies of both care and scientific policies in developing countries. The widespread use of plants in the treatment of various diseases set forth that plants could serve as cheap sources for new hypoglycaemic drugs. Our preliminary results are encouraging and induce us to explore in more details the scientific fundamentals of some folk medicines especially in the field of diabetes whose incidence dramatically grew over the recent years.

The present investigation has revealed the importance given by the diabetics to traditional plants medicine. Therefore we have been able to set up a bank data concerning the names of plants (local and botanical names), dosage and preparation method (maceration, decoction, infusion, powder, vegetable bath *etc.*) as well as glycaemia results before and after treatment.

The hypoglycaemic effect of the following species has also been established: *Trigonella foenum graecum*, *Artemisia herba-alba* Asso., *Ammi visgana*, *Allium sativum*, *Myrtus communis*¹⁸. Nevertheless and despite their

widespread use the mechanism of action of these plants still remains unclear. As far as literature is concerned, we have found few studies concerning the hypoglycaemic activity of *Citrullus colocynthis*. In some cases, we noted that a mixture of plant was used for the treatment of the NIDD diabetes.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank Pr. M. Bouazza, Botany Laboratory, Department of Biology, Aboubekr Belkaïd-Tlemcen University for identification of plant materials.

REFERENCES

1. A. Daoud, M. Belhadj, S. Khalfa and R. Malek, Le diabète en Algérie, Présentation au deuxième congrès maghrébin d'Endocrinologie Diabétologie Nutrition. Fès, 24-27 Novembre, pp. 34-40 (2005).
2. M. Belhadj, M. Oudidhoum, N. Midoune, A. Cherrak, S. Aribi and M. Bachaoui, The Prevalence of type 2 diabetes mellitus in Touaregs of South Algeria, (Abstract 1370). *Diabetes Metab.*, 29 (Suppl 4) : 4S24 (2003).
3. L.C. Di Stasi, C.A. Hiruma, E.M. Guimarães and C.M. Santos, *Fitoterapia*, 65, 529 (1984).
4. L.C. Di Stasi, G.P. Oliveira, M.A. Carvalhaes, M. Queiroz-Junior, O.S. Tien, S.H. Kakinami and M.S. Reis, *Fitoterapia*, 73, 69 (2002).
5. M. Blumental, The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicine, Integrative Medicine Communications, Boston (1998).
6. P. Dagnelie, Théorie et méthodes statistiques: Vol. 2. Presses Agron. Gembloux, Duculot, Gembloux, p. 451 (1970).
7. L. Trabut, Flore du Nord de l'Afrique, Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique, Collection du centenaire de l'Algérie : Imprimerie Carbonel, Alger, p. 1-355 (1934).
8. R. Maire, Flore de l'Afrique du Nord, 15 vols. Edition Le chevalier, Paris, (1952-1980).
9. P. Ozenda, Flore du Sahara Septentrional et Central : Editions C.N.R.S., Paris, p. 1-485 (1958).
10. P. Ozenda, Flore du Sahara : Editions C.N.R.S., Paris, p. 1-622 (1977).
11. P. Quezel and S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions méridionales : Tome I et II. Editions C.N.R.S., Paris, p. 1-1170 (1962).
12. G. Bonnier, La grande flore en couleurs : Tomes I, II, III, IV & Index (729 planches, 1401 pages texte, 191 pages index), Edition Belin, Paris (1990).
13. J. Braun-Blanquet. Pflanzensoziologie Grundzuge der vegetations Kunde: 2eme Ed. Springer, Vienne, Autriche, p. 631-632 (1951).
14. A. Ziyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, A. Dassouli, M. Serhrouchni and W. Benjelloun, *J. Ethnopharmacol.*, 58, 45 (1997).
15. H.K. Sharma, L. Chhangte and A.K. Dolui, *Fitoterapia*, 72, 146 (2001).
16. E. Tuzlaci and M.K. Erol, *Fitoterapia*, 70, 593 (1999).
17. M.T. Palmese, E.U.M. Rita and E.T. Paolo, *Fitoterapia*, 72, 619 (2001).
18. L.A. Al-Shamaony, S.M. Al-Khazraji and H.A.A. Twajj, *J. Ethnopharmacol.*, 40, 163 (1993).