R*EPUBLIQUE* **A***LGERIENNE* **D***EMOCRATIQUE* ET **P***OPULAIRE*
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université **D**jillali **L**iabés de **S**idi **B**el-**A**bbés
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de l'Environnement
Laboratoire "**E***co*-**d***éveloppement des* **E***spaces*"

Thèse

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat 3ème Cycle

Domaine **: SNV**
Spécialité**: S***ciences* de l'**E***nvironnement*
Gestion, **V**alorisation des **R**essources **N**aturelles et **D**éveloppement **D**urable

Présentée par **:**

Khadidja **BOUZID**

THÈME

Contribution à l'étude des options de valorisation de l'espèce *Arbutus unedo* L. dans l'Ouest Algérien.

Soutenu le **:**

Devant le jury composé de **:**

Président : BENYAHIA Mohamed	Professeur, UDL de Sidi Bel Abbés
Directrice de thèse : Dr TOUMI BENALI Fouzia	MC-A, UDL de Sidi Bel Abbés
Examinateur : HAMEL Laid	Professeur, UDL de Sidi Bel Abbés
Examinateur : MEHDADI Zoheir	Professeur, UDL de Sidi Bel Abbés
Examinateur : Dr CHADLI Rabah	MC-A, Université de Mostaganem

Année **u**niversitaire **: 2014-2015**

R*EPUBLIQUE* **A***LGERIENNE* **D***EMOCRATIQUE* ET **P***OPULAIRE*
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université **D**jillali **L**iabés de **S**idi **B**el-**A**bbés
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de l'Environnement
Laboratoire "**E***co*-**d***éveloppement des* **E***spaces*"

Thèse

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat 3ème Cycle

Domaine **: SNV**
Spécialité**: S***ciences* de l'**E***nvironnement*
Gestion, **V**alorisation des **R**essources **N**aturelles et **D**éveloppement **D**urable

Présentée par **:**

Khadidja **BOUZID**

THÈME

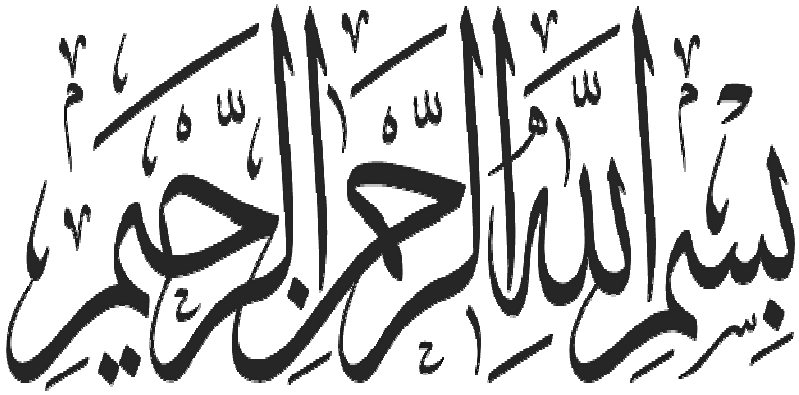
Contribution à l'étude des options de valorisation de l'espèce *Arbutus unedo* L. dans l'Ouest Algérien.

Soutenu le **:**

Devant le jury composé de **:**

Président : BENYAHIA Mohamed	Professeur, UDL de Sidi Bel Abbés
Directrice de thèse : Dr TOUMI BENALI Fouzia	MC-A, UDL de Sidi Bel Abbés
Examinateur : HAMEL Laid	Professeur, UDL de Sidi Bel Abbés
Examinateur : MEHDADI Zoheir	Professeur, UDL de Sidi Bel Abbés
Examinateur : Dr CHADLI Rabah	MC-A, Université de Mostaganem

Année **u**niversitaire **: 2014-2015**


بسم الله الرحمن الرحيم

Remerciements

Est-il possible de mener une thèse à bout sans aide ni soutien ? Il est donc essentiel et légitime pour remercier officiellement, comme il se doit, toutes les personnes impliquées dans cet ouvrage, sans qui, vous ne liriez pas ces mots.

En premier lieu, je commencerai par remercier tous ceux qui m'ont aidé sur le terrain tant cette partie a été importante durant cette thèse.

Bien sûr, je souhaite remercier chaleureusement monsieur Latrech Ali et monsieur Mehdadi zoheir de m'avoir ouvert les portes de la recherche depuis ma Licence;

Ce travail a été réalisé sous la direction de madame Toumi Benali Fouzia maitre de conférences à L'université de Sidi-Bel-Abbés, par ses conseils, tant sur le plan de la collecte des données sur le terrain qu'au plan de l'élaboration du mémoire et sa connaissance approfondie en matière d'expérimentation, m'ont été précieux pour mener à terme, et dans les meilleures conditions cette étude dont il a déterminé les orientations, tout en me laissant entière liberté pour la conduire à mon gré. Je la remercie de la confiance qu'elle m'a témoignée et je l'assure de ma profonde reconnaissance.

Que Monsieur Benyahia Mohamed, Professeur et doyen de la faculté de la science de la nature et de la vie, Université Djillali liabés de Sidi-Bel-Abbés, trouve ici l'expression de ma gratitude pour l'intérêt qu'il a toujours porté à cette étude et de m'avoir honoré en acceptant de présider mon jury.

A Monsieur, Hamel Laid, Professeur à l'université de Sidi-Bel- Abbés, J'exprime mes plus sincères remerciements d'avoir bien voulu participer à ce jury et apporter sa critique sur ce thème.

Que Monsieur Mehdadi Zoheir, Professeur à L'université de Sidi-Bel-Abbés, trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements pour son aide, ses conseils et ses encouragements très constructifs qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail de recherche et pour avoir examiné ce travail.

Je remercie vivement également Monsieur CHADLI Rabah, maitre de conférences à L'université de Mostaganem, d'avoir bien voulu faire parti du jury et pris le temps d'évaluer ce travail.

Je tiens également à remercier, de manière générale, toute l'équipe de l'unité expérimentale de Sidi-Bel-Abbés et de Mostaganem pour son accueil et sa gentillesse, en particulier le Professeur Benali Mohamed et le Dr bouzouina pour leur aide précieuse, leur

sérieux et leur disponibilité qui m'ont permis de mener à bien les tests phytochimiques au niveau de leurs laboratoires.

Nous tenons à remercier les deux chefs départements de notre faculté Dr Bouzidi Mohamed Ali et Dr Benabderahmane Mokhtar pour tous les facilités dans notre parcours d'apprentissage et de recherche.

Je tiens à remercier mon père de m'avoir toujours soutenu dans ce que j'entreprenais et surtout de m'avoir donné le goût de la Nature.

Mes remerciements vont aussi et plus particulièrement madame Benchohera Hadria Amel, Dif Mustapha Mahmoud et Rahmani Hanane, par leur amitié et leur présence et de m'avoir aidé à la réalisation de cette thèse de quelque manière que ce soit en me permettant d'accéder à des documents, en m'offrant un conseil ou un encouragement.

Je remercie mon mari pour son soutien sans faille et ses encouragements pendant les périodes les plus dures.

Finalement, un grand merci à ma mère pour son attention et son soutien et tout Particulièrement ma sœur Samia pour son aide précieuse et sa patience ont grandement contribué à la finalisation de ce document, qu'elle trouve ici toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Enfin, merci à la Nature pour avoir offert à nos yeux l'exubérante flore et faune extraordinaire.

Résumé

Arbutus unedo L, dénommé communément Arbousier, est une espèce connue pour son importance écologique et économique, sur l'ensemble de son aire de distribution, particulièrement en Algérie. Elle est d'un grand intérêt dans le maintien de la biodiversité, ce qui fait que sa préservation s'impose avec acuité actuellement.

Toute fois, sa richesse en principes actifs et en substances naturelles lui conférant ainsi, des vertus thérapeutiques, méritant d'être étudiée et valorisée, en caractérisant ses composés phytochimiques, et en identifiant leurs profils chimiques et leurs activités anti oxydante.

Une telle étude, permet de mettre en relief son intérêt ethnobotanique et son intérêt industriel, et par conséquent nous proposons sa domestication et sa culture au tant que culture industrielle.

Dans ce contexte, le présent travail apporte une contribution à la valorisation de l'espèce *Arbutus unedo* L, une Ericacée de l'Ouest Algérien. Et cela à traves :

-Une enquête ethnobotanique réalisée à l'aide d'un questionnaire semi-structuré pour la détermination des différentes utilisations médicinales de cette plante. L'enquête a prouvé qu'elle est utilisée dans le traitement des affections douloureuses et inflammatoires, les maladies de l'appareil circulatoire et les infections cutanées.

-Une étude phytochimique a été aussi entamée. En déterminant le dosage quantitatif des composés phénoliques totaux, des composés flavonoïdes extraits, à partir de quatre solvants différents (1-butanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme, eau), et les tanins, du fruit *Arbutus unedo* L. qui pousse naturellement dans trois régions choisies pour cette étude, situées dans l'ouest algérien, la région d'El Marsa (wilaya de Chlef), la région de Terni (wilaya de Tlemcen) et la région de Djebel Guezoul (wilaya de Tiaret).

La méthodologie adoptée pour l'évaluation quantitative de ces composés est la méthode de la colorimétrie ainsi que la procédure Folin Ciocalteu.

Les résultats ont révélés que la quantité la plus importante des composés phénoliques a été enregistrée dans la fraction d'acétate d'éthyle extraite à partir des fruits originaires d'El Marsa, suivi par celle de Terni.

Les résultats des composés flavonoïdes montrent que la fraction d'acétate d'éthyle d'El Marsa donne les valeurs les plus remarquables (56.84 mg EC/g Ps) par rapport aux autres fractions qui enregistrent des valeurs de l'ordre de 2.18-56.84 mg EC/g Ps.

En revanche, une caractérisation des molécules phénoliques dans les extraits du fruit de l'arbousier, originaire de la région de Tiaret par la méthode de Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) a été entreprise, pour identifier le profil chimique de la fraction flavonoïque de ces acides phénoliques.

Cinq composés flavonoïdes ont été identifiés dans la région de Tiaret; qui sont: la catéchine, l'apiginine, la silybine, la naringine et la fisetine.

Par ailleurs, la caractérisation du profil chimique des flavonoïdes de l'*Arbutus unedo* L. originaire d'El Marsa a été effectuée par la méthode de la résonance magnétique nucléaire, et qui a révélée deux molécules identifiées qui sont: 2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (flavonoïde glycoside) et le 5-deoxysigmoidin B-4′-methyl ether (flavanone).

La valorisation de notre espèce *Arbutus unedo* est complétée par la détermination du pouvoir antioxydant des quatre extraits in vitro, en utilisant la méthode du DPPH.

Parmi tous les extraits, la fraction d'acétate d'éthyle extraite du fruit originaire d'El Marsa (wilaya de Chlef) a montré la plus forte activité anti oxydante suivie de celui de la région de Djebel Guezoul (wilaya de Tiaret).

De ce fait, les résultats, de l'étude phytochimique du fruit de l'arbousier originaire de l'ouest algérien, ainsi que son activité anti oxydante déterminée par le test de DPPH ont montré clairement le potentiel phytochimique et biologique de l'espèce forestière *Arbutus unedo.L* et pourraient justifier leur usage dans la médecine traditionnelle.

En fin, une étude statistique a été entamée pour mettre en valeur les résultats de cette étude. Cette analyse permet de mettre en évidence la corrélation des caractéristiques des zones d'étude et les polyphénols des fruits d'*Arbutus unedo* L.

Mots clés: *Arbutus unedo* L., étude ethnobotanique, polyphénols, flavonoides, HPLC, RMN, pouvoir antioxydant, analyse statistique, Ouest Algérien.

Abstract:

Arbutus unedo L., commonly known as Strawberry tree is a species known for its ecological and economic importance throughout its range, particularly in Algeria. It is of great interest in the maintenance of biodiversity, so that its preservation is required acutely now.

However, it is rich in active ingredients and natural substances giving it so therapeutic value, should be studied and valued, featuring its phytochemicals, and identifying their chemical profiles and antioxidant activities.

This study helps to highlight his ethnobotanical interest and industrial interest, and therefore we suggest domestication and culture as an industrial culture.

In this context, this work contributes to the valorisation of the species *Arbutus unedo* L, an ericaceous in West Algerian. And this at traves:

-An ethnobotanical investigation using a semi-structured questionnaire to determine the different medicinal uses of this plant. The investigation has shown that it is used in the treatment of painful and inflammatory conditions, diseases of the circulatory system and skin infections.

-By addition, a phytochemical study was also initiated. In determining the quantitative determination of total phenolics and flavonoids extracts from four different solvents (1-butanol, ethyl acetate, chloroform, water), of *Arbutus unedo* L. fruit that grows naturally in three regions in western Algeria, the region of El Marsa (province of Chlef) the Terni region (province of Tlemcen) and Jebel Guezoul (province of Tiaret).

The methodology for the quantitative assessment of these compounds is the method of colorimetry and Folin Ciocalteu procedure.

The results revealed that the most significant amount of phenolic compounds was recorded in the ethyl acetate fraction extracted from native fruits of El Marsa, followed by that of Terni.

The results show that the flavonoid compounds of ethyl acetate fraction of El Marsa gives the most remarkable values (56.84 mg CE/g dp) compared to other fractions which record values of the order of 2.18-56.84 EC mg /g dp.

However, a characterization of phenolic molecules in the extracts of the fruit of the strawberry tree, a native of Tiaret region and El Marsa by chromatography method using high performance liquid chromatography (HPLC) and nuclear magnetic resonance (NMR) has was undertaken, respectively, to identify the qualitative content of these phenolic acids.

Five flavonoid compounds have been identified in the area of Tiaret; which are: catechin, apiginine, silybin, naringin and fisetin.

In additionthe characterization of the chemical profile of flavonoids of Arbutus unedo L. from El Marsa was performed by the method of nuclear magnetic resonance, and which revealed that two molecules identified are: 2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (flavonoïd glycoside) and 5-deoxysigmoidin B-4′-methyl ether (flavanone).

The valorisation of our species *Arbutus unedo* L. is completed by the determination of the antioxidant capacity of four extracts in vitro, using the DPPH method.

Of all the extracts, the ethyl acetate fraction extracted from fruit native of El Marsa (province of Chlef) showed the highest antioxidant activity, followed by that of the Jebel Guezoul (wilaya of Tiaret).

Therefore, the results of the phytochemical study of the fruit of the strawberry tree native to western Algeria and its DPPH antioxidant determined by the test activity have shown clearly the phytochemical and biological potential of the forest species Arbutus unedo.L and could justify their use in traditional medicine.

In the end, a statistical study was started to showcase the results of this study. This analysis allows to highlight the correlation characteristics of the study areas and polyphenols of fruits of *Arbutus unedo* L.

Keywords: *Arbutus unedo* L., Ethnobotanical investigation, polyphenols, flavonoids, HPLC, NMR, antioxidant activity, statistical analysis, Western Algerian.

مُلَّخَصْ

Arbutus unedo L. المعروف باسم شجرة ساسنو هو من الانواع المعروفة لأهميتها الايكولوجية و الاقتصادية في جميع انحاء نطاقه و خاصة في الجزائر .و لها اهمية كبيرة في الحفاظ على التنوع البيولوجي بحيث المحافظة عليها هو مطلوب حاليا.

و مع ذالك غناها بالمواد الطبيعية و المكونات الفعالة يعطيها قيمة علاجية تستحق الدراسة و ذالك بتحديد المكونات الكيميائية النباتية لها و الأنشطة المضادة للأكسدة.

هذه الدراسة تساعد على تسليط الضوء على الفئدة الثنونباتية و الاهمية الصناعية و بالتالي نفتح تدجين وزراعتها.

وفي هذا السياق يساهم هذا العمل في إعطاء قيمة شجرة *Arbutus unedo L.* من عائلة *Ericaceae* الموجودة في الغرب الجزائري و هذا عبر :

-دراسة الاثنونباتية باستخدام استمارة شبه منظمة لتحديد الاستخدامات الطبية المختلفة لهذه الشجرة .فقد اظهر التحقيق انها تتم استخدامها في علاج الالتهابات المؤلمة .و امراض جهاز الدورة الدموية و الالتهابات الجلدية.

و علاوة على ذالك الدراسة الكيمائية للنبات قد تمت.و ذالك بتحديد كمية الفينولات و الفلافونويدات الكلية من اربع مستخلصات مختلفة (1-بيوتا نول –ايثيل اسيتات-الكلورو فورم –المرحلة المائية) من فاكهة اللتي تنمو بشكل طبيعي في 3 منطق في غرب الجزائر .منطقة المرسى .(ولاية الشلف) منطقة ترني (ولاية تلمسان) وجبل غزول (ولاية تيارت).

منهجيه التقييم الكمي لهذه المركبات هي طريقة قياس الألوان و طريقة فولين.

النتائج كشفت انه تم تسجيل اكبر كمية من المركبات الفينولية مستخلص الايثيل استات من منطقة المرسى .تليها في دلك ترني و تظهر النتائج ان المركبات الفلافونويد من مستخلص انيل من منطقة المرسى تعطي ابرز القيم (56.04 ملغ) مايعادل الكاتشين مقارنة مع المستخلصات الاخرى اللتي سجلت ن 2.18 -56.84 مايعادل الكاتشين

بالاضافة تمت دراسة النشاط المضاد الاكسدة من اربع مستخلصات و دالك باستخدام

و من بين جميع المستخلصات اظهر مستخلص الايثيل استات المستخرج من فاكهة المرسى (ولاية الشلف) اعلى نشاطات مضاد للأكسدة

تليها نشاط مضاد للأكسدة من منطقة جبل غزول (ولاية تيارت)

نتائج الدراسة الكمياتية النباتية للفاكهة الموجودة في الغرب الجزائرى و نشاطها المضاد للأكسدة التي DPPH حددها

اظهر الاختبار بوضوح وجود امكانيات نباتية و بيولوجية لهدا النبات و يمكن ان يتم استخدامها في الطب التقليدي.

و مع دالك منطقة تيارت و المرسى تم تحديد خصائص و دالك و دالك HPLC و الرنين المغناطيسي النووي باستخدام تقنيات

لتحديد المحتوى النوعي لهده الاحماض الفينولية.

وقدم تحديد 5 مركبات فلونويدات من منطقة تيارت التي هي :

كاتشين. نارنجين. سلبين .ابيجنين.فسيوتن.

و تحديد مركبتين من منطقة المرسى و التي هى : فلافونويد غليكوزيد و فلافونول.

كلمات البحث : ساسنو-اثنونباتية-فلافونويد- الإحصـــــاتي التحليـــــل الغرب الجزائري,النشاط المضاد للأكسدة HPLC, RMN

Remerciements

Résumé

Abstract

مُلَّخَصْ

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale	01
1er partie : Synthèse bibliographique	
Chapitre I: Valorisation des plantes médicinales	05
I-1- Plantes médicinales et phytothérapie	05
I-1-1- Les plantes médicinales	05
I-1-2- Le pouvoir des plantes	06
I-2- Phytothérapie	06
I-2-1- Différents types de la Phytothérapie	06
a- *Aromathérapie*	06
b- *Gemmothérapie*	06
c- *Herboristerie*	06
d- *Homéopathie*	07
e- *Phytothérapie pharmaceutique*	07
I-2-2- Les intérêts de la phytothérapie	07
I-2-3- Efficacité des plantes entières	08
I-3- Ethnobotanique, Ethnopharmacologie au service de la médecine	08
I-4- valorisation des plantes médicinales	08
Chapitre II : Généralités sur les composés phénoliques	13
II-1- Définition et fonctions des métabolites secondaires	13
II-2- Classification des métabolites secondaires	13
II-2-1- Les composés phénoliques	13
II-2-1-1- Classification des composés phénoliques	14
II-2-1-1-1- Les acides phénoliques	14
a- *Les acides benzoïques*	14
b- *Les acides cinnamiques*	15
II-2-1-1-2- les flavonoïdes	15
a. *Biosynthèse des flavonoïdes*	15
b- Propriétés botaniques	16
c– Distribution et exemples de flavonoïdes	16

d- Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes	17
-Action antioxydante	17
- Protection vasculaire	17
- Flavonoïdes et ménopause	18
- Effet contre le cancer	18
- Action anti-inflammatoire	18
- Action antidiabétique	18
- Action anti-infectieuse	19
- Effet sur la peau	19
II-2-1-1-2-1- Autres utilisation de flavonoïde	19
a- Edulcorant	19
b-Engrais	19
II-2-1-1-3- Les anthocyanes	20
II-2-1-1-4- Les isoprénoïdes (Terpénoïdes)	20
II-2-1-1-5- Les coumarines	20
II-2-1-1-6- Les quinones	21
II-2-1-1-7- Les tanins	21
a- *Les tanins condensés (flavan-3-ols)*	21
b- *Les tanins hydrolysables*	22
II-3-Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires	22
Chapitre III : Aperçu sur Les antioxydants	25
III-1- Les radicaux libres et le stress oxydant	25
III-2- Les radicaux libres dans les systèmes biologiques	25
III-3-Les antioxydants	26
III-3-1-Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action	26
- *Groupe I*	26
- *Groupe II*	27
III-3-2- Classification des antioxydants suivant la nature chimique	27
III-3-2-1- Les antioxydants naturels	28
III-3-2-1-1-Les antioxydants enzymatiques	28
a) Les superoxydes dismutases (SOD)	28
b) Les catalases	28
c) Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX)	28
III-3-2-1-2 Les antioxydants non enzymatiques	28

a) La vitamine E	29
b) La vitamine C (acide ascorbique)	29
c) La β-carotène	29
d) Glutathion	29
e) Les oligoéléments	29
f) Les composés phénoliques issus des végétaux	30
III-3-2-2- Les antioxydants synthétiques	30
III-4-Evaluation de l'activité antioxydante	30
III-4-1 Méthodes de piégeage des radicaux libres oxygénés	32
III-4-1-1- Pièggeage du radical superoxyde (O2•-)	32
III-4-1-2- Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H2O2 scavenging activity)	32
III-4-1-3- Piégeage du radical hydroxyle (HO●)	32
III-4-1-4- Piégeage du radical peroxyle (ROO●)	33
III-4-2- Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction	33
III-4-2-1- Pièggeage du radical 2,2-diphényl-1picrylhydrazyl (DPPH●)	33
III-4-2-2- Pièggeage du ABTS (2,2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])	33
III-4-2-3- Réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)	34
III-4-3- Activité antioxydante par la méthode de décoloration du béta-carotène (β-carotene bleaching method).	34
***Chapitre IV : état de connaissance sur le genre Arbutus unedo* L.**	36
IV-1- Intérêts	36
IV-2- Identification botanique de l'espèce végétale étudiée	38
IV-2-1- Description botanique	39
IV-3- Habitat	41
IV-4-Tronc et ramifications	41
IV-4-1- Feuille	41
IV-4-2- Fleurs	42
IV-4-3- Floraison	42
IV-4-4- Fruits	42
IV-5- Phénologie de l'espèce *Arbutus unedo* L	42
IV-6- Milieux	43
IV-7- Multiplication de l'arbousier	43
IV-7-1- Germination	43
IV-7-2- *Multiplication végétative*	45

IV-7-3- *Le Bouturage*	45
a-Facteurs endogènes	45
b- Facteurs exogènes	45
IV-7-3-1- Stratégies de bouturages	46
- *Boutures de rameaux feuillés*	46
- *Les boutures herbacées*	46
- *Les boutures semi-herbacées ou semi-ligneuses*	46
- *Les boutures ligneuses*	46
- *Boutures de rameaux non-feuillés*	46
- *Boutures d'œil*	46
IV-8- Caractéristiques chimiques et antioxydantes d'*Arbutus unedo* L	47
IV-8-1- Feuilles	47
IV-8-1-1- *Composition chimique des feuilles*	47
IV-8-1-2-Capacité antioxydante des feuilles	49
IV-8-2- Fruit	50
IV-8-2-1- Composition chimique du fruit	50
IV-8-2-2- Capacité antioxydante du fruit	56
IV-9- Effets d'*Arbutus unedo* l. sur la santé humaine	57
IV-9-1- Feuille	57
IV-9-2- fruit	59
IV-9-3- Les antioxydants mécanismes d'action	60
2eme partie : Etude expérimentale	
Chapitre V: Matériels et méthodes	
V-1- Enquête ethnobotanique	62
a- Aperçu géo-ethnographique de la zone d'étude ethnobotanique	63
b- Méthode d'étude	66
c- Echantillonnage	68
V-2- Etude phytochimique	69
V-2-1- Matériel végétal	69
V-2-2- Situation géographique des stations d'étude	69
V-2-3- Conservation du matériel végétal	72
V-2-4- Dosage des composés phénoliques	72
V-2-4-1 Extraction des composés phénoliques	72
a- Dosage des phénols totaux	73
b-Dosage des flavonoïdes	74
C- Dosage des Tanins	75

V-2-4-2 Identification des flavonoïdes	75
V-4-2-1-Caractérisation des composés par Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	79
V-4-2-2- Caractérisation des flavonoïdes par la méthode de Résonance Magnétique Nucléaire 2D (1H, 13C)	80
V-5- Valorisation des extraits flavonoïques dans la détermination de l'activité anti oxydante	82
V-5-1 Evaluation du pouvoir anti oxydant	82
Chapitre VI: résultats et discussion	
VI-1- Discussions des résultats de l'enquête ethnobotanique	83
VI-1-1- Fréquence utilisation de la plante médicinale selon la classe d'âge	83
VI-1-2- Utilisation de la plantes médicinale selon le sexe	83
VI-1-3-Utilisation de la plante médicinale selon le niveau d'étude	84
VI-1-4- Utilisation de la plante médicinale selon la situation familiale	85
VI-1-5- Utilisation de la plante médicinale dans les soins des maladies	85
VI-1-5-1-Parties utilisées	85
VI-1-5-2- Mode de préparation	86
VI-1-5-3- Domaines d'indication thérapeutique	86
VI-2- Discussion des résultats de l'étude phytochimique	88
VI-2-1- extraction	88
VI-2-2-Résultats de l'étude quantitative	89
VI-2-2-1- Dosage des polyphénols totaux	89
VI-2-2- Dosage des flavonoïdes	93
VI-2-3- Dosage des tanins	94
VI-3- Résultats de la caractérisation des flavonoïdes dans *A. unedo* L.	96
VI-3-1- L'indentification des molécules par Chromatographie à haute performance en phase liquide (HPLC)	98
VI-3-2- L'indentification des molécules par RMN ^{13}C, ^{1}H, UV-visible	101
VI-4- Valorisation *d'Arbutus unedo* par le pouvoir antioxydant	107
Conclusion générale	111
Références bibliographiques	114
Publications internationales	

Liste des figures

	38
Figure1: *Arbutus unedo* L	39
Figure 2: Carte de répartition approximative d'*Arbutus unedo* L.	40
Figure 3: vue d'ensemble d'un arbousier (*Arbutus unedo* L.) avec fleurs et fruits	40
Figure 4: fruits et fleurs d'*Arbutus unedo* L	
Figure 5: Les structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants dans les feuilles d'*Arbutus unedo* L	49 54
Figure 6 : les structures chimiques des anthocyanes présents dans les fruits d'*Arbutus unedo* L	65
Figure 7: carte de localisation géographique de la zone d'étude ethnobotanique SBA	66
Figure 8: carte de localisation géographique des trois stations d'études	70
Figure 9: localisation de la zone d'étude (Terni)	71
Figure 10: localisation de la zone d'étude (El Marsa)	72
Figure 11: localisation de la zone d'étude (Massif de Djebel Guezoul)	
Figure 12: Filtration de la solution hydro-éthanolique obtenue après macération (Cliché, K. Bouzid, 2013).	76 77
Figure 13: évaporation de la phase aqueuse du évaporateur rotatif (Cliché, K. Bouzid, 2013)	78
Figure 14: lyophilisateur (Cliché, K. Bouzid, 2013)	78
Figure 15: Les quatre extraits obtenus après lyophilisation **(**Cliché, K. Bouzid, 2013)	82
Figure 16: spectrophotomètre utilisé pour la lecture des absorbances (Cliché K, Bouzid, 2013)	84
Figure 17: fréquence utilisation de la plante médicinale selon la classe d'âge	85
Figure 18: utilisation de la plantes médicinale selon le sexe	85
Figure 19: utilisation de la plante médicinale selon le niveau d'étude	86
Figure 20: utilisation de la plante médicinale selon la situation familiale	
Figure 21: répartition des pourcentages des différentes parties utilisées de la plante médicinale	86 87
Figure 22: représentation de mode préparation	87
Figure 23: domaines d'indication thérapeutique	
Figure 24: Aspect, couleur des quatre extraits obtenus à partir du fruit *Arbutus unedo* L. (Cliché, K. Bouzid, 2013)	90
Figure 25: comparaison des teneurs des polyphénols entre differents extraits d'*Arbutus unedo* L	92
Figure 26 : comparaison des teneurs des flavonoides entre differents extraits d'*Arbutus unedo* L	94 96
Figure 27 : teneurs en tanins condensés dans les fruits d'*Arbutus unedo* L	100

Figure 28 : chromatogrames d'HPLC des standards à 280 nm	101
Figure 29: chromatogrames d'HPLC des extraits du fruit de l'arbousier de Tiaret à 280 nm	102
Figure 30: Structures des composés phénoliques détectées dans des extraits de fruits	
Figure 31 : spectre ^{1}H du composé 1(2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside)	104
Figure 32 : spectre ^{13}C du composé 1(2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside)	105 105
Figure 33: structure chimique du composé 2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside	
Figure 34 : spectre ^{1}H du composé 2 (erylatissin C) identifié dans l'extrait aqueux de la région d'El Marsa	108
Figure 35: spectre ^{13}C du composé 2 (erylatissin C) identifié dans l'extrait aqueux de la région d'El Marsa	108 109
Figure 36: structure chimique du composé 2 (erylatissin C)	110
Figure 37: spectre ^{1}H de l'extrait acétate d'éthyle	110
Figure 38: spectre ^{13}C de l'extrait acétate d'éthyle	111
Figure 39: spectre ^{1}H de l'extrait chloroformique	112
Figure 40: spectre ^{13}C de l'extrait acétate d'éthyle	
Figure 41: Décoloration de la solution du DPPH du violet en jaune en fonction de la concentration (Cliché, K. Bouzid, 2013)	113 114
Figure 42: activité antioxydante au test DPPH des extraits *d'Arbutus unedo* L	

Liste des tableaux

47

Tableau 1 : Utilisations médicinales des différentes parties de la plante *A. unedo* L 51

Tableau 2: Composition chimique des fruits d'*A.unedo* L. fruits (g / kg) 68

Tableau 3: Nombre d'enquêtés par strate 69

Tableau 4: caractéristiques géographiques et bioclimatiques des stations d'étude 89

Tableau 5: Aspect, couleur et rendement de différents extraits d'*Arbutus unedo* L

Tableau 6: les rendements de différents extraits d'*A.unedo* L. après l'extraction et 89

l'évaporation de 100 g de fruits séchés 91

Tableau 7: La teneur totale phénols totaux dans les extraits d'*Arbutus unedo* L 94

Tableau 8 : La teneur totale des flavonoides dans les extraits d'*Arbutus unedo* L 96

Tableau 9 : La quantification des tanins des les fruits d'*Arbutus unedo* L

Tableau 10 : composés identifiés dans les différentes fractions flavonoiques de l'arbousier 99

originaire de Tiaret par HPLC

Tableau 11: valeurs des IC50 trouvées dans les extraits d'*Arbutus unedo* L 108

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaires. Elles utilisent la plupart des espèces végétales, tant ligneuses qu'herbacées, comme médicaments. Les plantes médicinales demeurent encore une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement en l'absence d'un système médicinale moderne (Tabuti et al. 2003). L'utilisation traditionnelle des plantes est inévitable dans la fourniture des médicaments traditionnels pour le système de soins de santé et aussi comme une source de nourriture pour la classe de faible revenu et les communautés rurales.

L'Algérie par sa situation géographique, reconnue par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques dont la plupart existe à l'état spontané, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays. Cependant, la flore Algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15 % endémiques, reste très peu explorée sur le plan phytochimique comme sur le plan pharmacologique Quezel et Santa (1963). Cette richesse et cette originalité font que l'étude de la flore d'Algérie présente un intérêt scientifique fondamental pour la connaissance et le savoir dans le domaine de l'ethnobotanique, de la pharmacopée traditionnelle mais également un intérêt scientifique appliqué dans le domaine de la valorisation des substances naturelles.

L'hétérogénéité de cette diversité forestière méditerranéennes et algériennes est liée à de nombreux facteurs qui peuvent être résumés comme suit souligne Benabdeli en 1998 :

- le monde méditerranéen est un creuset de formation et de conservation des espèces, puisque bon nombre d'entre elles ont été créées sur place, cette région a constitué un refuge lors des glaciations. De nombreux types endémiques liés généralement à l'isolement des populations avec la multiplication des génotypes,
- le bioclimat est également hétérogène car découlant des facteurs climatiques à l'origine du déterminisme méditerranéen. Deux facteurs restent prédominants et agissent sur les formations végétales et leur composition, la chaleur et l'humidité dans toutes leurs composantes et de nombreux indices furent calculés pour cerner le comportement des espèces végétales.

Cette diversité doit, de ce fait être protégée en permanence, selon Benabdeli, 2010, sachant que les espèces les plus stables qui assurent la pérennité des groupements végétaux

sont localisées dans les strates herbacée, sous-arbustive et arbustive et sont à un pourcentage dépassant les 50% utilisées en cuisine et phytothérapie. Les principaux genres qui répondent à cette situation sont: *Arbutus, Artemisia Asparagus, Asplenium, Berberis, Carlina, Celtis, Cistus, Cytisus, Daphne, Daucus, Echium, Erica, Eryngium, Euphorbia, Ferula, Galuim, Genista, Globularia, Helianthemum, Ilex Juniperus, Laurus, Lavandula, Myrtus, Nerium, Olea, Oxalis, Pistacia, Polygonum, Quercus, Rosmarinus, Rumex, Ruscus,* (Benabdeli, 1998).

Par ailleurs, cette richesse floristique inestimable donne à la pharmacopée traditionnelle l'envi et l'opportunité d'en profiter, du fait que cette végétation a toujours été une source importante de principe actif thérapeutique. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 65-80% de la population mondiale dans les pays en développement, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne, se réfugient et se dirigent vers la médecine traditionnelle, en utilisant les plantes pour se remédier et se soigner (Lhuillier, 2007); il faut noter aussi, que plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays industrialisés tirent directement ou indirectement leurs origines des plantes (Newman et al., 2000; Calixto, 2005). Pour cette raison là que notre attention doit être portée sur les plantes qui n'ont pas encore été étudiées pour, non seulement déterminer leur propriétés phytochimiques, mais aussi pour caractériser et valoriser leur réservoir en ses composés qui attendent d'être exploités (Marston et Hosttemann,2003).

En revanche, Benabdeli, 2010, signale qu'il est totalement illusoire et même utopique de penser protéger la biodiversité en ayant exclusivement recours aux zones protégées sous toutes les formes mises au point durant ces dernières décennies. Depuis des millénaires l'Homme a toujours considéré l'espace comme un terrain pouvant être exploité à sa guise selon des méthodes et des techniques qu'il a jugé adaptées.

Pour faire face à cette situation, seule une approche intégrée axée sur la mise en valeur socioéconomique des espèces valorisables permet de diminuer la pression sur les espaces naturels en multipliant dans toutes les actions de boisement ou de reboisement, les espèces valorisables qui rejettent de souche pour encourager le taillis sous futaie et en introduisant des espèces feuillues sous toutes les futaies résineuses, notamment lorsque le sous-bois est faiblement représenté et que la densité n'est pas élevée.

Pour cela, Benabdeli confirme en 2011 à ce sujet, que la rentabilité qu'offrent les plantes médicinales dans les écosystèmes forestiers est certaine et doit être un axe économique qu'il faut exploiter à condition que toutes les mesures d'accompagnement soient respectées et qui restent des préalables tant techniques que scientifiques indispensables pour

assurer la protection d'un patrimoine végétal sérieusement menacé. Plus de 200 espèces végétales naturelles se développant dans nos formations forestières offrent un intérêt médical.

Arrêter une politique découlant d'une stratégie mûrement réfléchie et intégrée dans un plan de rentabilisation et de protection semble être une des recommandations prioritaire à concrétiser avec le monde universitaire d'abord puis industriel par la suite ».

En effet, le développement des techniques d'analyse chimiques a permis de révéler qu'une espèce végétale peut renfermer des milliers de constituants phytochimiques, ce qui justifie scientifiquement l'utilisation traditionnelle de ces plantes. En fait, ces investigations phytochimiques permettent de donner aussi la possibilité à l'industrie pharmaceutique de synthétiser des molécules chimiques similaires à celles extraites et identifiées dans le matériel végétal étudié, et permettent de proposer de ce fait, sa considération comme plante industrielle en recommandant alors, sa domestication.

Dans ce contexte, et dans le but d'une caractérisation des composés naturels, notre choix a été porté sur une plante médicinale, du fait qu'elle n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique en Algérie, au par avant et du fait que l'enquête ethno pharmacologique auprès de la population ayant connaissance a révélé son usage permanent et intensif en médecine traditionnelle. Il s'agit de l'*Arbutus unedo* dénommé communément l'arbousier, poussant spontanément dans l'ouest algérien et pour une meilleure valorisation de cette espèce médicinale, que la présente étude a été réalisée. Ainsi, notre travail est composé de deux grandes parties :

Une partie qui représente la synthèse bibliographique et qui englobe les chapitres ci-dessous :

- Le premier chapitre est consacré à l'étude de la valorisation des plantes médicinales.
- Dans le deuxième chapitre de ce travail, nous présenterons des généralités sur les composés phénoliques.
- Le troisième chapitre se distinguera pas un aperçu sur les antioxydants.
- Dans le quatrième chapitre de ce travail, nous passerons à l'état de connaissance sur le genre *Arbutus unedo* L. Ensuite, nous présenterons la plante sous investigation où nous donnerons sa description botanique, ses utilisations thérapeutiques, ses caractéristiques chimiques et antioxydantes ainsi que tous les travaux antérieurs réalisés sur l'espèce en question.

Une deuxième partie consacrée au travail expérimental personnel qui débutera par:

- Le chapitre du matériel et méthodes en expliquant la méthodologie adoptée pour l'étude ethnobotanique en décrivant la zone d'étude, la méthodologie arrêtée pour l'extraction et la caractérisation chimique des composés extraits des fruits de

l'arbousier de trois origines différentes, (Tlemcen), (Chlef), (Tiaret), en présentant aussi les zone de prélèvement du matériel végétal et en fin la méthodologie arrêtée pour leurs valorisation à travers la détermination de leur activité antioxydant et antibactérienne. Nous reporterons également dans cette partie, le chapitre résultats et discussion qui sera sanctionné par une conclusion générale qui résumera l'ensemble du travail réalisé et présentera les perspectives que nous envisagerons de réaliser.

Synthèse bibliographique

Chapitre I: Valorisation des plantes médicinales

Chapitre I: Valorisation des plantes médicinales

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 (Fleurentin, 1993). Les pharmacopées traditionnelles ont, certes, leur intérêt propre, soit sur le plan bio-médical, soit sur le plan culturel. Elles constituent un recours fréquent, par défaut, pour les populations dépourvues de ressources, auxquelles l'accès à la pharmacopée moderne est interdit. Les ethnopharmacologues observent également avec attention le succès grandissant des pharmacopées anciennes, au titre d'une « vague verte » qui, un peu partout dans le monde, apparaît comme une alternative à la médecine chimique. Qu'il s'agisse de préparations prenant place dans un système médical traditionnel ou de ressources pour une production industrielle, à côté des aspects scientifiques, médicaux et sociaux, on peut souhaiter prendre en compte la dimension économique. Il y a de toute façon production, distribution, consommation, structures économiques et institutions (Gueneau et al., 1998).

De ce point de vue, les médecines et pharmacopées traditionnelles ne sont pratiquement pas observées: si on estime qu'elles ont un intérêt sur le plan social, tout reste à faire sur le plan économique. D'une certaine manière, les pratiques de l'industrie pharmaceutique, puisant des principes actifs dans la pharmacopée, sont plus apparentes. La nécessaire protection des démarches innovatrices entre en contradiction avec les prérogatives des détenteurs des ressources, communautés ou États, au titre de la propriété intellectuelle. Les conflits qui en résultent ne trouvent pas, à ce jour, de solutions institutionnelles satisfaisantes dans les accords internationaux en vigueur. On assiste alors à une multiplication des contrats entre firmes et organismes «représentant» les détenteurs de la ressource pharmacologique, dans une tentative plus ou moins aboutie de compromis (Swaminathan, 1996)).

I-1- Plantes médicinales et phytothérapie

I-1-1- Les plantes médicinales:

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth et al, 1986). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres

humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj et al, 2007).

I-1-2- Le pouvoir des plantes:

L'action de la phytothérapie sur l'organisme dépend de la composition des plantes, depuis XVIIIème siècle, au cours duquel des savants ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques qu'elles contiennent. On considère les plantes et leurs effets en fonction de leurs principes actifs. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle a permis la mise au point de médicaments essentiels. Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la diagoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes (Iserin et al, 2001).

I-2- Phytothérapie:

La phytothérapie, selon Bruneton (1999), est le traitement par les plantes; c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation de produits préparés à partir de plantes sans passer par une étape de sélection de molécules, on ne consomme donc pas que le principe actif mais tout ce que contient la plante. Par ailleurs la phytothérapie requiert une connaissance parfaite de substances chimiques contenues dans un organe végétal et une bonne connaissance de mode d'emploi. On peut distinguer la phytothérapie utilisée dans une pratique traditionnelle, parfois très ancienne, basée sur l'utilisation de plantes ayant des vertus découvertes empiriquement de la phytothérapie basée sur les études scientifiques recherchant les principes actifs des plantes et leurs effets (Kansole, 2009).

I-2-1- Différents types de la Phytothérapie :

a- ***Aromathérapie:*** est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.

b- ***Gemmothérapie:*** se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicelles.

c- ***Herboristerie:*** correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraiche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). la préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau: décoction, infusion,

macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

d- ***Homéopathie:*** a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.

e- ***Phytothérapie pharmaceutique:*** utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisat (Strang, 2006).

I-2-2- Les intérêts de la phytothérapie

Tout d'abord, la phytothérapie est une indication de premier plan, c'est-à-dire qu'elle peut représenter un mode thérapeutique à elle seule. On retrouve par exemple cela avec le millepertuis dans la dépression légère, l'aubépine dans les troubles mineurs du rythme cardiaque, le ginkgo et la vigne rouge dans l'insuffisance veineuse, ou encore les plantes à mucilages ou à dérivés anthracéniques dans la constipation. La phytothérapie est aussi utilisée en thérapeutique de second plan, comme adjuvant en complément d'un traitement plus puissant. Par exemple, dans le cas d'une hypertension artérielle mineure, on peut employer une préparation à base des feuilles d'olivier en plus d'un traitement antihypertenseur. Enfin, la phytothérapie est utilisée en traitement de troisième plan, en traitement de terrain. Elle permet alors de prendre en charge une maladie dans sa globalité, et également en prévention. C'est le cas par exemple pour l'utilisation de plantes immunostimulantes (comme l'échinacée), ou encore des plantes riches en vitamines et oligoéléments (Duriez F, 2000). Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique.

Le grand intérêt de la phytothérapie est la bonne tolérance des plantes, lorsque celles-ci sont utilisées aux bonnes posologies. De plus, l'utilisation des plantes en tant que médicaments est souvent basée sur des observations empiriques et des traditions qui datent parfois de milliers d'années. Les effets secondaires, le plus souvent peu marqués, sont donc généralement mieux connus que pour les molécules de synthèse (Arnal-Schnebelen, 2004).

I-2-3- Efficacité des plantes entières:

La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi "totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants, les plantes contiennent des centaines voire des milliers de substances chimiques actives (Iserin et al, 2001).

I-3- Ethnobotanique, Ethnopharmacologie au service de la médecine

L'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie sont des domaines interdisciplinaires de recherche qui examinent spécifiquement les connaissances empiriques des peuples autochtones concernant les plantes médicinales. Il a été rapporté que de nombreux phytomédicaments actuellement en usage, ont été utilisés par les peuples autochtones du monde entier. Certaines de ces connaissances ont été documentées et codifiées ou étudiées scientifiquement. Les enquêtes ethnobotaniques ont permis de découvrir la plupart des métabolites secondaires des plantes employées dans la médecine moderne. De nombreux médicaments qui sont couramment utilisés aujourd'hui (comme l'aspirine, l'éphédrine, l'ergométrine, la digoxine, la réserpine, l'atropine…) sont issus de la médecine indigène en passant par des enquêtes bioscientifiques appropriées. Lorsque l'on considère l'importance des plantes médicinales dans les pays en voie de développement, il n'est pas surprenant que la plupart des populations du monde dépend toujours de la médecine traditionnelle pour leurs besoins de santé primaires. Elle est relativement peu coûteuse et disponible localement et est facilement acceptée. Dans de nombreux cas, ces pays dépensent des millions de dollars sur les médicaments importés. Plusieurs pays africains et asiatiques encouragent désormais les médecines traditionnelles comme une composante intégrale de leurs programmes de santé publique (Souza et al.2009).

I-4- valorisation des plantes médicinales

Selon Bernarc et Hervé (2010), les pays en développement se heurtent quotidiennement aux problèmes posés par les grandes endémies et le manque chronique de soins de santé primaire apportés aux populations locales. Dans la plupart des cas, les solutions retenues sont originales et efficaces. Ainsi, aussi paradoxalement que cela puisse paraitre, les plantes médicinales de ces pays constituent, encore de nos jours la source principale de la pharmacopée africaine. Par ailleurs, l'emploi de certaines plantes africaines dans la pharmacopée moderne des pays industrialises est chose admise. Les plantes médicinales restent la source la plus importante des molécules entrant dans la composition des médicaments. Ainsi, il est estimé qu'aux Etats Unis, prés du quart des produits prescrits proviennent d'un végétal. Cette situation est assez générale. Mais, il est difficile de savoir

dans quelle mesure les Etats africains bénéficient des retombées économiques de l'ensemble de cette activité scientifique et industrielle particulièrement active dans le contexte actuel.

De toute évidence, bien que fort peu de statistiques existent dans ce domaine, certains pays tropicaux comme l'Inde, l'Egypte, le Soudan, le Mexique, mais aussi la Chine se partagent le marche mondiale qui dépasse le milliard de dollars par an. Or, dans de nombreux cas, le principe actif contenu dans ces plantes est connu. II en est extrait et c'est ce produit que l'Afrique importe, ce qui accroit l'écart entre le savoir-faire occidental et celui des pays tropicaux, africains ou non. Par ailleurs, pour des raisons fort complexes et multiples, il devient de plus en plus difficile d'obtenir des quantités suffisantes de végétaux pour isoler ces principes actifs indispensables a l'élaboration des médicaments. C'est l'une des raisons pour lesquelles un certain nombre d'Etats africains se sont intéressés aux différents aspects de la valorisation des plantes médicinales. Une telle préoccupation est clairement affichée parmi les objectifs prioritaires du plan scientifique quinquennal ivoirien redéfini en 1984.

Les techniques les plus séduisantes relèvent de la biotechnologie végétale. Ainsi, en vue de valoriser les plantes médicinales par des méthodes modernes, la biotechnologie s'avère utilisable dans au moins deux secteurs d'exploitation: soit la culture traditionnelle de la plante, soit la culture en bioréacteurs de tissus, de cellules ou d'organes provenant de ce végétal. La plupart de ces technologies mises en œuvre peuvent être exploitables aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau de la plante entière. La culture traditionnelle fera appel à la propagation végétative conforme de génotypes performants, la fixation de génotypes par haplo méthodes et l'augmentation de la variabilité par variations soma clonales, mutagenèse et hybridation somatique. L'emploi des technologies relevant du genie génétique impose nécessairement l'acquisition préalable d'une meilleure connaissance des principes actifs, des molécules concernées qu'ils contiennent, de leurs voies de biosynthèse et de leur déterminisme génétique (Bernarc et Hervé, 2010).

Cependant, toute analyse faite, la solution la plus élégante susceptible de résoudre au mieux les problèmes posés par la valorisation des plantes médicinales, s'avère être, la mise en œuvre de cultures expérimentales de cellules végétales in vitro, dans des bioréacteurs, et les processus de transformation qui leur sont associes. D'ores et déjà, selon les conditions employées, cette technologie s'avère produire une grande variété de substances utiles a l'homme. Leur application industrielle devient une réalité économique que les pays en développement sont capables d'assumer pleinement dans un très proche avenir.

En effet, le principal facteur limitant son transfert était le prix de revient des produits obtenus de la sorte. La mise au point et le perfectionnement de cette technologie.ont été si rapides que, dès maintenant, il est raisonnablement prévu que l'abaissement des coûts aura pour effet de rendre tout à fait rentable ce mode de production pour un nombre croissant de molé- cules utiles a l'homme. Ainsi, dans la littérature récente, il est possible de noter plusieurs exemples remarquables.

Les recherches sur la shikonine sont les plus caractéristiques. Cette molécule est utilisée pour ces propriétés bactéricides et anti-inflammatoires. Elle est extraite de la racine de *Lithospermum eryfhrorhyzon*. Sa teneur, relativement faible, n'excède guère 2 à 3% du poids de matière sèche, pour une plante âgée de 5 à 7annees. Or, actuellement, malgré les progrès considérables caractérisant la chimie fine et les processus de synthèse organique, on ne connaît aucune méthode permettant d'élaborer cette molécule. En 1984, ce produit se vendait 4500$ le kilogramme. A l'évidence, il était primordial de trouver une méthode biotechnologique permettant de la synthétiser et de la produire à moindre coût. Plusieurs équipes ont réussi à accroitre de 12 à 15% la production de cette molécule par des cultures de cellules isolées de cette plante. Les progrès aidant, après une phase de scaling up réussie, correspondant au passage du stade pilote au stade industriel de production a grande échelle, elle est désormais produite dans des réacteurs d'une capacité de plusieurs milliers de litres. Actuellement, la production de ces cultures de cellules optimisées de L. erythrorhyzon est de l'ordre de 60 mg par gramme de cellule et par semaine. Toute considération faite, en prenant en compte le facteur temps, cette productivité s'avère plus de 1 000 fois supérieure à celle des racines de la plante entière. L'emploi de ces techniques permet de résoudre en partie les difficultés liées à la production même de la matière végétale, source des produits ayant une valeur ajoutée accrue. II devient possible de se dégager des contraintes liées à la culture traditionnelle qu'elles soient d'ordre climatique, quantitatif OU qualitatif. Jusqu'à présent, même pour les espèces les plus utilisées, peu d'efforts ont été fournis pour l'amélioration variétale ou encore pour celle des pratiques culturales. Leur approvisionnement est souvent saisonnier et fort aléatoire, dépendant en partie des conditions climatiques (Bernarc et Hervé, 2010).

Par ailleurs, il faut tenir Compte de la grande hétérogénéité des teneurs en principes actifs souvent observée dans le matériel récolté. II est beaucoup espéré de l'amélioration variétale pour résoudre ce problème. Toutefois, il ne faut pas sous-estimer pour autant l'existence de tout un ensemble de problèmes liés à la présence de produits uniquement synthétisés par les cultures de cellules isolées ou encore l'impossibilité de produire le produit

espéré par ces technologies. Par ailleurs, il s'agit aussi de cultures à risque, sujettes à de brutales fluctuations du marché actuel. La biotechnologie de la cellule végétale emploie l'ensemble des méthodes qui utilisent les propriétés de la cellule végétale, provenant d'un matériel différencié ou non, les propriétés de la plus petite structure vivante capable de se reproduire de façon autonome.

De façon générale, dans ce type de technologie, il est nécessaire d'employer des cellules compétentes, des cellules rendues aptes à effectuer une activité donnée, la conversion d'une substance en un ou plusieurs produits, grâce aux enzymes qu'elles contiennent. Actuellement, c'est l'un des problèmes majeurs de la biologie cellulaire végétale qu'il faut résoudre au mieux. II s'agit de transformer une population de cellules totipotentes, des cellules non encore différenciées, capables de se multiplier, en une population de cellules différenciées, capables de synthétiser la molécule recherchée. Dès lors, il faut trouver les conditions qui permettront d'orienter la différentiation grâce à l'apport de facteurs de croissance dans le milieu de culture ou encore en modifiant le milieu extérieur (lumière, température, ...).

Dès lors, les cellules végétales auront acquis leurs fonctions et leurs caractéristiques, dont l'utilisation est envisagée à des fins industrielles, dans un bioréacteur, dans une enceinte ou sont mises en œuvre ces bioconversions. D'ou la nécessité, à court terme, de franchir tout un ensemble d'étapes, constituant un préalable indispensable avant toute application industrielle de cette technologie. Ainsi, dans un premier temps, il est procédé au criblage (screening) des espèces végétales tropicales offrant des possibilités intéressantes pour étudier l'une des trois voies essentielles de la synthèse de substances naturelles, utiles à l'homme : la voie mevalonique, la voie phenylpropanoïde et la synthèse des alcaloïdes. Parallèlement, il est réalise la sélection et le clonage rapide des espèces, des variétés pour les plantes entières et des souches pour les cellules isolées, s'avérant les plus performantes pour la production des substances recherchées (ciblées). Cela fait appel à l'ensemble des technologies employées par la génétique moderne mais aussi par la biologie moléculaire (Bernarc et Hervé, 2010).

A la limite, afin de renforcer l'efficacité des intervenants, pour accroitre le potentiel scientifique indispensable pour la réussite de ce type de recherche, il est souhaite la constitution de tout un réseau spécialisé dans ce domaine entre les différents centres de recherche situes dans la zone intertropicale et des structures de recherche spécialisées dans cette problématique. Tout naturellement, des relations privilégiées existent entre ce Laboratoire de biotechnologie végétale du Centre d'Adiopodoume et l'unité fonctionnelle Métabolisme et Physiologie cellulaire) du centre ORSTOM de Montpellier. Selon le directeur de ce dernier, l'une des préoccupations majeures de ce centre est de développer toute une

stratégie de recherche finalisée concernant différents aspects de la biotechnologie de la cellule végétale. Par essence, dans le cas qui nous concerne, il s'agit de recherches complémentaires concernant les mécanismes biochimiques et physiologiques de la production végétale. L'émergence d'une solution biotechnologique à un problème industriel résulte dans la plupart des cas d'une retombée de la recherche fondamentale, de la valorisation d'un produit de cette recherche.

C'est en s'assurant d'une meilleure connaissance du métabolisme de la cellule végétale, des mécanismes de sa régulation, qu'il sera possible dans un proche avenir de créer des bioréacteurs synthétisant les différentes molécules intéressant l'homme. Trop souvent, il est mis en exergue les vertus du génie génétique. Certes, c'est un outil extraordinaire. Mais, il faut se rappeler que cette technologie n'est qu'un outil qui ne peut être appliqué qu'à des problèmes concrets, dans un environnement bien déterminé, qui en conditionne l'expression. La plupart des échecs constatés indique que les conditions physiologiques sont souvent peu connues voire ignorées. Dès lors, il importe que ce type de travail, la valorisation des plantes médicinales par des méthodes modernes, comme celles décrites dans cet article, soit développe par des équipes multi-disciplinaires. Ces études font appel à deux types de compétences scientifiques : la biologie végétale pour l'amélioration de la matière première, et la chimie pour son évaluation, qui nécessite une meilleure connaissance de l'extraction, du dosage et de l'analyse des principes actifs. Cela implique une certaine réorganisation des efforts de recherche dans ce domaine.

Chapitre II : Généralités sur les composés phénoliques

Chapitre II : Généralités sur les composés phénoliques

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante: la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit: prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre: les métabolites secondaires (Kansole, 2009).

II-1- Définition et fonctions des métabolites secondaires

Chez les plantes, il existe un métabolisme secondaire, c'est une exclusivité du monde végétal. Ces produits, à structure chimique souvent complexe, sont très dispersés et très différents selon les espèces (Cuendet, 1999).

Le métabolisme secondaire, désignant un métabolisme dont la distribution taxonomique serait restreinte et dont la contribution au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes serait insignifiante (Gravot, 2008). Les métabolites secondaires ne sont pas vitaux pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important de part la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production. Ils ont des rôles écologiques (allomone, phéromone…). Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (Thomas, 2009). Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, et dans les relations entre les plantes et leur environnement : plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation (Gravot., 2008).

II-2- Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques (Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006). On distingue trois classes principales :

II-2-1- Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires (Lebham, 2005). Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures

phénoliques présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales: la voie shikimate et acétate (Lugasi et al, 2003).

L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (Bruneton, 1993).

Les composés phénoliques sont des molécules hydrosolubles présentes dans tous les végétaux. Ils ont divers effets sur la physiologie végétale de part leurs actions anti-bactériennes et anti-fongiques. Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes, etc…). Certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence (Adrian et Frangne, 1991; Milane, 2004).

Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant (Lebham, 2005).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. (Beta et al, 2005).

II-2-1-1- Classification des composés phénoliques

II-2-1-1-1- Les acides phénoliques

Ils ne possèdent pas de squelette flavane. Ils sont solubles dans l'éther. Ils peuvent être associés à la lignine, présents sous forme d'ester, ou bien localisés dans la partie de la feuille insoluble dans l'alcool (Barboni, 2006). Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes: anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, anti-radicalaires, cholagogues, hépato-protecteurs, cholérétiques, immunostimulants (Bruneton, 1999). On distingue: Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones). Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type C6-C3) (Barboni, 2006).

a- Les acides benzoïques

Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques, o-hydroxybenzoïques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques ont probablement une origine et des fonctions.

b- Les acides cinnamiques

Ces acides possèdent une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide fertarique et l'acide cinnamique (Ribereau, 1968).

II-2-1-1-2- les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provient du latin flavus signifiant jaune. La présence de flavonoïdes a été révélée dans le zeste du citron par les travaux du Hongrois Szent -Gyogyi en 1936 et 1937 sur le scorbut. Avant lui, la première substance flavonoïde obtenue à l'état pur: le morin, a été isolé par Chevreul en 1814. Le terme "flavonoïde" provient du nom flavedo correspondant à la couche externe des écorces d'orange. Ce terme désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Gérard, 2004) qui sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles (Riberau–Gayon, 1968).

Les flavonoïdes sont répandus dans toutes les parties de la plante: racines, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois. Certains sont plus spécifiques de certains tissus ; les anthocyanes sont plutôt localisées dans la partie externe des fruits, des fleurs et les cellules épidermiques; les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnement ultraviolet des fleurs. Les flavonoïdes sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées).

a. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont dérivés des phényles propanoides caractérisés par l'adjonction au noyau coumaryl en C6- C3 activé par le coenzyme A (Comaryl – CoA), 3 acétyles (fournis par le malonyl – CoA); réaction suivie d'une cyclisation qui aboutit à une chalcone, la tetrahydroxy-chalcone; l'enzyme est la chalcone synthase (CHS), les légumineuses possèdent en outre une chalcone réductase (CHR) qui co-agissent avec la CHS, peut aboutir à la trihydroxy chalcone (Heller et al., 1998).

La chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la biosynthèse des divers flavonoïdes, elle est en équilibre avec les flavonoïdes, cet équilibre étant contrôlé par une enzyme, la chalcone isomérase, conduisant à une cyclisation stéréospécifique du cycle donnant naissance aux flavanones (Bruneton, 1933). Les chalcones gardent la structure de tri ou tétra-stérols. Les flavonones dérivent des précédentes par une cyclisation du noyau central, conduisant à un hétérocycle, suite à une isomérisation par la chalcone isomérase (CHI) (Heller et al., 1998).

Les flavones, particulièrement abondantes chez les légumineuses (fabales) dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle. Les flavonols se différencient des flavones par la présence d'un OH en C3. Les isoflavones dérivent aussi des flavanones, mais après une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C2 au C4 de l'hétérocycle (Heller et al., 1998).

Les anthocyanes dérivent également des flavanones suite à une réduction par la flavone -3 hydroxylase (F3H) en dihydrokaempférol (un dihydroxyflavonol); une deuxième réduction est opérée par une dihydroflavonol réductase (DFR) (Heller et al.,1998).

b- Propriétés botaniques

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes, puis ils migrent et se dissolvent dans les vacuoles. Ils interviennent comme constituants des chromoplastes (Bruneton, 1933). La plante fabrique des flavonoïdes pour se protéger de l'oxydation et c'est le rayonnement solaire qui stimule cette réaction. Plus l'ensoleillement augmente, plus les teneurs en flavonoïdes augmentent, surtout dans les parties les plus exposées. Ils servent également à attirer l'attention des insectes pollinisateurs, ou au contraire à dessiner des formes pour éloigner les prédateurs, certains flavonoïdes sont mêmes toxiques pour les insectes (Site web 1)

c– Distribution et exemples de flavonoïdes

Les flavonoïdes sont généralement présents chez les végétaux supérieurs, le plus souvent sous la forme d'hétérosides (liés à différents sucres). Ils ont pu être isolés des fougères (la cytominétine) (Mazza, 2000), mais ils sont totalement absents des microorganismes comme les champignons et lichens (Ribireau-Gayon., 1968). Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement dans certains végétaux; on retrouvera par exemple, les isoflavones dans le soja, les flavanones dans les agrumes, les anthocyanes dans les fruits rouges, les flavonols dans les choux, les brocolis et les oignons. Ces derniers, ont la particularité de se polymériser en composées qu'on appelle des tannins et qui sont présent dans le vin et le thé.

Les flavonoïdes sont largement représentés dans la classe des aurantiacées (les agrumes), mais également dans les rutacées (tomate, sarrasin), les oléacées (cyprès, frêne), les conifères (épicéa, sapin), les ginkgoacées (ginkgobiloba), les théacées (théiers et camélias) et les vitacées (raisin), ainsi que dans les fines herbes. C'est par contre à des concentrations variables, que les substances utilisées comme principes actifs sont présent dans ces familles devégétaux (Fleuriet et al., 2005).

Les aliments les plus riches en flavonoïdes sont: le raisin, le thé, le cacao, l'oignon et les pommes. Les principaux flavonoïdes retrouvés dans le thé sont: la rubigine, la flavine et la catéchine, dont les propriétés antioxydantes sont 20 fois supérieures à celles de la vitamine C. L'artichaut est le seul dépositaire d'un groupe appelé Silymarine. Le soja est riche en isoflavones (génistéine et diazéine) (Heller, 1998). Quatre flavonols sont majoritairement présents chez le raisin: le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine. Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants, alors que la myricétine semble être spécifique aux variétés de raisins rouges. On retrouve également de fortes concentrations de flavonoides dans l'hamamélis (kaempférol, quercétine), le céleri (apioside), et dans le chocolat (catéchine) (Heller, 1998).

d- Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques, certaines établies depuis longtemps (2000 ans), par leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques multiples, dans cette partie on va citer certaines actions de flavonoïdes.

- **Action antioxydante**

Les antioxydants sont largement utilisés dans la prévention primaire et secondaire, les plus connus sont le β-carotène, l'acide ascorbique, le tocophérol, lestanins, lesanthocyanes, les acides phénoliques, le lycopène et les polyphénols (Bjelakoyic et al., 2007). Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres générés par notre organisme en réponse aux agressions de l'environnement (cigarette, polluants, infectieux, etc.) qui favorisent le vieillissement cellulaire. Les antioxydants renforcent nos défenses naturelles en protégent les constituants tissulaires. La Silymarine, le composant majeur des flavonoïdes de S. marianum possède de puissantes propriétés anti radicalaires, empêchant ainsi certains produits toxiques de causer des lésions au foie (Ody, 2000). Elle est plusieurs fois plus puissante que la Vitamine E (Hikino et al., 1984 ; Sarre, 1971).

- **Protection vasculaire**

Les flavonoïdes sont «veino-actif» c'est-à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance; une étude menée aux Pays Bas (l'étude Zutphen) à mis en évidence le fait que les personnes chez qui l'on a donné une dose importante de flavonoides sont moins exposées aux maladies cardiaques que les autres (Hertog et al., 1995). Grâce à l'effet synergique des flavonoïdes, de nombreuses plantes sont maintenant classées dans la catégorie des protecteurs vasculaires (Rice et al.,

1996). C'est ainsi que l'on classe les flavonoïdes de raisins dans cette catégorie (Fleuriet et al., 2005).

- **Flavonoïdes et ménopause**

Les flavonoïdes ont également des effets protecteurs contre les maladies hormono-dépendantes. En effet, les isoflavones du soja par exemple, interagissent de manière spécifique avec les récepteurs des oestrogènes et inhibent les bouffées de chaleur chez la femme ménopausée, pour cela, ils sont maintenant considérés comme phyto-œstrogènes. La quercétine de l'oignon et le kaempferol de la chicorée, possèdent de leur côté des propriétés pseudo-oestrogéniques qui inhibent la perte osseuse chez la rate ovariectomisée. De nouvelles études restent cependant nécessaires pour valider ces effets sur l'être humain (Fleuriet et al., 2005).

- **Effet contre le cancer**

Les flavonoïdes ont pour effet d'inhiber l'activité d'une enzyme, la topoisomérase II, qui joue un rôle essentiel dans l'apparition du cancer, notamment la maladie de Hodgkin. Ils ont largement montré leurs effets protecteurs contre plusieurs cancers, dont la prostate, le colon et le poumon (Rice et al., 1996).

Par ailleurs, la Silymarine, fraction principale des flavonoïdes de *Silybum marianum*, a la capacité de bloquer la fibrose, un processus qui contribue au développement de la cirrhose chez des personnes ayant une inflammation du foie consécutive à une maladie, a un abus d'alcool ou à une hépatite et favorise l'écoulement de la bile (Ferenci et al.,1989; Alarcon, 1995). Les flavonoïdes de raisins permettent la prévention et le traitement des cancers; ils ont également des activités anti-tumorales et chimiopréventives (Site web 2).

- **Action anti-inflammatoire**

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols du cacao, peuvent prévenir la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils éliminent la synthèse de l'oxyde nitrique, déclencheur chimique de l'inflammation. Il a été également démontré que d'autres flavonoïdes inhibaient la sécrétion des mastocytes impliqués dans les phénomènes inflammatoires (Fleuriet et al., 2005), cette activité concerne de nombreux composés phénoliques et en premier lieu l'acide salicylique sous sa forme acétylé (acétyl salycilique) commercialisée sous le nom d'aspirine. Ainsi que certaines anthocyanes, la cyanidine extraits de cerises, les flavonoïdes des agrumes (Manthey, 2000).

- **Action antidiabétique**

En raison de ses propriétés antioxydantes et de son log passé d'utilisation dans le traitement des désordres hépatiques, la silymarine est utilisé pour décliner la glycémie chez des diabétiques, Une équipe de chercheurs de l'hôpital Oronfalcone à Gorizia en Italie à traité 60 patient diabétiques quotidiennes pendant 12 mois avec 600 mg de silymarine ou un placebo (Anonyme, 1997). D'autres études cliniques ont montrés également l'efficacité de la silymarine dans la régulation de la glycémie sanguine, qui descend d'une moyenne de 190 mg/dl à 174 mg/dl. Bien qu'une telle diminution des niveaux sanguins de sucre puisse augmenter le risque d'hypoglycémie. Les patients traités par la silymarine n'ont pas eu d'augmentation du nombre d'épisodes légers ou sévères d'hypoglycémie, suggérant que la silymarine stabilise la glycémie en même temps qu'elles à diminue (Nutranews, 2003).

- **Action anti-infectieuse**

Les flavonoïdes accélèrent le processus de destruction des agents pathogènes en améliorant la capacité des macrophages à les neutraliser. La transformation des macrophages en antigène est donc plus rapide et les lymphocytes-T peuvent intervenir avec plus d'efficacité (Fleuriet et al., 2005).

- **Effet sur la peau**

Des composés extraits de myrtilles ou des épinards amélioreraient la signalisation des messages nerveux et pourraient ralentir le processus de vieillissement (Rice et al., 1996 ; Martini, 2006), les polyphénols participent à la lutte contre le vieillissement cutané en tant que molécules antiradicalaires ou en tant que protecteurs de protéines de dégradation des protéines de structure de la peau comme l'élastine et le collagène (Closs, 2002). Par ailleurs, une étude préliminaire sur l'utilisation d'extraits de plantes comme filtres UV a démontré que l'incorporation de flavonoïdes à une solution à 2% de filtre solaire synthétique, augmente sensiblement l'indice de protection de celui-ci (Ramos et al., 1996).

II-2-1-1-2-1- Autres utilisation de flavonoïdes

a- Edulcorant

Un puissant édulcorant, la néohespéridine dihydrochalcone (E958) est utilisé en alimentation pour les boissons non alcoolisées. Cet édulcorant est synthétisé à partir d'un flavonoïde particulier: la néohéspéridoside (molécule naturelle amère). (Site web 1).

b- Engrais

Le généticien Don Smith a associé les flavonoïdes à un cocktail de bactéries fixatrices d'azote. Le résultat a été concluant: la récolte a augmenté d'au moins 10%.) (Site web 1)

Parmi les nombreux pigments dérivants de cette structure, il convient de citer notamment:

- **Les flavanones** : Ces composés ne comportent pas des groupements OH en position 3, et présentent de fortes similitudes de structures avec les flavonols. Dans cette catégorie, il faut ranger les flavonoides responsables de la saveur amère de certaines pamplemousses, citrons, orange: la naringine (naringénol lié à du glucose et du rhamnose), l'hespéridine (Alais et Linden, 1997).

II-2-1-1-3- Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec anthos, fleur et Kuanos, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des bais rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplis d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont du aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (Bassas et al, 2007).

• Structures

Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C 3. 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 (Bessas et al., 2007).

II-2-1-1-4- Les isoprénoïdes (Terpénoïdes)

Les isoprénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes.

De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le

caoutchouc. Cette voie de biosynthèse donne naissance à de très nombreux métabolites secondaires, mais participe également à la synthèse de composés comme le β-carotène, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire (Bruneton, 1999; Harbone, 1998).

II-2-1-1-5- Les coumarines:

Les coumarines sont parmi les composes phénoliques les plus connus (Figure 8). Elles sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone, est le précurseur des coumarines 6,7-di-et 6, 7,8-trihydroxylées.

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles (Igor, 2002). Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (Gonzalez et Estevez-Braun, 1997).

II-2-1-1-6- Les quinones

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides (Kansole, 2009).

II-2-1-1-7- Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation (Hemingway, 1992).

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Cavin, 1999).

Les tanins sont divisés en deux groupes:

Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères). Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.

a- Les tanins condensés (flavan-3-ols)

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidine, sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ces tanins 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 (Guigniard, 1996).

• Structure

La structure complexe des tanins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétrique C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées) (Bessas et al, 2007).

b- Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acide phénols, ou de dérivés d'acides phénols; la molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (Guigniard, 1996).

• Structure

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbones à carbone entre noyaux (liaisons biphényle réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins éllagiques (Bessas et al, 2007).

II-3-Propriétés pharmacologiques des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques gastro-intestinales, antioxydantes (Harborne, 1998; Bruneton, 1999).

Parmi les principaux métabolites secondaires, on peut citer les flavonoïdes qui sont des composés qui possèdent de fortes propriétés anti-oxydantes (Rice-Evans, 1995). Ils sont synthétisés par les plantes lors de l'invasion microbienne (Dixon et al, 1983), il est par conséquent logique, qu'ils agissent comme substances antimicrobiennes efficaces in vitro contre les microorganismes (Cowan, 1999; Recio et al, 1989).

Les flavononeset les et les flavonols représentent environ 80% des flavonoïdes connus. La principale activité attribuée à ces composés est une propriété vitaminique P veino- active. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance. Souvent anti-inflammatoires, ils peuvent être antiallergiques, hépato-protecteurs, antispasmodiques, diurétiques, antibactériens, antiviraux (Bruneton, 1999).

Les isoflavones sont des flavonoïdes dont leurs distribution est restreinte, ce sont des phytoalexines (substances produites par la plante en réponse à une infection par un agent pathogène; champignon par exemple). Ce sont donc des produits de défense naturelle, de puissants oestrogènes, insecticides, antitumoraux, réducteurs des manifestations de la ménopause (bouffée de chaleur) (Kansole, 2009).

Les flavones et les anthocyanes augmentent la réponse à la lumière visible de forte intensité. Ils sont probablement synthétisés par les végétaux dans le but d'atténuer l'intensité de la lumière qui atteint les cellules photosynthétiques. Ce sont néanmoins les radiations UV qui induisent la synthèse des flavonoïdes (Lois, 1994).

Les anthocyanes ont des propriétés pharmacologiques très proches de celle des flavonoides vu leurs structures très semblable. L'effet antioxydant des anthocyanes est expliqué en partie par piégeage des radicaux libres et la chélation des métaux. Les anthocyanes inhibent les enzymes protéolytiques de dégradation du collagène (élastase, collagénase), ce qui explique leurs propriétés vasoprotectrices et anti-oedémateuse. Il s'agit, en outre, de composés veino-actifs doués d'une propriété vitaminique P (Bruneton, 1999).

Les acides phénols sont des dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Ils sont antiinflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants (Bruneton, 1999).

Les coumarines connues pour ses propriétés anti-oedémateuses, a fait l'objet d'études cliniques chez les patients atteints de cancers avancés car elle est rapidement métabolisée au niveau du foie en 7-hydroxycoumarine (Fujioka et al, 1999). Il n'est pas exclu que les propriétés anti inflammatoires et analgésiques attribués au frêne soient dues aux coumarines (Chen et al, 1995 ; Garcia-Agaezet al, 2000). L'action commune des coumarines de différente origine est celle contre les différents types de troubles gastriques (Resch et al, 1998) antivirale (Yoshikawa et al, 1994) antimicrobienne (Kayser et Kolodziej, 1997).

Les tanins sont des substances d'origine organique que l'on trouve dans pratiquement tous les végétaux, et dans toutes leurs parties (écorces, racines, feuilles, etc.), caractérisées par leur astringence. Ils ont la propriété de précipiter les protéines (fongiques ou virales) et les

métaux lourds. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides (Kansole, 2009).

Les effets thérapeutiques des alcaloïdes sont nombreux et peuvent être aussi des poisons mortels. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine, scopolamine) ou comme stimulants (caféine, strychnine,…). Au niveau du système nerveux autonome comme sympathomimétiques (éphédrine), anticholinergiques (atropine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antipaludiques (quinine) (Kansole, 2009).

Les corps terpéniques (le terpène se trouve dans le menthol, le camphre etc.…) eux même forment la base des stéroïdes qu'on retrouve dans de nombreuses vitamines. Ils sont connus par leurs activités cytostatiques, insecticides, anti-inflammatoires, molluscicides et analgésiques (Bruneton, 1999).

Chapitre III:

Aperçu sur Les antioxydants

Chapitre III : Aperçu sur Les antioxydants

III-1- Les radicaux libres et le stress oxydant

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques: les radicaux libres organiques (Lesgards, 2000). Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. Par exemple, lors de la respiration cellulaire, l'oxygène moléculaire se transforme en diverses substances oxygénées, communément appelées radicaux libres de l'oxygène ou espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species:ROS) (Gutteridge, 1993).

Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces espèces (Gutteridge, 1993). Ce déséquilibre est à l'origine de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac et l'exercice excessif sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (Favier, 2003). En raison de leur capacité à endommager les cellules, les tissus et les organes, les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans un grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (Gutteridge, 1993).

III-2- Les radicaux libres dans les systèmes biologiques

Parmi toutes les espèces susceptibles de se produire dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tel l'anion superoxyde O2●羊 et le radical hydroxyle OH●, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO●. D'autres espèces dérivées de l'oxygène tel que l'oxygène singulet 1O2, le peroxyde d'hydrogène (H2O2) ou le nitroperoxyde (ONOOH) peuvent être des précurseurs de

radicaux libres. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

Les radicaux libres sont principalement produits par des sources endogènes, telles que les chaines de transport d'électron, les peroxysomes et le système de cytochrome P-450. Ces radicaux sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire qui est à la base de certaines maladies comme l'athérosclérose, le cancer, maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Favier, 2003).

III-3-Les antioxydants

De nombreuses espèces oxydantes sont produites et bien qu'elles soient souvent indispensables à l'organisme, elles ne sont pas moins responsables de dégâts importants. Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défenses que l'on qualifie d'antioxydants. Mais bien que le terme « antioxydant » soit fréquemment utilisé, il est difficilement définissable car il couvre un large nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique, l'industrie pharmaceutique (Halliwell et Gutteridge, 1999). Un antioxydant est toute substance, présente à une concentration inférieure à celle du substrat oxydable, qui est capable de retarder ou de prévenir l'oxydation de ce substrat. (Halliwell et Gutteridge, 1999). Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres tels les vitamines et poly phénols, doivent être apportés par notre alimentation. (Pincemail et Defraigne, 2004). La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique.

III-3-1-Classification des antioxydants par rapport à leur mécanisme d'action

Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés. En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (Gardès-Albert, 2003).

- ***Groupe I***

Plusieurs noms ont été attribués à ce groupe par exemple, antioxydants primaires, chain breaking, piégeur des radicaux libres. Ce genre d'antioxydants peut inhiber la réaction d'initiation et la propagation de l'oxydation en participant au processus d'oxydation et en convertissant les radicaux libres vers leurs formes inactives. Les antioxydants primaires sont

généralement des composés phénoliques (AH) capables de donner un atome d'hydrogène au radical libre et le convertir en un composé stable non radicalaire. Les antioxydants de ce groupe réagissent de façon prédominante avec les radicaux peroxylés, pour deux raisons : la concentration élevée de ces radicaux et la faible énergie du groupement (ROO·), en comparaison avec les autres radicaux comme le (RO·) et la faible concentration du piégeur du radical libre dans l'aliment. Un piégeur du radical libre, même à des concentrations faibles, entre en compétition avec les lipides pour rendre le radical libre inactif par l'intermédiaire d'une réaction de libération d'un électron, suivie d'une déprotonation (Frankel et al, 2000; Huang et al, 2005).

- ***Groupe II***

Les composés de ce groupe sont catalogués comme préventifs ou antioxydants secondaires. Ils englobent une large gamme de différentes substances chimiques qui inhibent l'oxydation des lipides par différents mécanismes et ne transfèrent pas le radical libre sous sa forme non-radicalaire. Avec quelques exceptions, les antioxydants secondaires sont généralement reliés à l'inhibition de facteurs initiant l'oxydation. Le groupe II inclut : des chélateurs de métaux pro-oxydatifs, des désactivateurs de l'oxygène singulet, des piégeurs de la molécule d'oxygène, inhibiteurs des enzymes pro-oxydative, enzymes antioxydantes et destructeurs des hydroperoxides. Parfois, quelques antioxydants peuvent exercer plusieurs fonctions anti-oxydatives, par exemple, l'acide ascorbique peut être un piégeur du radical libre, désactivateur des oxygènes singulets dans une solution aqueuse et effectivement régénérer du tocophérol. Plusieurs flavonoïdes sont des piégeurs de radicaux libres et chélateurs de métaux (Miller et al, 1996).

III-3-2- Classification des antioxydants suivant la nature chimique

Plusieurs antioxydants synthétiques et quelques composés naturels (tocophérol, acide ascorbique, Béta-carotène) sont officiellement autorisés pour l'utilisation dans l'alimentation. Leur présence s'avère également nécessaire au sein des produits pharmaceutiques et de cosmétiques afin d'éviter leur dégradation. Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger (Barlow, 1990; Evans et al, 1992). La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques. Dans la littérature, des milliers de publications ayant pour sujet les antioxydants naturels ainsi que leur effet sur l'organisme humain peuvent être consultées (Namiki, 1990; Wanasundara et al, 1994; Larson, 1997; Pietta, 2000; Moure et al, 2001).

III-3-2-1- Les antioxydants naturels

L'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, de deux types : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non enzymatiques. Ces antioxydants sont d'autant plus importants que certains peuvent être utilisés en thérapeutique pour tenter de prévenir le stress oxydatif (Diplock, 1991).

III-3-2-1-1-Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (La superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS.

a) Les superoxydes dismutases (SOD)

La famille des superoxydes dismutases comporte trois isoformes (SOD1, SOD2, SOD3) dont le rôle est la dismutation de deux anions superoxyde en espèces oxygénées moins réactives que sont H2O2 et O2 (Antwerpen, 2006). L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et à un moindre degré en zinc (Goudable et Favier, 1997).

b) Les catalases

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène H2O2 en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elles sont localisées surtout dans les peroxysomes. Elles n'éliminent pas la totalité du peroxyde d'hydrogène, mais leur rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux (Lindau-Sehpard et Shaffer, 1993).

c) Les glutathions peroxydases et réductases (GSHPX)

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. Le rôle de la glutathion peroxydase (GPx) est de réduire d' une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d' autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction, qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celles-ci se transforment en glutathion-disulfure (GSSG) (Marfak, 2003):

La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG. Au cours de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur, le NADPH : Cette réaction produit du NADP+ qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, le G6PD (glucose-6-phosphate-déshydrogénase) :

III-3-2-1-2 Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), les vitamines E et C et les polyphénols.

a) La vitamine E

La vitamine E désigne un groupe de nombreux composants présents dans la nature : les α-, β-, γ- et δ-tocophérols et tocotriénols (Ohrvall et al, 1996). Elle intervient directement au niveau des membranes biologiques où elle piège les radicaux libres avant qu'ils n'atteignent leurs cibles (Goussard, 1999). La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. (Figure 3) (Evans, 2002 ; Packer et al, 1997).

b) La vitamine C (acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique est l'antioxydant hydrosoluble majeur (Curtay et Robin, 2000). Elle se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l'O2•- et l'OH•. Elle peut aussi réduire le radical α-tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Figure 4) (Evans, 2002 ; Packer et al, 1997).

c) La β-carotène

La β-carotène est apporté par l'alimentation. Elle est douée de plusieurs capacités : elle est précurseur de la vitamine A, elle capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et, avec les autres caroténoïdes, elle a le pouvoir de terminer les réactions en chaine de lipoperoxydation. Elle protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante : elle s'oppose à la génotoxicité de nombreux agents (Allard et al, 1994). La présence de nombreuses doubles liaisons au sein de leurs structures en fait des antioxydants reconnus, notamment par leur effet protecteur vis- à- vis des radiations solaires (UVA) (Biesalski et al, 1996).

d) Glutathion

Le glutathion joue un rôle majeur dans la protection des lipides, des protéines et des acides nucléiques contre l'oxydation. (Stamler et Slivka, 1996). En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de coenzyme des GSHPX. Il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante tels que la vitamine C ou la vitamine E. (Gerard- Monnier et Chaudière, 1996).

e) Les oligoéléments

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium (Garait, 2006).

f) Les composés phénoliques issus des végétaux

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires (Rock., 2003). Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tanins (Boizot et Charpentier, 2006).

III-3-2-2- Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée (PG) et le tétra-butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Lisu et al, 2003). Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu et al, 2000). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques (Barlow, 1990). Le BHT présenterait des effets carcinogènes chez le rat (Ito et al, 1985).

III-4-Evaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant sont nombreuses et peuvent être qualitatives ou quantitatives. La méthode qualitatives, utilisée pour repérer l' activité antioxydant de Composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés (Li et al, 1999).

D'autres méthodes, moins pratiques, nécessitent la pulvérisation successive de deux solutions différentes. Une méthode à phase reversée de la chromatographie (CCM), combinée avec la détection visuelle pour l'évaluation de l'activité de balayage de radical libre des fractions antioxydantes en employant le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH) (Maamri., 2008).

En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. La génération de radical libre est directement reliée avec l'oxydation dans les nourritures et les systèmes biologiques. Les méthodes principales comportent le balayage des radicaux de superoxyde (O2); le balayage de peroxyle d'hydrogène (H2O2); le balayage d'acide hypochloreux (HOCl); le balayage du radical d'hydroxyle (OH) ou le balayage du radical de peroxyle (ROO) (Maamri, 2008).

La plupart des méthodes sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition" dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure de pouvoir antioxydant (Belkheiri, 2010).

Les antioxydants peuvent réagir à différentes étapes du procédé d'oxydation et ils peuvent avoir plus d'un mécanisme d'action, ce qui ne facilite pas leur classification (Frankel et Meyer, 2000).

Selon Huang et al, (2005), les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante in vitro peuvent être divisées en deux grandes catégories suivant les réactions mises en jeu: Les tests

basés sur le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT, Hydrogen Atom Transfer), dans lequel l'antioxydant et le substrat sont en compétition pour les radicaux peroxyles ROO●:

ROO● + AH ROOH + A● ROO● + LH ROOH + L●

Les tests basés sur le transfert d'un électron (SET, Single Electron Transfer), dans le cadre desquels on mesure la capacité d'un antioxydant à réduire un oxydant, qui change de couleur quand il est réduit : M(n) + e- (de AH) AH●+ + M (n-1)

Il existe de nombreuses méthodes de mesure de l'activité antioxydante (Diouf et al, 2006).

III-4-1 Méthodes de piégeage des radicaux libres oxygénés

III-4-1-1- Pièrgeage du radical superoxyde (O2•-)

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capturer un radical libre, l'anion superoxyde O2-•. Ce radical est généré in vitro par le système hypoxanthine/xanthine oxydase. Dans cette méthode, le radical réduit le NBT2+ (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm. Ainsi un composé anti-oxydant capable de capturer l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de la réduction du NBT2+ par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé anti-oxydant. On peut ensuite tracer une courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en composé testé, et déterminer la CI50 (concentration inhibant 50% de l'activité) du composé (Parejo et al, 2002).

III-4-1-2- Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H2O2 scavenging activity)

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de H2O2 diminue par les composés piégeurs la valeur d'absorbance de ce dernier à 230nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche (Malgalhaes et al, 2008).

III-4-1-3- Piégeage du radical hydroxyle (HO●)

La capacité des substances à piéger le radical hydroxyle est souvent évaluée par le pourcentage d'inhibition de la réaction du radical OH• avec une molécule détectrice. (Clement et Armstrong, 1972). Les molécules détectrices utilisées dans la littérature, sont nombreuses. On peut citer le désoxyribose (Halliwell et al, 1987), la dopamine (Slivka et Cohen, 1985), la thymine (Hicks et Gebick, 1986), la 4- nitrosodiméthylaniline (Kraljic et

Yrumbore, 1965), etc... Le radical hydroxyle est produit par réaction entre le fer (Fe2+/ EDTA) et le peroxyde d'hydrogène (H2O2) en présence d'acide ascorbique. Le désoxyribose, par action du radical hydroxyle, va être dégradé en malondialdéhyde (MDA) (Cheeseman et al, 1988) dont l'apparition est suivie par réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA). Le produit ainsi formé est détectable par une mesure d'absorbance à 532 nm. La capture du radical (HO●) par la substance à étudier, se fait par compétition avec le désoxyribose. Ainsi une diminution de la quantité du chromogène formé est observée se traduisant par une diminution de l'absorbance (Read et Randat, 1988).

III-4-1-4- Piégeage du radical peroxyle (ROO●)

La mesure de l'ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity) développée par Cao et al, 1993 est une méthode simple et reproductible permettant d ' évaluer la capacité antioxydante de différentes molécules (Benderitter et al, 2003). La β-PE (Porphyridium cruentum β Phycoerythrin ou Phycoérythrine) est une protéine fluorescente extrêmement sensible au stress oxydatif. En présence d'AAPH [(2,2'-azobis(2-amidinopropane)dichloride], un donneur du radical peroxyl, la structure tétramérique de la β-PE est modifiée, elle se dimérise. Cette dimérisation dépendante de la concentration en radicaux peroxyles du milieu réactionnel peut être suivie en mesurant la décroissance de la fluorescence de la β- PE en fonction du temps. Cette cinétique de décroissance de la fluorescence est directement reliée à la concentration de radicaux libres présents dans le volume réactionnel dans ces conditions définies de temps et de concentrations de la β-PE est d'AAPH.

III-4-2- Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction

III-4-2-1- Pièggeage du radical 2,2-diphényl-1picrylhydrazyl (DPPH●)

Le composé chimique 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (α,α-diphenyl-β- picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure- activité antioxydant des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams et al, 1995). La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence des extraits phénoliques. Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres independamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits (Molyneuxs, 2004).

III-4-2-2- Pièggeage du ABTS (2,2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid])

Dans la méthode TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), l'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS•+, obtenu à partir de l'ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline- 6-sulfonique)) comparativement à un antioxydant de référence : le Trolox® (acide 6- hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme de peroxydation (peroxydase metmyoglobine (Miller et Rice-Evans, 1997) ou horseradish peroxidase) (Arnao et al., 2001) en présence de H2O2 ou d'un oxydant (dioxyde de manganèse (Benavente-Garcia, 2000 ; Miller et al, 1996) ou persulfate de potassium (Re et al, 1999). Le radical ABTS•+, en contact avec un donneur de H• conduit à l'ABTS+ et à la décoloration à 734 nm de la solution (Lien et al, 1999).

D'autres auteurs utilisent l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ou ABTS•-, à la place de son sel d'ammonium et analysent l'inhibition du radical ABTS•-, produit par un initiateur de radicaux thermolabiles, l'ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopropane)HCl) (Van Den Berg et al, 2000). La cinétique de réaction de l'antioxydant étudié doit être examinée préalablement pour déterminer la fin de réaction. La capacité antioxydante en équivalent Trolox® (TEAC) correspond à la concentration (mmole/l ou mg/l) de Trolox® ayant la même activité qu'une même concentration unitaire de substance à tester, jus de fruit par exemple (Miller et Rice-Evans, 1997).

III-4-2-3- Réduction de fer: FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

Comme son nom l'indique, cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique (Fe3+) en fer ferreux (Fe2+). En effet le Fe3+ participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le Fe2+ à un pH faible forme un complexe avec la 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue qui a une absorption maximale à 594 nm. Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant.

Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 594 nm du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en Fe2+ (Benzieet et Strain, 1996 ; Pulido et al, 2000). Ce test nous servira à évaluer l'activité anti-oxydante des composés purs uniquement.

III-4-3- Activité antioxydante par la méthode de décoloration du béta-carotène (β-carotene bleaching method)

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco (1968), puis légèrement modifiée par Miller (1971). Elle consiste à mesurer, à 470

nm, la décoloration du β-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs (Von Gadow et al, 1997) ou sous forme d'extraits végétaux (Moure et al, 2000 ; Koleva et al, 2001) induit un retard de la cinétique de décoloration du β-carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. Elle présente également l'avantage de pouvoir être couplée à la chromatographie sur couche mince (Pratt et Miller, 1984). Après séparation chromatographique, un mélange de β-carotène et d'acide linoléique est pulvérisé sur la plaque, celle-ci étant alors exposée plusieurs heures à la lumière du jour ou aux UV jusqu'à décoloration du fond jaune. Les bandes où la couleur jaune persiste, indiquent la présence de substances antioxydantes.

Cependant, l'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée et donc non spécifique, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats. Pour contourner ce problème, certains auteurs ont remplacé la chaleur par des agents oxydants conduisant à des résultats plus reproductibles, comme l'AAPH (Parejo et al, 2003) ou la lipoxygénase de soja (Chaillou et Nazareno, 2006). Cette méthode est d'autre part sujette au parasitage de composés absorbants dans la fenêtre spectrale du β-carotène. Frankel (1998) a également critiqué l'utilisation d'acides gras libres qui ne représentent pas des modèles lipidiques réalistes. Enfin, l'interprétation des données n'est pas aisée car le β-carotène est lui-même un antioxydant, sensible à l'oxygène de surcroît.

Chapitre IV :
État de connaissance sur le genre Arbutus unedo L

Chapitre IV : état de connaissance sur le genre Arbutus unedo L.

Les Ericacées sont des plantes qui sont répandues dans le monde entier, mais qui se localisent surtout dans les régions tempérées ou froides, voir même les hautes montagnes. Elles sont toutefois absentes de la majeure partie de l'Australie et d'autres contrées de l'hémisphère sud, où elle est remplacée par la famille voisine des Epacridaceae.

La répartition de certains genres est intéressante. Les deux genres les plus grands, Rhododendron et Erica, montrent des concentrations d'espèces remarquables dans des aires relativement réduites. Plus de la moitié des Rhododendron, c'est à dire plus de 500 espèces, sont réparties dans la région limitée par la Chine, le Tibet, la Birmanie et l'Assam, la région où les grands fleuves de l'est de l'Asie se fraient un passage à travers l'Himalaya. Une autre bonne partie de ce genre est localisé en Nouvelle-Guinée. Le reste des espèces se rencontrent en l'Himalaya, au Japon, et pour un petit nombre, en Europe, au sud de l'Asie et aux Etats-Unis.

Erica possède une répartition encore plus remarquablement concentrée avec presque toutes les espèces dans le sud de l'Afrique, limitées pour la plupart à la région du Cap, riche de plus de 600 espèces. Les autres se trouvent dans le reste de l'Afrique, en région méditerranéenne et dans le sud et l'ouest de l'Europe. Gaultheria a une distribution aussi intéressante par le fait qu'elle entoure presque complètement l'océan Pacifique.

De telles distributions sont un véritable défi pour les biogéographes et les spécialistes de l'évolution, et aucune explication acceptable n'a été fournie à ce jour.

La famille des Éricacées comprend 87 genres et 1500 espèces, distribuées dans toutes les latitudes, réunis dans des formations végétales très caractéristiques. Le genre *Arbutus* comprend 12 espèces distribuées dans le Sud Ouest et le Sud Est de l'Europe; l'Asie occidentale, l'Afrique du Nord; Canada et le Nord occidentale de l'Amérique. Il faut signaler l'existence d'un hybride entre *A. unedo* et *A. andrachne* (Scortichini, 1986).

IV-1- Intérêts

Parmi les Éricacées, beaucoup sont des arbustes d'ornement fréquemment cultivés en jardin. Le genre Rhododendron est le plus important, et leurs fleurs sont souvent magnifiques. Il en existe environ 600 cultivars différents. Erica est également très utilisée en horticulture. De nombreux autres genres sont aussi plantés.

Les baies de l'*Arbutus unedo* L., espèces méditerranéenne, sont souvent consommées. Le *Vaccinium myrtillus* fournit des baies noir bleuâtres, sucrées, les myrtilles, dont on fait des

confitures. *Vaccinium oxycoccos* et *V. vitis-idaea* fournissent respectivement les canneberges et les airelles. En Amérique du nord, les espèces *Vaccinium macrocarpon*, *V. corymbosum* et *V. australe* sont cultivées pour leurs fruits.

Mais presque toutes les espèces sont toxiques pour l'homme. Cette toxicité est principalement due à l'andromedotoxine, contenue dans les feuilles, les bourgeons, les fleurs et le nectar. Il est arrivé que du miel produit à proximité d'énormes colonies de Rhododendron soit toxique, mais ce miel est si amer, qu'il n'est guère difficile de ne pas le consommer. Les Kalmia sont connues pour intoxiquer et tuer les moutons dans diverses régions des Etats-Unis. Le bois de certaines espèces est localement utilisé, particulièrement dans l'Himalaya (Site web 2).

Arbutus unedo L. se développe dans des zones qui conservent encore une assez bonne fertilité du sol, abonde sous climat non continental; cette espèce est typique d'un stade de dégradation des groupements de l'étage de végétation du subhumide et du semi-aride supérieur essentiellement. Très commune dans tous les groupements de chêne zeen, de chêne vert et même de pin d'Alep et de thuya dans des conditions caractérisées par une fraîcheur. Prospère sur sol acide avec *Cistus ladaniferus*, est présente également dans les formations basses les mieux conservées, elle accompagne le lentisque et la filaire. Quand elle évolue sur sol édifié sur roche calcaire cela signifie que les horizons superficiels sont décarbonatés. Sur certaines zones dégradées, l'arbousier, commun par sa présence, indique que cette dégradation est récente et les possibilités d'évolution sont encore présentes car les potentialités du milieu sont appréciables (Benabdeli, 1996).

C'est une espèce indicatrice de zone où le sol conserve encore une fertilité, par l'importante matière organique qu'elle donne au sol elle participe à ces qualités. Limitée dans l'espace puisqu'elle a des exigences particulières cette espèce arrive malgré les pressions à se maintenir et participe activement (coefficient d'abondance-dominance supérieur à 2.1) à la composition floristique des formations végétales. Sa faculté de rejeter et de coloniser l'espace libre disponible en sous-bois contribue à conforter cette espèce dans le rôle déterminant qu'elle joue au niveau de toutes les formations végétales et des espèces secondaires. Protégée, elle peut participer à la constitution d'une strate arborescente avec les autres espèces significatives tel que le chêne vert, le chêne liège et le chêne zeen (Benabdeli, 1996).

L'importance du sous-bois doit être réhabilité dans tous les reboisements, il serait plus intéressant de préparer la plantation de l'espèce principale par l'introduction d'espèces secondaires qui offrent beaucoup plus de chance et de faculté de réussite aboutissant à la création d'un microclimat recherché par les jeunes plants.

IV-2- Identification botanique de l'espèce végétale étudiée :

Arbutus unedo L., l'arbousier appartient à la famille des éricacées, est un arbuste toujours vert (Figure 1), originaire de la région méditerranéenne.

Figure 1: *Arbutus unedo* L. (Oliveira, 2010).

En Europe, pousse surtout dans le bassin méditerranéen (Portugal, Espagne, France, Italie, Albanie, la Grèce, la Bosnie-et-Herzégovine, Croatie, Macédoine, Monténégro, Serbie et Slovénie), y compris la partie des îles de la Méditerranée (Baléares, Corse, Sardaigne, Sicile et la Crète), principalement dans les zones côtières et intérieures où le climat est adéquat pour son développement. Il a également été en mesure de s'adapter aux conditions de la côte sud-ouest de l'Irlande (Torres et *al.,* 2002) (Figure 2).

Figure 2: Carte de répartition approximative d'*Arbutus unedo* L. dans la région méditerranéenne. (Oliveira, 2010).

IV-2-1- Description botanique

L'arbousier est un petit arbre à feuillage persistant, d'une hauteur comprise entre 2 et 10 mètres en moyenne (Figure 3). Le tronc et les branches sont robustes et présentent une écorce brun-rougeâtre se détachant en lanières fibreuses sur les spécimens âgés.

Les fruits sont visibles, globuleux, rouge orangé à maturité, de plus en plus jusqu'à 2 cm de diamètre (figure 4B et C), et la fleur est un bouquet de petites lanternes de couleur crème. La phase de maturation des fruits comprennent généralement deux périodes. La première commence dans la mi-octobre et se termine au début de Décembre, tandis que la seconde se produise autour de la fin de l'année (Soufleros *et al.,* 2005). Les feuilles sont alternes, simples, avec la forme oblancéolée et une couleur vert foncé, coriaces, à pétiole court et dentée (Celikel *et al.,* 2008).

Figure 3: vue d'ensemble d'un arbousier (*Arbutus unedo* L.) avec fleurs et fruits. (Oliveira, 2010).

Figure 4: fruits et fleurs d'*Arbutus unedo* L. (Oliveira, 2010).

Systématique de la plante	
Règne: Plantae	**Ordre:** Ericales
Sous règne: Tracheobionta ou Plantes vasculaires	
Division:*Magnoliophyta*	**Genre:** *Arbutus*
Embranchement: Magnoliophyta ou Spermaphytes Angiospermes	
Classe: Magnoliopsida ou Dicotylédones	**Espèce:** *unedo* L.
Sous classe: Dilleniidae	**Famille:** Ericaceae
Nom binominal: *Arbutus unedo* L.	
Nom commun: en français: Arbousier, **en arabe:** Lenj, Bou jbiba hamra, sessnou **En anglais:** Strawberry Tree.	

IV-3- Habitat :

Il se présente généralement sous la forme d'un arbrisseau à feuillage persistant, d'1.50m à 3m de hauteur. Occasionnellement, il peut s'élever jusqu'à10-12m.

IV-4-Tronc et ramifications :

Sur le plan architectural, l'arbousier peut adopter deux types de comportements selon sa situation écologique. En pleine lumière, il s'apparente au modèle de Leeuvenberg (Bell, 1993): il s'agit d'un développement sympodial où plusieurs ramifications latérales prennent le relais de l'axe primaire (Hallé et Oldemann, 1970). A l'ombre de la forêt, il édifie un tronc monopodial et son modèle architectural se rapporte à celui de Scarrone (Bell, 1993).

Dans ce cas, on observe un accroissement indéfini et cyclique du tronc; seules les ramifications latérales réparties le long du tronc adoptent une structure sympodiale.

Les jeunes rameaux sont rouges, rudes et poilus (glabres chez *A*. *andrachne*). Devenue âgée, l'écorce devient brun terne, se fissure et finit par s'exfolier par petites plaques.

IV-4-1- Feuille :

Elles sont oblongues-lancéolées, glabres, alternes, coriaces et luisantes sur le dessus. Elles mesurent de 5 à 11 cm de long et de 1.5 à 4 cm de large. Les bords du limbe sont dentés en scie ou parfois sub-entières. Le pétiole mesure10 mm ou moins.

IV-4-2- Fleurs :

Elles sont rassemblées en grappes 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 la fanaison de la fleur. Chaque extrémité des 5 pétales soudés se termine par une courte dent enroulée en dehors.

IV-4-3- Floraison:

Elle s'étale d'octobre à janvier. En saison, l'arbousier porte à la fois des fleurs et des fruits à divers degrés de maturité. Cela est dû à la longue durée de maturation des fruits qui est supérieure à un an.

IV-4-4- Fruits :

L'arbousier est un des rares végétaux qui porte en même temps des fleurs et des fruits: les fleurs s'épanouissent et côtoient l'automne arrivé, 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.

IV-5- Phénologie de l'espèce *Arbutus unedo* L.

Les plantes doivent s'adapter à leurs climats à travers l'évolution de certains comportements phénologiques (Chabot et Hicks, 1982, Kikuzawa, 1989, Gratani et Crescente, 1997), qui leur permettent de contrôler l'élongation racinaire, la chute des feuilles, la floraison et la fructification. La présence des adaptations phénologiques ou leur absence permet d'expliquer la distribution écologique et géographique de la plante (Gratani et Crescente, 1997).

La morphologie fonctionnelle des plantules conditionne de façon significative l'adaptabilité de celle-ci aux facteurs souvent très contraignants du milieu naturel (Gorse 1994; Ouedrago *et al.,* 1994 ; Sambou *et al.,* 1994 ; Vetaas, 1992 et Babou *et al.,* 2001)

L'activité végétative d'*Arbutus unedo* L. démarre à la fin d'avril et elle continue jusqu'à la fin de juin, les feuilles atteignent leur dimension définitive à la fin de septembre – début octobre; la durée de vie de la feuille est approximativement de 11 mois. L'activité végétative automnale est limitée (approximativement à un mois). La chute maximale des feuilles se produit au printemps avant la sécheresse de l'été. La floraison se produit d'octobre jusqu'en

décembre, la maturation des fruits a besoin de 12 mois, le fruit est d'abord vert, jaune puis rouge, il mûrit en hiver (Gratani et Crescente, 1997).

IV-6- Milieux

L'arbousier est un arbre typique du maquis élevé, qui est la principale formation végétale sur sol siliceux en climat méditerranéen, où il se développe en compagnie d'autres plantes marqueuses du maquis comme le chêne liège (*Quercus suber*), la bruyère arborescente (*Erica arborea*) et le laurier tin (*Viburnum tinus*). En France, l'arbousier est donc rencontré à l'état natif dans les massifs granitiques de la Basse Provence et des Alpes-Maritimes, ainsi qu'en Corse.

Bien que préférant un sol nettement acide, l'arbousier peut également être rencontré en terrain calcaire dans des zones localement décalcifiées (crêtes ou fortes pentes). En outre l'arbousier a été acclimaté sur une large part du littoral atlantique français, particulièrement en Bretagne.

Arbutus unedo L. présente un comportement intermédiaire entre deux types de stratégies adaptatives. Le RGR (Relative Growth Rate) de la feuille est semblable à celui des espèces sclérophylles sempervirentes typiques, mais ces feuilles ont un SLW (Specefic Leaf weight) réduit et une durée de vie de la feuille inférieure à une année. *Arbutus unedo* L. qui laisse tomber un pourcentage important de leur couvert de feuilles pendant l'année peut être considérée une espèce semi-caduque d'après Harly et al (1987), Gratani et Crescente (1997).

Le comportement phénologique de l'arbousier peut être compris comme une expression de stratégies d'adaptation de différentes espèces du maquis méditerranéen qui maximisent l'efficacité d'usage des ressources, lorsque les grandes ressources de l'environnement ne sont pas disponibles, ils équilibrent le coût de construction de la feuille avec sa durée de vie. (Gratani et Crescente, 1997).

IV-7- Multiplication de l'arbousier

IV-7-1- ***Germination :***

Deux façons de multiplications sexuées de l'arbousier peuvent se présenter :

- Graines dans leur fruit: Les fruits matures qui tombent de l'arbre mère seront germés dans le sol, d'où la possibilité de donner de nouveaux individus.
- Graines isolées de leur fruit: Les fruits comestibles charnus et les graines arillées se présentent fort bien à la dissémination par les oiseaux ou les mammifères. Après ingestion par les animaux, les graines, protégées par un tégument ou un endocarpe dur, traversent sans dommage l'appareil digestif et sont déposées dans les excréments. Dans des nombreux cas, les sucs digestifs contribuent même à la germination en amollissant le tégument.

Tout comme la fécondation amorce la transformation de l'ovule en graine, la germination transforme l'embryon contenu dans la graine en une plantule indépendante. Aux fins des essais de laboratoire, la germination est définie comme l'apparition et le développement, à partir de l'embryon contenu dans la graine, de ces structures essentielles qui sont révélatrice de la capacité de la graine de produire une plante normale dans des conditions favorables (Justice, 1972).

- **La germination consiste en trois processus qui se chevauchent :**

Une absorption d'eau principalement par imbibition, qui provoque un gonflement de la graine et une rupture éventuelle du tégument. Une activité enzymatique et une augmentation des taux de respiration et d'assimilation, qui sont l'indice de l'utilisation des éléments nutritifs mis en réserve et de leur transfert vers la zone de croissance. Une augmentation de taille et une division cellulaire entraînant l'apparition de la radicule et de la plumule (Evenari, 1957).

La germination de la graine demande deux ensembles de conditions: des conditions internes, relatives au bon état physiologique de la graine et des conditions externes liées aux facteurs physiques. Ce sont essentiellement les facteurs physico-chimiques du milieu dans lequel se trouve la graine (eau, température, composition de l'atmosphère, lumière). Dans la nature, au cours du temps, l'humidité et la température sont des conditions déterminantes comme le suggèrent (Barnea *et al.,* 1990).

En ce qui concerne la température, une espèce donnée présente souvent une limite supérieure et une limite inférieure de température entre lesquelles la germination est possible, avec une température optimale correspondant au maximum de pourcentage de germination.

On peut distinguer différents types de germination et de modalités de croissance de la jeune plantule. Ainsi, on distingue classiquement la germination hypogée, dans laquelle la graine reste à l'intérieur du sol, et la germination épigée, dans laquelle la graine est soulevée au- dessus du sol.

Dans la nature, la germination de l'arbousier peut être diminuée par les hautes températures, par la présence d'inhibiteurs (grains inclus dans leur fruit) et par les conditions désavantageuses du sol. La sensibilité à la température varie avec l'origine des grains de l'année de production. On peut observer une bonne germination dans le sol avec une alternance de température jours/nuit de 20°C /15°C, mais les meilleurs résultats sont obtenus après un traitement froid de 4°C (Evenari, 1957). Ces auteurs ont montré que la germination complète de graines d'arbousier, semées à l'obscurité immédiatement après récolte, se produit à des températures au-dessous de 15°C. Bien qu'à 20°C, le taux de germination était important aux premiers jours après imbibition, il a bientôt décliné et les valeurs définitives les

plus élevés du pourcentage de germination ont été observées à 12° et 15°C. Les mêmes auteurs ont montré que le traitement des graines par le GA3 (auxines) contrarie l'effet inhibiteur de haute température dans une certaine mesure.

IV-7-2- ***Multiplication végétative :***

La multiplication végétative repose sur l'aptitude d'un végétal à pouvoir produire un individu identique à lui-même à partir d'un organe (tige, racine, feuille …), d'un tissu ou d'une cellule. Elle est depuis des siècles, largement utilisée pour reproduire de nombreuses espèces en horticulture et arboriculture (Cornu et Boulay, 1986).

En dehors du bouturage et des techniques de cultures in vitro développés plus loin. Différentes méthodes de multiplications sont applicables aux arbres forestiers. Néanmoins en raison de leur coût et de la difficulté de leur mise en œuvre. Elles sont restreintes aux programmes d'amélioration ou à certaines espèces (Cornu et Boulay, 1986).

IV-7-3- ***Le Bouturage:***

C'est une technique traditionnelle en horticulture, elle est utilisée dans les programmes d'amélioration et de multiplication de nombreuses espèces forestières dans le monde (Epicéa, Eucalyptus, divers Pins, Merisier …). Les facteurs conditionnant la réussite du bouturage peuvent être endogènes (liés à l'état de développement du matériel végétal) ou exogènes (conditions de bouturage et traitement).

a-Facteurs endogènes:

L'enracinement des boutures décroît avec l'augmentation de l'âge des pieds-mères. Excellant pour de jeunes semis. Toutes les pousses d'un plant ne sont pas susceptibles de fournir de bonnes boutures. Les gros rameaux mal aoûtés comme ceux très petits conduisent à des résultats faibles. L'état physiologique des boutures conduisant à un bon enracinement varie selon la saison de prélèvement.

b- Facteurs exogènes:

De très nombreux milieux de bouturage sont utilisés, soit inertes et simples (sable, gravier, perlite …), soit composites à base de tourbe, de terreau ou d'écorces. L'environnement dans lequel sont placées les boutures joue un rôle important. Deux facteurs sont prépondérants: l'humidité et la température. En horticulture, de nombreuses études ont été conduites sur l'effet d'une chaleur de fond. L'idéal est souvent compris entre 20 et 25°C.
La majorité des espèces nécessite l'emploi de substances rhizogènes tels que l'indol-butyrique (A.I.B), ou indole-acétique (A.I.A).

IV-7-3-1- Stratégies de bouturages:

La bouture est le fragment de végétal, susceptible de s'enraciner. Il en existe de nombreuses formes et nous détaillerons les plus courantes.

- ***Boutures de rameaux feuillés***

On trouvera dans cette catégorie plusieurs subdivisions en fonction de la technique de prélèvement et de la nature des boutures (herbacées, semi-herbacées ou ligneuses).

1: partie herbacée de la tige, elle est la plus jeune et est encore tendre.

2: partie semi-herbacée ou semi-ligneuse de la tige, elle n'est pas aussi tendre que la partie herbacée mais pas aussi dure que la partie ligneuse.

3: partie ligneuse, elle est dure et rigide.

- ***Les boutures herbacées:***

Elles sont prélevées sur des pieds mère en pleine végétation sur les parties jeunes de la plante. Elles se font pratiquement toute l'année. Pendant la période hivernale, on peut maintenir les pieds-mère en végétation en serre afin de produire des tiges herbacées.

- ***Les boutures semi-herbacées ou semi-ligneuses:***

Elles sont en général, celles qui commencent à subir un début d'aoûtement (passage de l'état herbacé à l'état ligneux). L'époque de ces boutures est très précise ; elles s'effectuent en fin d'été-début d'automne.

- ***Les boutures ligneuses:***

Elles se pratiquent pour des végétaux très ligneux en général en automne ou en début de l'hiver.

- ***Boutures de rameaux non-feuillés :***

Elles se réalisent uniquement sur des végétaux ligneux pendant le repos. Les boutures, de 20 à 25 cm de longueur, sont coupées au sécateur sous un nœud (point parfois renflé de la tige où peuvent s'insérer des feuilles, des fleurs, des bourgeons ou des ramifications) pour la partie basale et avec un léger biseau au-dessus d'un œil (bourgeon dormant à l'aisselle d'une feuille) pour la partie supérieure. Cette technique s'applique essentiellement aux arbustes et arbres d'ornement.

- ***Boutures d'œil***

Comme défini précédemment, un œil est un bourgeon dormant à l'aisselle d'une feuille. La bouture se fait sur un végétal dont les yeux sont opposés. Puis, la tige est fendue dans le sens de la longueur. Ce type de bouture se pratique sur les Hortensias (souvent dans le cas où l'on a peu de pied mère et besoin de nombreuses boutures).

IV-8- Caractéristiques chimiques et antioxydantes d'*Arbutus unedo* L.

Plusieurs classes chimiques d'antioxydants sont identifiées dans les différentes parties d'*A.unedo* L. Dans le Tableau 1 sont présentés les principaux antioxydants et métabolites identifiés. Les substances chimiques des différentes parties végétatives sont présentées dans les points suivants.

Tableau 1 : Utilisations médicinales des différentes parties de la plante *A. unedo* L.

Partie utilisée	Utilisation médicinale	Références
Feuilles / Racines	- Affections gastro-intestinales; - Problèmes urologiques; - Problèmes dermatologiques; - L'application cardio-vasculaire; - Maladies rénales; - Hypertension; - Les maladies cardiaques; - Diabète; - Antihémorroïdaires; - Diurétique; - Anti-inflammatoire; - Anti-diarrhéique.	Ziyyat *et al.,* 1997 El-Hilaly *et al.,* 2003 Leonti *et al.,* 2009 Jouad *et al.,* 2009 Cornara *et al.,* 2009
Fruits	- Affections gastro-intestinales; - Problèmes neurologiques; - Problèmes dermatologiques; - Maladies rénales; - L'application de cardiologie.	El-Hilaly *et al.,* 2003 Leonti *et al.,* 2009 Cornara *et al.,* 2009
Ecorce	- Affections gastro-intestinales, - Problèmes urologiques, - Problèmes dermatologiques, - Applications cardio-vasculaire.	Leonti *et al.,* 2009

IV-8-1- Feuilles

IV-8-1-1- *Composition chimique des feuilles*

Les feuilles d'*A.unedo* L. contiennent plusieurs classes de composés phytochimiques détaillées, telles que les terpénoïdes, l'α-tocophérol, les huiles essentielles et les composés phénoliques. Les terpénoïdes connus présents dans les feuilles sont α-amyrin acétate, acide bétulinique et lupéol (Gaspar *et al.,* 1997). La quantité d'α-tocophérol présente dans les feuilles d'*A. unedo* L. varie en fonction de l'heure de la collecte des échantillons. Le taux le plus élevé est constaté lorsque les feuilles sont recueillies en mars, atteignant un taux de

0,01328 %. Bien que cela semble être un très faible montant, il est très similaire à celui qui est présent dans la principale source industrielle de l'α-tocophérol qui est la fève de soja (Kivçak et Mert, 2001).

La composition de l'huile essentielle d'*A. unedo* L. a déjà été divulguée par (Kivcak *et al.,* 2001a). Les principaux composés présents dans cette huile essentielle sont: (E)-2-decenal, α-terpineol, acide hexadecanoique et (E)-2-undecenal. La fraction phénolique des feuilles de l'arbousier inclut une grande variété de composés: les tanins, flavonoïdes (catéchine gallate, myricétine, rutine, afzelin, juglanin, avicularin), glycosides phénoliques (quercitrine, isoquercitrine, hyperoside) et glucosides d'iridoïdes (Sanjust *et al.,* 2008; Legssyer *et al.,* 2004; Males et al., 2006; Carcache-Blanco et al., 2006). Les polyphénols ont été identifiés et quantifiés par (Fiorentino *et al.,* 2007). Ce travail a permis l'identification de douze composés (l'arbutine, gallate éthylique, p-hydroxybenzoyl arbutine, galloyl arbutine, gallocatéchine, catéchine, kaempférol 3-O-α-L-ramnopyranoside, quercétine 3-O-α-L -ramno pyranoside myricetin, 3-O-α-L ramnopyranoside, kaempférol 3-O-β-D-arabinofuranoside, quercétine 3-O-β-D-arabinofuranoside et myricétine 3-O-β-D-arabinofu+ranoside). Le composé polyphénolique majeur trouvé est l'arbutine (62.7 mg dans 100 g de feuilles fraîches), suivie par la catéchine (54,6 mg) et le gallate d'éthyle *(*44.0 mg) (Figure 5).

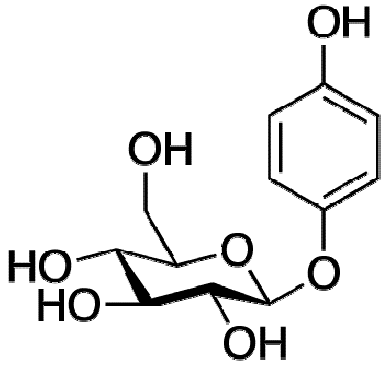
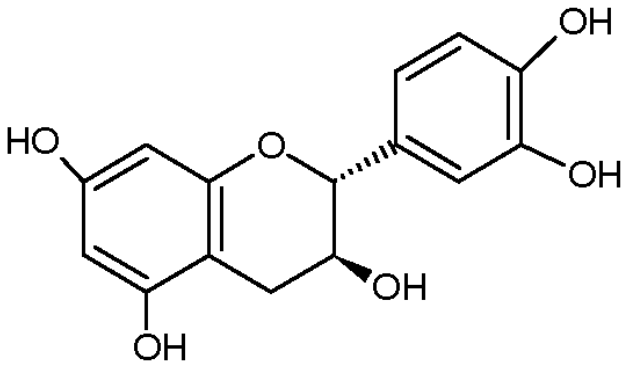
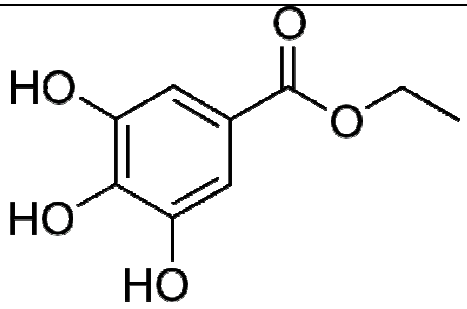
Composé phénolique	Structure chimique
Arbutine	
Catéchine	
Gallate d'éthyle	

Figure 5: Les structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants dans les feuilles d'*Arbutus unedo* L.

IV-8-1-2-Capacité antioxydante des feuilles

Bien que présentant dans leur composition une grande variété de composés antioxydants, comme décrit précédemment, les informations disponibles sur la capacité antioxydante des feuilles est rare. Une première étude a été réalisée par Pabuçcuoğlu et al (2003), et une étude plus approfondie a été réalisée par (Oliveira *et al.,* 2009), existant une troisième étude évoquant la capacité antioxydante de feuilles (Tavares et al., 2010). Le premier a testé l'activité antioxydante des extraits éthanoliques et méthanoliques des feuilles, en utilisant le 2,2 -azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS• +) et liée l'activité des glycosides flavonols et des tannins présents dans les feuilles. La deuxième étude,

en plus de tester l'activité antioxydante à l'aide de trois méthodes différentes, également quantifié les composés phénoliques totaux dans les feuilles (Oliveira *et al.,* 2009). Les extraits obtenus en utilisant l'éthanol ont présenté un pouvoir réducteur plus élevé (EC50 de 232,7 µg·mL-1) et effet du DPPH (EC 50 De 63,2 µg·mL-1).

Le troisième travail testé les extraits des feuilles d'*A. unedo* L. en utilisant la méthode de capacité d'absorption des radicaux oxygénés (CARO). En utilisant cette méthode la capacité antioxydante était plus élevé que ceux obtenus avec l'extrait de thé vert (Tavares *et al.,* 2010). Les résultats ont montré que les feuilles d'*A. unedo* L. possèdent un effet de balayage élevée contre les radicaux DPPH, ainsi qu'un effet puissant de piégeage du radical superoxyde, l'un des plus importants radicaux libres, précurseur de plusieurs molécules associées aux lésions tissulaires par oxydation (Aruoma, 1996), et par une activité plus intense, par rapport à des échantillons considérés comme étant hautement efficace, comme feuilles du thé vert.

IV-8-2- Fruit

IV-8-2-1- Composition chimique du fruit:

Par ailleurs, les fruits d'*A. unedo* L. ont également fait l'objet de certaines études, en ce qui concerne leur composition chimique et capacité antioxydante. Özcan et Hacıseferoğulları (2007) ont évalué la composition chimique du fruit de l'arbousier (tableau 2). Outre l'humidité, la composante la plus importante des fruits sont les sucres, représentant de 42% à 52% du poids total des fruits secs (Alarcão-e Silva *et al.,* 2001; Ayaz *et al.,* 2000). des glucides totaux, lorsque le fruit est dépouillé, le saccharose est le principal des glucides (87,7 ± 0,6 g par kg de fruits secs), quand les fruits deviennent mûrs, le fructose devient le glucide le plus important présent dans ces fruits (208 ± 2 g par kg de fruits secs) (Alarcão-e Silva *et al.,* 2001). Les protéines sont également présentes en une quantité considérable, 33,6 ± 0,12 g par kilogramme, suivie les cendres (28,2 ± 1,24) et de la graisse (21 ± 1). La valeur énergétique présentée par ces fruits est de 13682 ± 544 kg (Özcan et Hacıseferoğulları, 2007).

La composition en acides gras des fruits d'*A. unedo* L. a été évaluée par (Barros *et al.,* 2010). Vingt-et-un acides gras ont été identifiés et quantifiés, en acide α-linolénique (C18:3n3) est celui qui est présent en quantité plus élevée (36,51 ± 0,64, pourcentage relatif), et représentant les acides gras polyinsaturés la majeure partie de l'ensemble des acides gras (58,28 ± 0,54). Les sucres, les minéraux, les composés phénoliques, acides phénoliques et organiques, les vitamines et les caroténoïdes sont également présents dans les baies d'*A. unedo* L. La quantité de sucre présente dans ces fruits est variable entre les stades de maturité, actuellement, lorsque dépouillée (Alarcão-e-Silva *et al.,* 2001), 14% du poids sec, et quand

elle est mûre variant de 40,55 % à 52,21 % du poids sec (Alarcão-e Silva *et al.,* 2001; Ayaz e*t al.,* 2000). À partir de sucres totaux, lorsque le fruit est immature, le saccharose est le principal sucre, quand les fruits deviennent mûrs, le fructose devient le sucre le plus important présent dans ces fruits (Alarcão-e Silva *et al.,* 2001).

Tableau 2: Composition chimique des fruits d'*A. unedo* L. fruits (g / kg).

	Özcan and Hacıseferoğulları	**Barros et al.***
Humidité	537.2 ± 21.0	597.0 ± 26.7
Les glucides	-	938.3 ± 4.1
Les protéines	33.6 ± 1.2	30.9 ± 0.8
Graisses	21 ± 1.0	13.7 ± 4.0
Cendres	28.2 ± 1.24	17.1 ± 0.9
Energie	13682 ± 544 kj·	16735.6 ± 48.9 kj·

- n'est pas signalé *

- exprimé par kilogramme de poids sec.

La teneur en minéraux de ces fruits a été divulguée par Özcan et Hacıseferoğulları (2007). Cette étude a montré que ces fruits sont une très bonne source de certains minéraux, notamment du potassium (K), le calcium (Ca), et de phosphore (P). Le potassium est présent dans les baies d'*A. unedo* L. en quantités très importantes, 14909.08 ± 1687 mg/kg de poids sec, tandis que les quantités de calcium et le phosphore sont de 4959.02 ± 15 et 3668.56 ± 339,69 mg/kg de poids sec, respectivement.

Il existe plusieurs acides organiques et phénoliques présents dans les fruits d'*A. unedo* L. les acides organiques sont identifiés (fumarique 1,94 mg/g poids sec), lactique (0,84 mg/g), malique (0,84 mg/g), subérique (0,23 mg/g) et acides citrique (0,01 mg/g), tandis que l'acide gallique (10,7 mg/g poids sec), gentisique (1,9 mg/g), protocatéchique (0,6 mg/g), p-hydroxybenzoïque (0,3 mg/g), vanillique (0,12 mg/g) et m-anisique (0,05 mg/g) sont les acides phénoliques identifiés dans ces fruits (Ayaz *et al.,* 2000). L'acide quinique est identifié par Alarcão-e-Silva *et al.* (2001) comme le plus important, lorsque le fruit est immature (7.35± 0,03 g/100 g de matière sèche) et fruits mûrs (5.99± 0,05 g/100 g de matière sèche). En revanche, Ayaz *et al.* (2000) présentent l'acide fumarique en tant qu'un principale acide organique 1,94 ± 0,07 mg/g de matière sèche) présent dans les fruits mûres d'*A.unedo* L.

La quantité de vitamines et des caroténoïdes dans les fruits, bien qu'elle ne soit pas très élevée, ne devrait pas être ignorée, et le montant total en vitamine E contenu a été déterminée par Barros *et al.*, (2010), montrant que les fruits présentent dans leur composition 23,46 ± 0,26 mg/100 g poids sec total de tocophérols, α-tocophérol la forme la plus importante de la vitamine E présente, avec 21,98 ± 0,18 mg/100 g poids sec. L'isomère α-tocophérol a également été quantifié dans un autre travail (Pallauf *et al.,* 2008), où le montant de cette forme de vitamine E était de 0,0237 ± 0,001 mg pour 100 g partie comestible. Les montants déclarés par ces deux auteurs sont assez dissemblables, des différences entre les méthodes utilisées sur ces deux œuvres doivent tenir compte de ces différences. Une autre vitamine a déjà été constatée dans les baies de l'arbousier. Le montant le plus élevé a été constaté par Alarcão-e Silva *et al.,* (2001), dont les échantillons contenait 542 ± 11 mg d'acide ascorbique par 100 g de matière sèche du fruit, tandis que Barros *et al.,* (2010) parviennent à une valeur inférieure, de seulement 15,07 ± 0,77 mg d'acide ascorbique par 100 grammes de poids sec. Les travaux de Pallauf *et al.*, (2008) nous fournit la quantité de vitamine C présente dans 100 grammes de portion comestible les fruits d'arbousier. Le montant constaté par ces auteurs est de 5,50 ± 0,147 mg pour 100 g partie comestible, même s'il est considéré comme faible, comparable à la quantité présente dans d'autres fruits, comme les pêches, les pommes ou les prunes.

Les caroténoïdes sont également présents dans des fruits, en particulier β - carotène. Les caroténoïdes totaux ont été quantifiés par Pallauf *et al.,* (2008), qui ont déclaré une quantité de ces composés de 0.0647± 0,014 mg pour 100 g partie comestible, étant la majeure partie quantifiée comme la lutéine + zéaxanthine (0.0427± 0,009) et les autres en β -carotène (0,025 ± 0,007). Le contenu de ce caroténoïde dans ce fruit est aussi présenté par Barros et al. (2010) et Alarcão-e Silva *et al.*, (2001). Les premiers auteurs se réfèrent à 1,07 ± 0,09 mg/100 g poids sec comme le montant du β-carotène qui est présent dans les fruits, tandis que Alarcão-e Silva *et al.,* (2001) rapportent les variations dans la quantité de β-carotène avec la maturation des fruits, en commençant par 38,1 ± 3,7 mg/100 g de matière sèche, lorsque le fruit est immature, de 70.9± 5,2 mg/100 g de matière sèche lorsque le fruit est mûr rouge.

La fraction phénolique présente dans les fruits de l'arbousier comprend plusieurs classes de produits chimiques, tels que les tanins, flavonoïdes, les dérivés de l'acide gallique et les dérivés de l'acide ellagique, et le montant total les composés phénoliques présents a été quantifié dans différentes études: Barros *et al.,* (2010) indiquent un montant qui est de 126,83 ± 6,66 mg GAE/g d'extrait tandis que Heinrich (2005) rapport une valeur de 37,6 mg/g extrait. En revanche, Fortalezas *et al.* (2010) indiquent un taux qui est de 16,46 ± 3,66 mg GAE par g

de poids sec, Tavares *et al.,* (2010) ont découvert environ 18 mg GAE par g de fruits secs, tandis que Alarcão-e Silva *et al.,* (2001) reportent 15,5 ± 0,6 mg catéchine équivalent par g de poids sec comme le montant total des composés phénoliques présents dans les fruits. Dans la classe des flavonoïdes présents dans les baies, quatre différentes anthocyanines peuvent être trouvées: delphinidine-3-galactoside, cyanidine-3-glucoside, cyanidine-3-arabinoside (Fortalezas *et al.,* 2010; Pawloska *et al.,* 2006; Pallauf *et al.*, 2008) et cyanidin -3-Galactoside (Figure 6). Ce dernier composé a été détecté uniquement par Pallauf *et al.,* (2008), qui ont été en mesure de réaliser la séparation des deux isomères anthocyanines, qui diffèrent seulement sur le sucre présent dans l'anthocyanidine, dans ce cas le glucoside et galactoside de cyanidine, qui peuvent un co-élution, interférant tant dans l'identification et la quantification de ces genre de composés (Pallauf *et al.,* 2008).

Par conséquent Pavloska *et al.,* (2006), qui déclarent la cyanidine 3-glucoside correspondant a l'anthocyanine majeurs présents dans ces fruits, avec 0,39 mg/100 g de fruits frais. La quantité des anthocyanines augmente au fur et à mesure de la maturation, passant de 0,25 ± 0,02 mg/g de matière sèche lorsque le fruit est dépouillée de 1,01 ± 0,01 mg/g de matière sèche lorsque le fruit devient rouge mature. Sur une autre étude, Fortalezas *et al.,* 2010, quantifient le montant total de l'anthocyanine, atteignant une valeur de 76,26 ± 9,85 mg de cyanidine 3-glucoside correspondant équivalents par 100 g de poids sec.

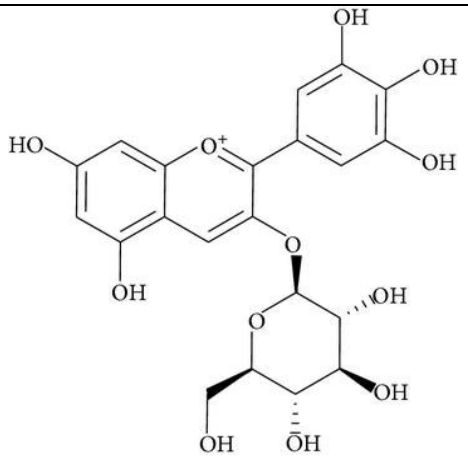
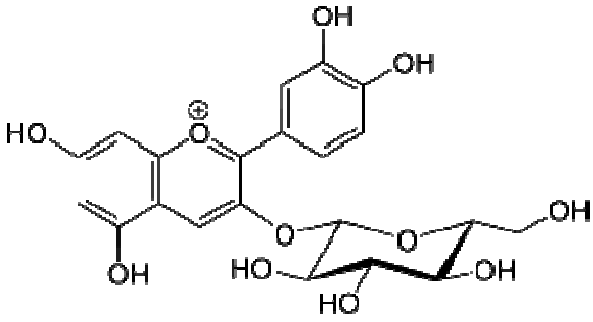
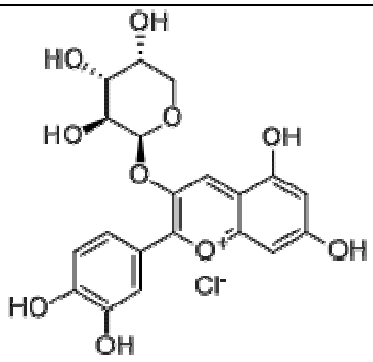
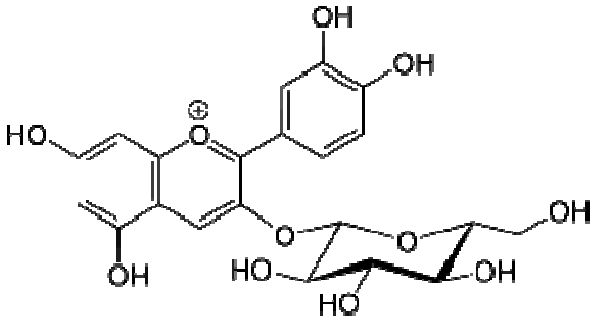
Anthocyanines	Structure chimique
Delphinidine-3-galactoside	
Cyanidine-3-glucoside	
Cyanidine-3-arabinoside	
Cyanidine-3-galactoside	

Figure 6: Les structures chimiques des anthocyanes présents dans les fruits d'*A.unedo* L.

Alarcão-e Silva *et al.,* (2001) quantifient, le montant total des tannins des fruits avec différentes étapes de maturité. Selon ces résultats, la quantité de tanin diminue quand les fruits deviennent mûrs, de 3,13 ± 0,06 mg/g de matière sèche lorsque le fruit est dépouillée de 1,75 ± 0,02 mg/g de matière sèche lorsque le fruit est mûr rouge. Comme le goût de ces baies est considéré comme trop astringent lorsque les fruits sont de couleur verte, deviennent comestibles lorsqu'ils atteignent la phase de maturation, ce goût amer peut être attribuée à la quantité élevée de tanins présents. Un autre groupe chimique de flavonoïdes, les proanthocyanidines, sont présents dans les fruits. La quantité totale des proanthocyanidines est de 27,46 ± 0,989 mg pour 100 g partie comestible, étant épicatéchine 4,8 - épicatéchine 4,8 -catéchine (4.52± 0,874 mg pour 100 g partie comestible). Appartenant également aux flavonoïdes, les flavonols sont ainsi présents. Les plus abondantes sont les dérivés de la quercétine (quercétine-3-rutinoside, quercétine-3-xyloside et quercétine-3-rhamnoside), et myricetin-3-xyloside est le quatrième flavonole identifié et quantifié par Pallauf *et al.,* (2008). Autres travaux signalent la présence de la quercitrin, l'isoquercitrine et le kaempférol ((Males et *al.,* 2006; Mazza et Miniati, 1993). Le montant total des flavonols est de 1,14 ± 0,346 mg pour 100 g partie comestible, près de la moitié de la quantité représentée par la quercétine-3-xyloside (0.52± 0,031 mg pour 100 g partie comestible) (Pallauf *et al.,* 2008).

D'autres composés antioxydants présents dans *A. unedo* L. sont acide ellagique et acide gallique dérivés. Les premiers sont présentes en quantités similaires aux flavanols, (1.54± 0,162 mg pour 100 g partie comestible), et cinq dérivés ont été trouvés par Pallauf *et al.*, (2008), c'est-à-dire acide ellagique glucoside correspondant, acide ellagique-diglucoside, acide methylellagic rhamnoside + acide ellagique arabinoside et acide ellagique xyloside, étant la première présente un montant le plus élevé (0.46 ± 0,019 mg pour 100 g partie comestible). Il existe six dérivés d'acide gallique trouvé dans les fruits (β-D-glucogalline, 3-O-galloylquinic acide, acide gallique 4-O- β-D glucopyranoside, 5-O-galloylquinic, acide 5-O-galloylshikimic et acide 3-O-galloylshikimic acide).

La composition volatile des baies d'*A. unedo* L. a également fait l'objet d'une enquête. En plus des études sur le distillat traditionnelle produit par la fermentation des fruits d'arbousier (Soufleros *et al.,* 2005) le miel d'arbousier (Bianchi *et al.,* 2005; de la Fuente *et al.,* 2007), huiles essentielles (Kahriman Abdukirim *et al.,* 2010) et les émissions de composés organiques volatils par l'arbre entier (Owen *et al.,* 1997; LLusià et Peñuelas, 2000; Peñuelas et Llusià, 2001) un rapport est disponible sur les composés volatils émis par les baies eux-mêmes (Oliveira et al., sous presse). Six classes de composés chimiques ont été trouvés (alcools, aldéhydes, esters, norisoprenoids, sesquiterpenes et monoterpènes), comprenant 41 composés volatils. Les alcools sont la principale composante de la fraction volatile des fruits d'*A. unedo*, suivie d'aldéhydes et d'esters. La variation de composés volatiles a été étudiée en trois étapes de maturité des fruits, et les résultats montrent que toutes les classes de composés chimiques ont diminué leur contenu à partir du stade immature à maturité, à l'exception de sesquiterpènes et monoterpènes. Elles apparaissent en montant le plus élevé dans les fruits mûrs que dans les fruits immatures. Les principaux composés étaient (Z)-3-hexen-1-ol, 1-hexanol) et l'hexanal, (E)-2-hexenal. Diminution des composés (alcools, aldéhydes, esters) sont signalés à être remplacées par d'autres, associés aux fleurs et senteurs sucrées (monoterpènes que sont principalement des norisoprénoïdes.), présent dans les fruits mûrs d'*A. unedo* L.

IV-8-2-2- Capacité antioxydante du fruit

Il n'y a que quatre études connues concernant l'activité antioxydante des fruits d'*A. unedo* L. La plus complète a été effectuée par Barros *et al.,* (2010). Quatre méthodes différentes d'évaluer ces capacités ont été testés par ces auteurs: réduction de la puissance, activité de piégeage de radicaux DPPH, inhibition du blanchiment du β-carotène et l'inhibition de la peroxydation des lipides dans le tissu cérébral (TBARS). De faibles valeurs de EC50 des quatre méthodes testées, (447.92± 0,81, 410.80± 0,93, 774.99± 0,86 et 94.27± 1,21 µg/ml, respectivement).

Heinrich (2005) a testé plusieurs propriétés antioxydantes et d'inhibition de l'enzyme lors de l'étude de 127 plantes sauvages ou semi-sauvages consommés qui inclut les fruits d'*A. unedo* L. Les fruits présentent une haute activité antioxydant sur le test DPPH (plus de 50% du témoin) et de moyenne capacité de protection contre peroxyde d'hydrogène induite par les lésions de l'ADN (entre 25% et 50% du témoin). Sur les tests d'inhibition de l'enzyme, une activité élevée (> 75% du témoin) a été atteint sur le dosage G-OH (capacités de protection contre peroxyde d'hydrogène induite par les dommages à l'ADN) et de moyenne activité sur le test de la xanthine oxydase. Le troisième rapport connu sur la capacité antioxydante des fruits

était réalisé par Fortalezas *et al.,* (2010), utilisant la capacité d'absorption des radicaux d'oxygène (ORAC). Leurs résultats indiquaient une légère baisse d'activité (11,66 ± 2,01 mmol équivalents Trolox par 100 g de poids sec) des extraits de framboise (15,37 ± 2,73 mmol équivalents Trolox par 100 g de poids sec), utilisés dans cette étude comme échantillon de contrôle.

Les travaux de Tavares *et al.,* (2010) ont testé extraits de fruits, en utilisant uniquement la méthode ORAC. Les résultats obtenus ont montré une haute capacité capable de lutter contre le stress oxydatif de processus extraits des fruits, ce qui est considéré comme très efficace comme antioxydant source.

L'ensemble d'arbuste a également fait l'objet d'une étude concernant sa capacité antioxydante. Dans ce travail, Andrade *et al.,* (2009) quantifié le contenu total phénolique (mg acide gallique équivalents/g extrait de plante) et flavonoïdes contenus (mg quercétine équivalents/g extrait de plante), ainsi que la capacité à piéger les radicaux DPPH, essai de deux différentes méthodes d'extraction (éthanol, acétone). Les résultats ont montré une grande quantité de ces deux composés phénoliques (255.19 ± 7,12, dans l'extrait éthanolique et 334.46± 31,83 de l'extrait à l'acétone) et flavonoïdes (20.50± 0,77, dans l'extrait éthanolique et 23.37± 0,67 de l'extrait à l'acétone). La valeur EC50 de ces extraits considérablement faible, et en particulier à celui obtenu avec la solution éthanolique (7,85 μg/ml), prouvant la grande capacité antioxydante de l'arbuste.

IV-9- Effets d'*Arbutus unedo* L. sur la santé humaine

IV-9-1- Feuille

Associé à des feuilles sont certaines utilisations traditionnelles, contre certaines maladies, comme mentionné précédemment. Il y a plusieurs avantages potentiels pour la santé humaine des feuilles d'*A. unedo* L., comme activité antioxydante, comme décrit auparavant, effet vasorelaxant, amélioration de la santé cardiovasculaire, le traitement ou la prévention des maladies inflammatoires, parmi d'autres. Certains rapports sont disponibles sur les effets des extraits de ces feuilles, qui prouvent la rationalité de la médecine populaire. Ces travaux ont étudié en particulier l'effet vasorelaxant et propriétés anti-inflammatoires des extraits des feuilles. Legssyer *et al.,* (2004), ont testé les extraits de feuilles d'*A. unedo* L., en utilisant différents solvants, pour évaluer l'effet vasorelaxant de ces extraits sur anneau aortique des rats Wistar mâles. Les résultats de ces travaux, ont montré que les feuilles possédaient une activité vasorelaxant forte, et que cette activité est principalement due à la présence de tanins condensés oligomères et catéchine gallate.

D'autres travaux sont disponibles sur les effets des feuilles, spécialement liés aux maladies cardio-vasculaires et maladies inflammatoires. Les résultats de ces travaux montrent que les extraits de feuilles sont capables de diminuer la hyperagrégabilité plaquettaire, ce qui est un facteur important dans la pathogenèse des maladies inflammatoires. Mekhfi *et al.,* (2006) ont montré que des extraits des feuilles d' *A. unedo* L. étaient capables d'inhiber in vitro l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine, cette activité probablement liées à la présence de tannins dans les feuilles, ce qui a été confirmé par la suite, et l'action de la testé extraits a été principalement due à l'affaiblissement de la mobilisation des ions Ca^{2+}, diminution de l'oxygène réactif espèces production et protéine tyrosine phosphorylation, prouvant que des extraits de ce congé peut être utilisé pour traiter ou prévenir inflammatoires et des maladies cardio-vasculaires (El Haouari *et al.,* 2007).

En outre, l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques des feuilles d'*A. unedo* L. a été testé par Kivcak *et al.,* (2001b) contre les bactéries Gram positif et Gram négatif *(Escherichia coli, Staphylococcus aureus, S. epidermidis, Salmonella thyphimurium, Enterobacter cloacae et Enterococcus faecalis)*, ainsi que contre levures (*Candida albicans*). Les extraits testés se sont révélés posséder une capacité d'inhiber la croissance de toutes les bactéries testées.

Par ailleurs, l'activité des feuilles dans l'inhibition d'enzymes liée à l'apparition de plusieurs maladies, comme l'arthrite rhumatoïde, invasion des cellules tumorales et des métastases (Tavares *et al.,* 2010), et lié cette activité à la présence de composés polyphénoliques dans les extraits, c'est-à-dire acide gallique et ses dérivés.

IV-9-2- fruit

Comme mentionné précédemment, plusieurs attributs bénéfiques pour la santé sont attribués aux fruits d'*A. unedo* L., et exploités en médecine populaire. Toutefois, pour autant que nous le sachions, un seul rapport a étudié ces attributs. Heinrich (2005) a étudié les extraits de ces fruits sur différents paramètres, tels que des tests d'inhibition enzymatiques (inhibition de la xanthine oxydase, inhibition de l'oxydation de gaïacol catalysée par la myéloperoxydase, l'inhibition de l'acétylcholinestérase), l'inhibition de cytokine induite par l'activation des cellules, des dosages mesurant l'activité anti-prolifération et anti-diabétique.

En outre, certains rapports sont disponibles sur les utilisations traditionnelles de ces baies, pour différentes maladies dans plusieurs régions de la Méditerranée comme l'Italie, le Maroc et la Turquie, ce qui inclut l'utilisation de fruits dans le traitement des troubles gastro-intestinaux, dermatologique, urologiques et les problèmes cardio-vasculaires (Leonti *et al.,* 2009), la capacité des fruits pour réduire les maladies rénales (El-Hilaly *et al.,* 2003) et contre la gastrite (Cornara *et al.,* 2009).

D'autres parties de cette plante sont également utilisées en médecine populaire. Les racines sont utilisées pour le traitement de plusieurs maladies, qui comprennent des douleurs abdominales, les maladies de la vessie, comme antihypercholestérolémiant ou comme dépuratif sanguin (Novais *et al.,* 2004), et pour le traitement du diabète, de l'hypertension et les maladies cardiaques (Jouad *et al.,* 2001), comme diurétique, astringent, anti-inflammatoires et antidiarrhéique contre la blennorrhagie (Ziyyat et al., 1997). En outre, Leonti *et al.,* (2009) ont également constaté que l'écorce d'*A. unedo* est utilisée pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, dermatologique et urologique et problèmes cardio-vasculaire.

Différentes études soutiennent l'utilisation traditionnelle des racines dans le traitement de l'hypertension. Ziyyat et Boussairi (1998), Ziyyat *et al.,* (2002) et Afkir *et al.,* (2008) toutes les études ont présenté des résultats prouvant l'effet vasodilatateur de l'extrait des racines sur des rats. Par ailleurs, Mekhfi *et al.,* (2004) a prouvé que la classe des antiagrégants plaquettaires ont des propriétés de soutenir la prévention et/ou propriétés thérapeutiques liées aux maladies cardio-vasculaires et la diminution du risque de thrombose.

IV-9-3- Les antioxydants mécanismes d'action

Il ya trois principaux mécanismes considéré comme le moyen par lequel les antioxydants jouent un rôle de protection contre les agents d'oxydation: transfert H-atome, transfert d'électrons et chélation métallique. Le premier mécanisme implique le transfert d'un atome d'hydrogène pour le radical libre (FR). Par conséquent, ce libre-radicaux devient inoffensif, tandis que l'antioxydant (ANTIOX), bien que de devenir lui-même oxydé, il est également antioxydant.

Le second mécanisme est appelé un seul transfert d'électrons. Elle implique le don d'un électron de l'agent antioxydant pour le radical libre. Les radicaux libres d'anions énergiquement est stable avec un même nombre d'électrons, tandis que les radicaux de cations antioxydant+ est aussi une moins réactive.

Le troisième mécanisme, connu sous le nom de métaux de transition chélation, s'explique par la possibilité que antioxydant peut chélate les métaux de transition (Mn+), conduisant à la formation de stable complexé composés. Cette chélation empêche les métaux de prendre part dans les réactions qui peuvent conduire à la formation de radicaux libres, beaucoup d'entre eux considérés comme les plus dangereux.

Etude expérimentale

Chapitre V:

Matériels et méthodes

Chapitre V: Matériels et méthodes

Dans ce travail de recherche, et pour mettre en valeur l'arbousier, nous avons adopté une nouvelle méthodologie de travail, qui consiste à déterminer l'impact des facteurs écologiques et la répartition géographique, sur la variation de la concentration des composés phytochimiques du fruit de l'*Arbutus unedo* L. et sur leur activité biologique.

L'identification botanique de l'espèce a été faite par Le Professeur Chadli Rabah enseignant à l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem et confirmée par la clé de détermination, la flore de l'Algérie (Quézel et Santa, 1963).

La méthodologie retenue pour ce travail de thèse est scindé donc en trois axes distincts mais complémentaires, dont le premier est consacré à l'étude écologique qui renferme :

Une étude ethnobotanique au niveau des 4 stations d'étude (Sidi Bel Abbes, Tlemcen, Tiaret, Chlef), comme étant une étude préliminaire, pour sélectionner notre espèce *Arbutus unedo* L. selon des critères importants.

Le deuxième axe de ce travail est purement phytochimique, qui consiste à :

- Une extraction et quantification des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins, par la méthode de spectrophotométrie des échantillons de trois localités ;
- L'identification des flavonoïdes pour une caractérisation du profil chimique de ses molécules a été déterminée par la méthode HPLC, et RMN. Pour cette technique d'analyse, on n'a pu réaliser que la caractérisation des molécules chimiques des échantillons de deux provenances Terni et El Masa ;

Le troisième axe de cette étude correspond à la valorisation des extraits aqueux de l'arbousier de trois provenances (Tiaret, Terni, El Marsa) et qui renferme :

- L'activité antioxydante des extraits flavonoïdiques de l'*Arbutus unedo* L. des trois stations.

V-1- Enquête ethnobotanique:

Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de l'ethnopharmacologie, montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part seraient quasiment dépourvues de toxicité.

L'usage empirique des différentes préparations traditionnelles des plantes est donc extrêmement important pour une sélection efficace de plantes, puisque la plupart des métabolites secondaires des espèces employées en médecine moderne ont été découvertes par l'intermédiaire d'investigation ethnobotanique (lhuillier 2007).

Pour l'étude ethnobotanique nous avons choisi trois stations, celle de Terni, d'El Marsa, et de Djebel Guezoul.

Dans cet axe qui porte sur l'étude ethnobotanique on a jugé intéressant d'entamer cette étude aussi au niveau de la région de Sidi Bel Abbes pour s'informer du rôle que joue cette espèce dans la médecine traditionnelle dans la région.

Au niveau de ces stations choisies pour cette étude, les forêts de Zegla, Ténira, Baudens et Tessala (massif forestier de Sidi Bel Abbes), ainsi que les forêts de Terni, (Tlemcen), D'el Marsa (Chlef) et Djbel Guezoul (Tiaret) abritent une strate arbustive importante composée essentiellement de peuplements d'*Arbutus unedo* L. ayant une importance économique, écologique et sociale vitale pour la population des communes. Ils assurent les besoins en bois de chauffage et de cuisson, et constituent la principale source de fourrage pour le bétail. L'exploitation et le commerce d'*Arbutus unedo* L. représentent, pour plusieurs familles à la campagne une source de revenu non négligeable.

Au-delà de ses fonctions primordiales, l'*Arbutus unedo* L. joue aussi un rôle essentiel dans la médecine traditionnelle grâce à son utilisation médicinale et sa commercialisation qui font partie des moyens de subsistance de la population riveraine.

Pour cette raison là, qu'on a entamé des enquêtes ethnobotaniques contribuant, de leurs parts, à rassembler et constituer une source d'information très précieuse, prête à être exploitée sur le plan scientifique.

Dans l'optique de réaliser un travail inédit et original, cette étude se propose de recueillir l'ensemble des informations sur les applications thérapeutiques et traditionnelles

locales et de mettre en évidence la place de la phytothérapie dans le système de soin traditionnel au niveau de ces régions.

a- Aperçu géo-ethnographique de la zone d'étude ethnobotanique

- Les quatre forêts sélectionnées se trouvant dans la région de Sidi Bel Abbés bordent la partie méridionale occidentale du Tell algérien. Située au nord ouest du pays, elles occupent une position centrale stratégique et s'étend sur environ 15% de l'espace régional, totalisant de ce fait une superficie cadastrale de 915063 $km^{2.}$ Elles se distinguent par une vocation agro-sylvo-pastorale (Benabdeli, 1996)**.**

  Elles sont connues par leur patrimoine forestier qui fait que la wilaya soit considérée comme étant l'une des wilayas fortement boisée. Son massif forestier occupe une place importante d'une superficie forestière de 209 489 ha. C'est une zone qui se caractérise par son climat méditerranéen semi-aride à variante tempérée (Benabdeli, 1996)**.** .

  La zone d'étude où ont été sélectionnées les quatre forêts est relativement assez bien boisée (Figure 7), elle a même l'un des plus forts taux du pays où dominent tantôt des espèces arborescentes tantôt des espèces arbustives ou buissonnantes. La région offre une diversité lithologique, structurale et une diversité écologique, climatique et floristique assez importante. Par conséquent, une tradition phytothérapeutique est fortement représentée dans cette région.
- La zone 2 sélectionnée pour réaliser cette étude, s'intègre dans la wilaya de Tlemcen, celle-ci se situe à l'extrémité Nord-ouest de l'Algérie. Géographiquement, Elle est limitée au Nord par la mer méditerranéenne, au Nord-Est par la Wilaya de Ain Temouchent, à l'Est par la Wilaya de Sidi Bel-Abbes, à l'Ouest par la frontière Algéro-Marocaine et au Sud par la Wilaya de Naâma. La wilaya de Tlemcen occupe une superficie de 9017 km², elle comprend 20 daïras subdivisées en 53 communes y compris notre zone d'étude la commune de Terni (Figure 8). Celle-ci est marquée par une hétérogénéité orographique offrant une diversité de son paysage et une grande diversité géologique dont il existe une prédominance des terrains jurassiques.
- La troisième zone se trouve dans la wilaya de Tiaret: Le massif de Guezoul situé à l'extrémité nord de la ville de Tiaret, il s'étale sur 22 Km et occupe une superficie de 6377 km^2. Il est constitué par quatre cantons principaux selon (Ait Hammou *et al.,* 2011):
  - Djebel Azouania,
  - Djebel Seffalou,
  - Djebel Koumat et Djebel Guezoul.

Administrativement le massif de Guezoul occupe une position partagée entre les territoires de quatre communes: Commune de Tiaret, Commune de Tagdempt, Commune de Guertoufa et la commune de Mechraa sfa (Ait Hammou *et al.,* 2011).

Le massif est recouvert principalement par des formations préforestières et des matorrals d'une série de chêne vert plus au moins dégradée. Avec des pentes de 0 à 25 % et des expositions variables. Le substrat est siliceux à texture sableuse (Figure 8). Cela est bien exprimé par la forte abondance des espèces calcifuges, notamment: *Arbutus unedo, Lavandula stoechas, Ampelodesma mauritanicum* et *Pulicaria odora*. Ainsi, il représente un modèle type de la forêt méditerranéenne originelle (Miara, 2011).

- La quatrième zone se situe dans la wilaya de Chlef (la forêt d'EL Marsa). Le chemin est formé d'un massif forestier, d'un lac et riche en faune et en flore. La région côtière présente les attraits les plus importants par sa situation géographique, à savoir, la mer au nord, les monts du Dahra au sud, et le massif du Zaccar à l'est (Figure 8).

La sélection de ces stations est justifiée par les paramètres suivants :

- aspects édaphiques et climatiques ;
- la présence naturelle du genre *Arbutus unedo* L. ;
- la disponibilité des données sur le milieu.
- leur accessibilité et leur taux de fréquentation important par les riverains.

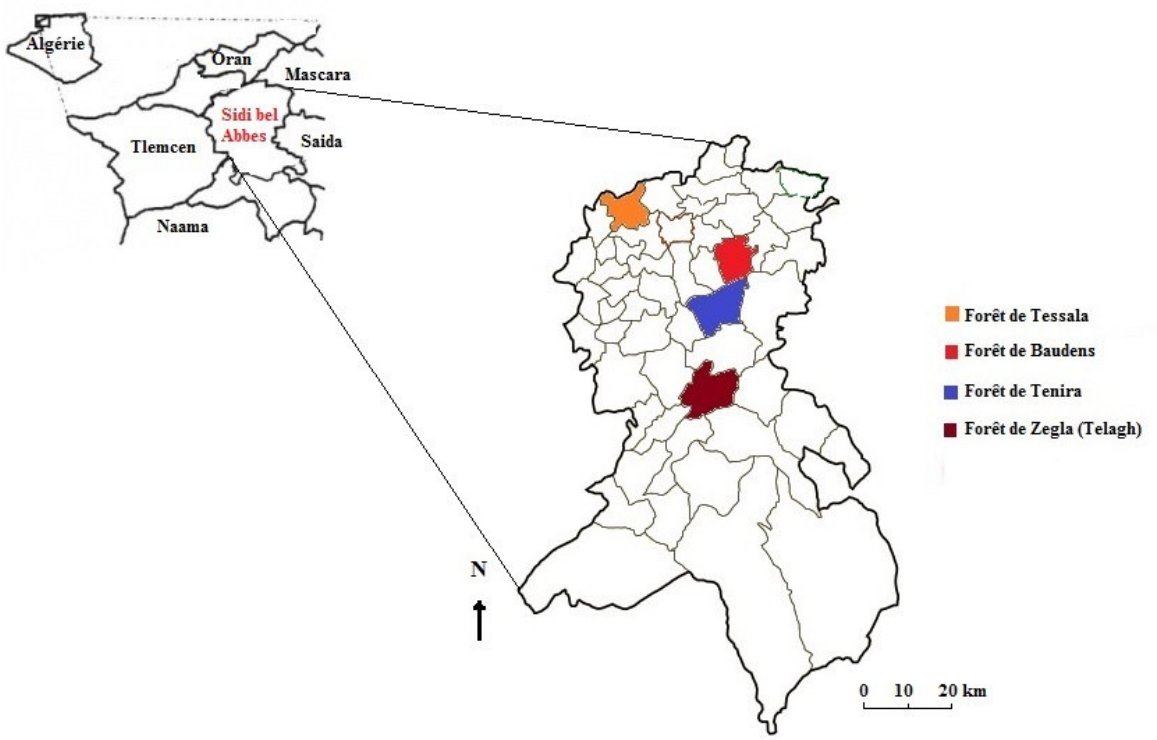


Figure 7: carte de localisation géographique de la zone d'étude ethnobotanique SBA

Figure 8 : carte de localisation géographique des trois stations d'études

b- Méthode d'étude

Une fiche d'enquête ethnobotanique selon le modèle ci-dessous est soumise aux enquêtés au cours d'entretiens individuels. La période de collecte des données s'est étalée de juin 2013 à novembre de la même année, durant laquelle nous avons réalisé 700 entretiens répartis sur les 7 sites. Le temps consacré à chaque entrevue était d'environ de 20 minutes à une demi-heure.

Lors de chaque entretien nous avons collecté toutes les informations sur l'enquêté, comprenant son âge, son sexe, son niveau d'études, sa situation familiale.

Les données recueillies pour la plante comprennent les usages, la partie utilisée, et le mode de préparation.

Modèle de questionnaire

Plante médicinale et phytothérapie

Informateur:

– Age: .....
– Situation familiale: Célibataire ☐ Marié ☐
– Sexe: Masculin ☐ Féminin ☐
– Niveau académique: Néant ☐ Primaire ☐ Universitaire ☐

Matériel végétal:

– Nom vernaculaire:
.....
– Nom scientifique:
.....

– Usage de la plante: Thérapeutique ☐ Cosmétique ☐ Autres ☐
.....

– Partie utilisées: Racine ☐ Fruits (baie) ☐ Écorce ☐ Feuilles ☐
.....
– Forme d'emploi: Tisane ☐
.....
– Mode de préparation: Infusion ☐ Décoction ☐ Cru ☐
.....
– Mode d'administration: Oral ☐
.....

Utilisation:
– Type de maladie:
- Affections dermatologiques ☐
- Affections respiratoires ☐
- Affections cardio-vasculaires ☐
- Affections génito-urinaires ☐
- Affections ostéo-articulaires ☐
- Affections métaboliques ☐
- Affections du tube digestif ☐
- Affections des glandes annexes du tube digestif ☐
- Affections neurologiques ☐

– Diagnostic par:
Lui-même ☐ Le médecin ☐ L'herboriste ☐ Autres ☐:
.....

– Résultats: Guérison ☐ Amélioration ☐ Inefficace ☐

– Effets secondaires:
.....
.....
– Toxicité:
.....
.....

– Précaution d'emploi:
.....
.....

c- Echantillonnage

Dans ce travail, l'échantillon est élaboré grâce à un mode d'échantillonnage probabiliste (aléatoire) divisé en 7 strates (chaque forêt est considérée comme strate) dont 4 correspondent aux nombres des forêts de la zone d'étude de Sidi Bel Abbes. La proportion du nombre de personnes de chaque échantillon est de 100 personnes, pour chaque strate, soit un échantillon global de 700 personnes. On parle ainsi d'un échantillonnage stratifié proportionnel (Tableau 3). L'échantillon constitué se compose principalement d'hommes. Ils sont au nombre de 520 contre 180 femmes.

Dans ce travail, les données documentées lors de l'enquête ethnobotanique ont été saisies sur une base de données Microsoft Excel et analysées afin de déterminer les proportions des différentes variables comme le sexe et l'âge, le niveau d'étude, la situation familiale, les parties de plante utilisées, les méthodes de préparation et les maladies les plus fréquemment traitées et la commercialisation de la plante.

Tableau 3: Nombre d'enquêtés par strate.

	Noms des Strates	**Nombre d'enquêtés**
Strate 1	Station de Tessala	100
Strate 2	Station de Baudens	100
Strate 3	Station de Tenira	100
Strate 4	Station de Zegla	100
Strate 5	Station de Terni	100
Strate 6	Station de Djbel Guezoual	100
Strate 7	Station d'Elmarsa	100
Echantillon		700

V-2- Etude phytochimique:

V-2-1- Matériel végétal :

Le matériel végétal choisi pour cette étude, correspond aux fruits de l'*Arbutus unedo* L. croissant à l'état spontané, dans des stations localisées dans l'ouest algérien. La récolte a été effectuée aléatoirement au stade de la fructification respectivement durant les mois d'octobre et novembre 2013 pour Djbel Ghezoul, les régions d'El Marsa et Terni.

V-2-2- Situation géographique des stations d'étude:

Les stations de prélèvement des peuplements naturels d'*Arbutus unedo* L. pour l'étude phytochimique se situent dans trois stations différentes dans l'ouest algérien à savoir :

La station de Terni (Wilaya de Tlemcen), la station d'El Marsa (Wilaya de Chlef), et la station de Djebel Guezoul (Wilaya de Tiaret). La situation géographique et les caractéristiques bioclimatiques de ces stations d'étude sont portées sur le Tableau 4.

Tableau 4: caractéristiques géographiques et bioclimatiques des stations d'étude.

	Période de récolte	Partie étudiée	Longitude (Ouest)	Latitude (Nord)	Altitude (m)	Etage bioclimatique
Terni	Novembre 2013	Fruit	1°19′ E	34°49′ N	1190 m	Mediterranean à variante fraiche
El Marsa			0°37′27″ E	36°22′31″ N	351 m	Mediterranean humide
Djebel Ghezoul	Octobre 2013		1°10'30" E	35°22'26" N	1150 m	Semi-aride à variante fraiche

- La station d'étude de Terni s'intègre dans la wilaya de Tlemcen, celle-ci se situe à une latitude de 34°49'N et une longitude de 1°19'E localisé dans les monts de Tlemcen à une altitude de 1190m, environ 20 km au sud de Tlemcen. Elle est délimitée au nord par la mer méditerranéenne. Cette région est caractérisée par un climat méditerranéen à variante fraîche avec une moyenne de précipitation de 624 mm, une moyenne de température maximale de 24.3 °C et une moyenne de température minimale de 6.0 °C. Ces substrats sont des vertisols topo-morphes très riches en argiles gonflantes présentant un caractère iso-humique (mekkioui, 1989) (Figure 9).

Figure 9: localisation de la zone d'étude (Terni) (Google Earth, 2014)

- La station d'el Marsa (latitude 36°22'31"N, longitude 0°37'27"E, altitude 351 m), à proximité du chef-lieu de la province de Chlef, située à l'ouest de Ténés cette région est caractérisée par un climat méditerranéen humide. La moyenne des précipitations annuelles atteints 518 mm, une moyenne de température maximale de 26.4 °C et une moyenne de température minimale de 11.1 °C (Djebaili, 1984) (Figure 10).

Figure 10: localisation de la zone d'étude (El Marsa) (Google Earth, 2014).

- Notre troisième station d'étude se limite au niveau du massif montagneux dit « Guezoul » embrassant la ville de Tiaret par sa partie sud (Figure 11). D'orientation SSW-NNE, le massif de Guezoul s'étale sur 22 Km et occupe une superficie de 6377 km^2. (Latitude 35°22'26" N, longitude 1°10'30" E, altitude 1150 m), caractérisé par un climat semi-aride à variante thermique fraiche avec des précipitations à 360,4 mm, une moyenne de température maximale de 18°C et une moyenne de température minimale de 7,7°C. Le massif de Guezoul est constitué par une formation du Miocène ou la couche gréseuse est dominante. Les argiles sont finement stratifiées et très altérés en surface, les alluvions recouvrant les roches se composent de limons fins, sablonneux et parfois argileux d'une épaisseur variable de 3 à 5 m au bas du versant et peut profond sur les sommets (Ait Hammou et *al.*, 2011).

Figure 11 : localisation de la zone d'étude (Massif de Djebel Guezoul) (Google Earth, 2014).

V-2-3- Conservation du matériel végétal:

Les fruits ont été séchés à l'étuve à 40°C pendant 72 heures, Le matériel végétal séché a été, ensuite, broyé à l'aide d'un broyeur électrique pour obtenir une poudre fine, puis conservé dans des sacs en papier pour une utilisation ultérieur.

V-2-4- Dosage des composés phénoliques

V-2-4-1 Extraction des composés phénoliques:

La méthode d'extraction optée est celle du liquide-liquide. Ainsi, 1g du fruit sèche en poudre a été placé dans un Erlenmeyer contenant 20 ml de méthanol (96%) pendant 24 heures. Le mélange subi une agitation au vortex, puis centrifugé grâce à une centrifugeuse de type Sigma Motor 12024, à une vitesse de 4000tr/mn et pendant une durée de 10 mn. Le premier surnageant est alors récupéré; l'opération est répétée deux fois pour extraire la totalité des composés phénoliques de la poudre du fruit de l'arbousier.

Les solutions méthanoliques récupérées ont été ensuite évaporées sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type Buchi R- 200 à une température de 60 °C. Les résidus secs pesés ont été repris par 3 ml de méthanol (Matkowski et Piotrowska, 2006) pour les analyses ultérieurs.

Le rendement d'extraction est calculé par la formule donnée par Falleh et al. 2007 : R (%) = 100 Mext/Méch.

Où : R est le rendement en %; ME est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg et MS qui est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

a- Dosage des phénols totaux

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins. Le dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit par (Singleton et al., 1999).

Le dosage des phénols totaux a été alors, effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu.

Le réactif est préparé à partir d'un mélange d'acide phosphotungstique (H3PW12O40) et d'acide phosphomolybdique (H3PMo12O40). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). Qui est stabilisé par addition de carbonate de sodium.

L'absorption maximale de la coloration bleu produite est comprise entre 725 et 750 nm ; elle est proportionnelle à la quantité de phénols totaux présents dans les extraits végétaux. (Boizot et Charpentier, 2006).

- **Dispositif expérimental**

De ce fait, un volume de 200 µl de l'extrait brut méthanolique pour chaque échantillon est introduit dans des tubes à essai, au quel le mélange (1ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7.5%) est additionné. Les tubes sont agités puis incubés à 40°c pendant 30 mn et en fin conservés durant 60 minutes à la température ambiante.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif, à différentes concentration (100 à 500 mg/l). Un test à blanc est réalisé ne contenant pas l'acide gallique et considéré comme le point 0 mg/l de la gamme.

Le même protocole suivi pour la réalisation de la courbe d'étalonnage est appliquée en remplaçant l'acide gallique par les extraits méthanoliques.

La densité optique (DO) de toutes les solutions a été mesurée à une longueur d'onde de 765 nm à l'aide d'un spectophotomètre Jenway 6504 UV/VIS.

- **Expression des résultats**

La concentration des phénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec l'acide gallique et exprimée en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g).

b-Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes au niveau du fruit de l'arbousier provenant de trois stations d'étude différentes est aussi entamé selon la méthode ci-dessous:

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par (Ozkan *et al.,* 2007) avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 510 nm.

- **Dispositif expérimental**

500 µl de l'extrait brut méthanolique des fruits convenablement dilué sont mélangés avec 1500 µl d'eau distillée, suivis de 150 µl de nitrite de sodium (NaNO2) à 5%. Le mélange est incubé pendant 5 min à la température ambiante à l'obscurité

On rajoute au mélange 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCL3) à 10% (m/v) .Après 6 min d'incubation à la température ambiante à l'obscurité, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4% est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité grâce au vortex, afin d'homogénéiser le contenu. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est déterminée à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires que celles des échantillons servira à la quantification des flavonoïdes sont reprises en utilisant de la catéchine comme contrôle positif à différente concentration (10-20-30-40-50mg/ l).

- **Expression des résultats**

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits de plante étudiée est exprimée en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g).

C- Dosage des Tanins

- **Tanins condensés**

La détermination des tanins condensés est réalisée par la méthode proposée par Swain et Hillis (1959). Elle est basée sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide (Price *et al.,* 1978).

- **Protocole expérimental**

La quantité de 0,2 g de poudre du fruit de l'arbousier broyées est macérée pendant 18h dans 10 ml de méthanol à 80%. Après macération, le mélange est filtré; 1 ml de filtrat est additionné à 2 ml de solution préparée à base de catéchine à 1% dans l'acide sulfurique à 70%. L'ensemble de mélange est placé dans un bain marie pendant 15 mn à 20°c à l'abri de la lumière. La densité optique du mélange est déterminée à une longueur d'onde de 500 nm au spectrophotomètre UV.

- **Expression des résultats**

Les tanins condensés sont exprimés selon la formule suivante :

$$Tc\%=(5,2x10^{-2}xD.OxV)/p$$

$5,2x10^{-2}$: constante exprimée en équivalent de cyanidines.

P : poids de l'échantillon

V : volume de l'extrait utilisé

V-2-4-2 Identification des flavonoïdes

Pour cette partie de recherche, nous avons pu réaliser la caractérisation du profil chimique des flavonoïdes de l'*Arbutus unedo* L, originaire de Tiaret par la technique d'analyse chromatographie en phase liquide à haute performance, (HPLC) par contre pour la caractérisation du profil chimique des flavonoïdes de l'arbousier originaire d'El Marsa, nous avons opté pour la technique d'analyse de la résonance magnétique nucléaire « RMN ^{13}C » et « RMN ^{1}H ».

- **Protocole expérimentale**

L'extraction des flavonoïdes se fait sur la poudre des fruits d'*Arbutus unedo* L. D'abord, 100 g de poudre fine des fruits de l'arbousier ont été ajoutés au mélange méthanol / eau (80% /20%), on laisse macérer pendant 24 heure puis on récupère l'extrait méthanoïque qui est de 350 ml. Le renouvèlement du solvant se fait chaque 24 heures durant 3 jours (Lim *et al.,* 2012).

La solution hydro-méthanolique obtenue est mise dans un seul récipient, puis filtrée pour obtenir à la fin une solution limpide (Figure 12). Elle est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor de type R 120) à une température comprise entre 35 à 45 °C (Figure 13). Par la suite, nous avons repris l'extrait sec avec 200 ml d'eau bouillante distillée, laissé pendant 24 heures se décanter, puis filtré sur du papier filtre Whatman n° 1.

Figure 12 : Filtration de la solution hydro-éthanolique obtenue après macération (Cliché, K. Bouzid, 2013).

Figure 13 : évaporation de la phase aqueuse du évaporateur rotatif (Cliché, K. Bouzid, 2013).

La phase aqueuse limpide est extraite par différents solvants respectifs, l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le 1-butanol pour un volume (V/V) (Benhammou

et al., 2007). (Figure 13). Ces derniers sont éliminés par évaporation. Les quatre extraits sont lyophilisés (Figure 14) (Figure 15).

Les extraits lyophilisés ont été étudiés quantitativement et qualitativement ; pour l'étude quantitative, les phénols totaux et les flavonoïdes totaux ont été dosé par la méthode spectophotométrique, Pour l'étude qualitative, on a procédé à une identification par la méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance « HPLC» et la résonance magnétique nucléaire « RMN ^{13}C » et « RMN ^{1}H ».

Figure 14: lyophilisateur (Cliché, K. Bouzid, 2013).

Figure 15: Les quatre extraits obtenus après lyophilisation (Cliché, K. Bouzid, 2013).

V-4-2-1-Caractérisation des composés par Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

La nécessité de connaître et d'identifier des composés individuels flavonoïdes dans les échantillons nécessite le remplacement des méthodes et des techniques de séparation traditionnelles. La chromatographie en phase liquide à haute performance est probablement la technique analytique la plus largement utilisée pour caractériser les composés polyphénoliques (Gomez-Caravaca *et al.,* 2006). Cette technique est utilisée pour l'analyse qualitative des différents extraits du fruit d'*A.unedo* L. prise de la zone de Tiaret.

L'HPLC est un movyen très flexible et simple d'isoler et d'identifier les différents composés d'un mélange.

A l'instant initial, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne où il est entrainé par la phase mobile. Si la phase stationnaire a été bien choisie, les constituants du mélange ayant des temps de rétentions différents sont séparés par élution. Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé chromatogramme.

Appareillage

Les différentes parties constituant l'HPLC sont décrites ci-dessous:

a) Pompe : une pompe est alimentée à partir des plusieurs flacons contenant des solvants de polarités différentes permet d'effectuer une programmation des solvants pour assurer un système de gradient.

- En mode isocratique: 100% d'un mélange du même éluant tout au long de l'analyse,

-En mode gradient, la concentration des constituants du mélange d'éluant varie en fonction du temps.

b) Injecteur : c'est une vanne d'injection qui porte une boucle d'échantillonnage

c) Colonne : elle contient la phase stationnaire qui définie le type de chromatographie, soit en phase normale soit en phase inverse.

La phase normale:

Dans le cas d'une chromatographie en phase normale, la silice est greffée par des groupements polaires et l'éluant utilisé est apolaire.

La phase inverse:

Dans le cas de la phase inverse, la silice est greffée par des chaines carbonées linaires (C8, C18 et l'éluant utilisé est polaire (ACN (acétonitrile), MeOH, H2O).

d) Détecteur : un détecteur UV-visible à longueur d'onde variable (190-400 nm) qui permet de détecter les différents composés contenu dans l'échantillon à analyser. Notons qu"il est important que les produits à détecter portent un chromophore qui absorbe dans cette plage de longueur d'onde. Le principe de fonctionnement de l'HPLC est schématisé ci-dessous

Le gradient utilisé est constitué de 3 phases mobiles:

Solvant A: composition (50 mM phosphate d'ammonium (NH4H2PO4) à pH 2,6 ajusté avec l'acide orthophosphorique);

Solvant B: composition 80: 20 (v/v) acétonitrile / solvant A;

Solvant C: composition (200 mM d'acide ortho phosphorique (H3PO4) à pH 1,5 ajusté avec NaOH).

Les solvants sont filtrés sur papier Whatman n°3 puis mis dans un appareil à l'ultrason pendant 25 minutes.

Le débit d'élution est de 1 ml/ minute et la capacité de la boucle d'injection est de 20 µl. La détection a été réalisée à 280 et à 320 nm. Après chaque cycle, le système est reconditionné pendant 10 minutes avant une nouvelle analyse (Muanda, 2010).

V-4-2-2- Caractérisation des flavonoïdes par la méthode de Résonance Magnétique Nucléaire 2D (1H, 13C)

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est une méthode physique essentielle pour l'analyse des structures et des conformations moléculaires. Grâce aux progrès considérables accomplis dans la méthodologie de cette technique durant les 20 dernières années (développement de spectromètres à haut champ, augmentation de la puissance des ordinateurs, découverte de la RMN multidimensionnelle), la RMN est devenue un outil indispensable pour l'analyse des produits naturels complexes.

L'étude structurale d'un produit naturel nécessite dans un premier temps l'enregistrement des spectres 1D (RMN, ^{1}H, ^{13}C) dans les meilleures conditions possibles. Ce qui permet d'obtenir des informations importantes sur le déplacement chimique, et les constantes de couplage. Par ailleurs, des expériences d'irradiation sélective et de découplage peuvent être effectuées pour identifier les signaux complexes d'un système de spin.
Malheureusement, dans les molécules complexes comme c'est souvent le cas pour les produits naturels, l'information sur les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont parfois inaccessibles dans les spectres de RMN à une dimension à cause des recouvrements de signaux.

C'est dans ce cadre que les expériences de RMN à 2 dimensions (RMN 2D) offrent des améliorations considérables dans la résolution des spectres et permettent la caractérisation de structures complexes.

Nous nous intéresserons non pas à la description mathématique et à l'explication des séquences d'impulsion, mais à l'évaluation pratique des spectres et à leur importance dans l'élucidation de nos structures. Nous exposerons ici les techniques de RMN 2D homonucléaire (NOESY) et hétéronucléaire (HMBC) employées pour la détermination de nos structures. Cette technique est utilisée pour l'analyse qualitative des différents extraits du fruit d'*A.unedo* L. prise de la zone d'El Marsa.

V-5- Valorisation des extraits flavonoïques dans la détermination de l'activité anti oxydante

V-5-1 Evaluation du pouvoir antioxydant

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante in vitro de nos extrais des composés phénoliques a été réalisée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical hydroxyle.

Test d'activité anti-oxydante (Piégeage du radical libre DPPH● (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl):

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH est réduit en changeant de couleur et en virant vers le jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti radicalaire de l'échantillon**.**

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Benhammou et al, (2006). Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraichement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Figure 16).

Figure 16: spectrophotomètre utilisé pour la lecture des absorbances (Cliché K, Bouzid, 2013)

- Expression des résultats :

Calcul des pourcentages d'inhibitions :

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

I %= ((Ac-At)/Ac)*100

Ac : absorbance du contrôle ;

At : absorbance du test effectué

Calcul des IC50 :

IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, les pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

Analyse statistique

Les données expérimentales du dosage et de l'évaluation du pouvoir antioxydant obtenus ont été exprimées par une moyenne et plus ou moins l'écart type, la corrélation entre l'IC 50 et les composés phénoliques ont été déterminés par Excel 2007.

Chapitre VI:

résultats et discussion

Chapitre VI: résultats et discussion

VI-1-Enquête ethnobotanique

Les résultats obtenus sont répertoriés selon les pratiques thérapeutiques, l'utilisation des plantes ainsi que le traitement des maladies.

VI-1-1- Fréquence d'utilisation de la plante médicinale selon la classe d'âge

L'utilisation de la plante médicinale est répandue chez toutes les tranches d'âge, avec une nette prédominance pour la tranche d'âge de 45 à 65 ans, on note un taux de 54.91%; les personnes âgées de 65ans et plus 20.64% .la tranche d'âge de 25 à 40 ans, un taux de 18.45% Cependant, et pour les personnes de moins de 20 ans, les moins âgées, l'utilisation des plantes médicinales n'est que de 6 % et ne représente pas un grand intérêt thérapeutique (Figure 17).

Les résultats obtenus montrent effectivement que les personnes les plus âgées ont plus de connaissances en plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges. L'expérience accumulée avec l'âge constitue la principale source d'information à l'échelle locale au sujet de l'usage des plantes en médecine traditionnelle.

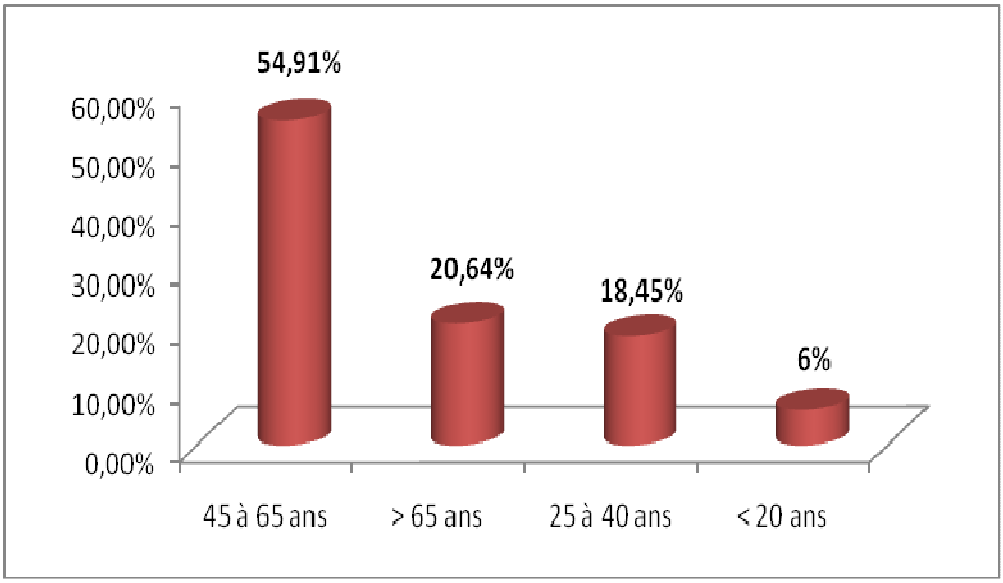


Figure 17: fréquence utilisation de la plante médicinale selon la classe d'âge.

VI-1-2- Utilisation de la plantes médicinale selon le sexe

L'utilisation des plantes médicinales varie selon le sexe. Les femmes utilisent beaucoup plus les plantes médicinales que les hommes. En effet**,** 79.21% des femmes questionnées utilisent la médecine traditionnelle contre 20.79% de la population masculine (Figure 18).

Ceci peut être expliqué par l'utilisation des plantes médicinales par les femmes dans d'autres domaines que la thérapie et par leur responsabilité en tant que mères; ce sont elles qui donnent les premiers soins en particulier pour leurs enfants. Ces résultats confirment d'autres travaux ethnobotaniques de Mehdioui et Kahouadji (2007) réalisés au Maroc, qui ont montré que les femmes sont plus détentrices du savoir phytothérapique traditionnel; alors que les hommes se réservent la tâche de la collecte des plantes dans les zones accidentées et dangereuses.

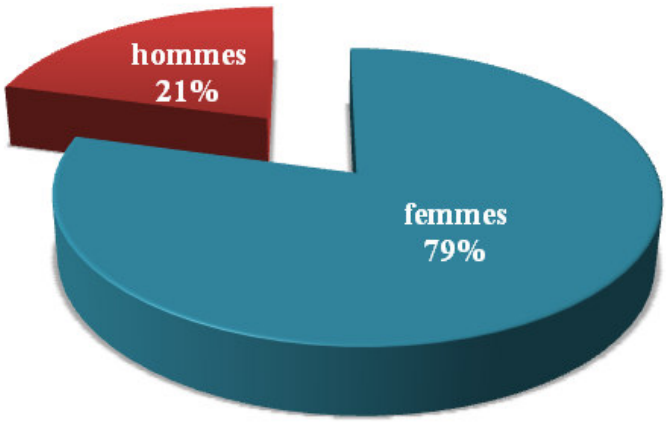


Figure 18: utilisation de la plantes médicinale selon le sexe.

VI-1-3-Utilisation de la plante médicinale selon le niveau d'étude

Dans la zone d'étude, la grande majorité des usagers des plantes médicinales sont analphabètes, avec un pourcentage de 60.27%. Néanmoins, les personnes ayant le niveau de l'école primaire ont un pourcentage d'utilisation non négligeable (25,89%) des plantes médicinales; alors que celles ayant un niveau d'études universitaire, utilisent très peu les plantes médicinales (8,48%) (Figure 19).

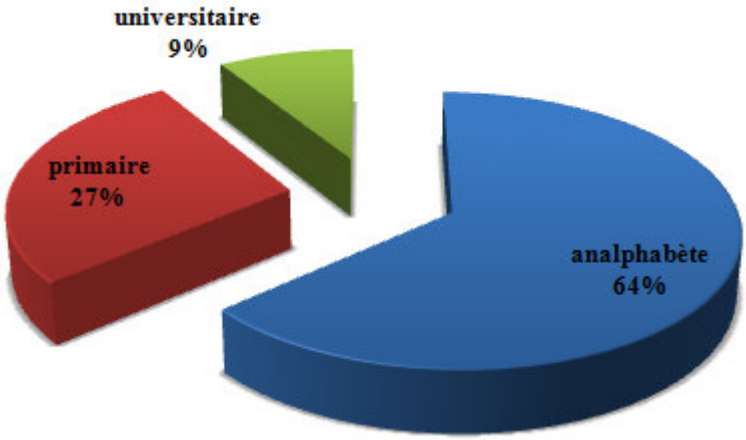


Figure 19: utilisation de la plante médicinale selon le niveau d'étude.

VI-1-4- Utilisation de la plante médicinale selon la situation familiale

Les plantes médicinales sont beaucoup plus utilisées par les personnes mariées (80.80%) que par les célibataires (19.20%) (Figure 20). Ceci peut être expliqué par l'influence de la femme dans la vie de couple.

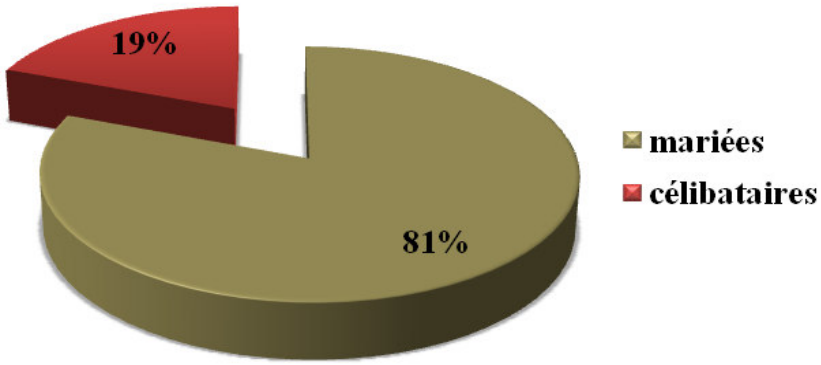


Figure 20: utilisation de la plante médicinale selon la situation familiale.

VI-1-5- Utilisation de la plante médicinale dans les soins des maladies

VI-1-5-1-Parties utilisées

Au total, 4 parties de plantes sont utilisées en médecine traditionnelle notamment les racines, l'écorce, la feuille, et le fruit. Le pourcentage d'utilisation de ces différentes parties (Figure 21) montre que la racine et la feuille sont les plus usitées (35.26%) et (30%). Le fruit et l'écorce occupent la deuxième place avec un pourcentage respectif de 21% et 13.74%.

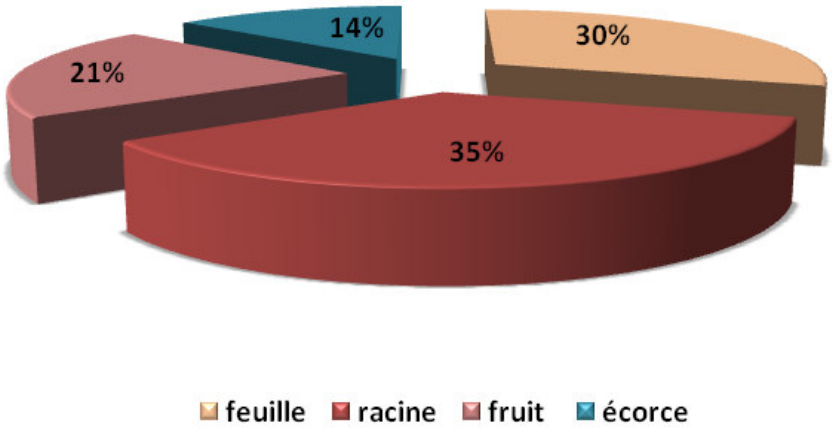


Figure 21: répartition des pourcentages des différentes parties utilisées de la plante médicinale.

VI-1-5-2- Mode de préparation

Les 3 modes de traitement traditionnel les plus utilisés sont la décoction, l'infusion et la consommation du fruit cru avec un pourcentage respectif de 35.61%, 32.80 % et 31.59 % (Figure 22).

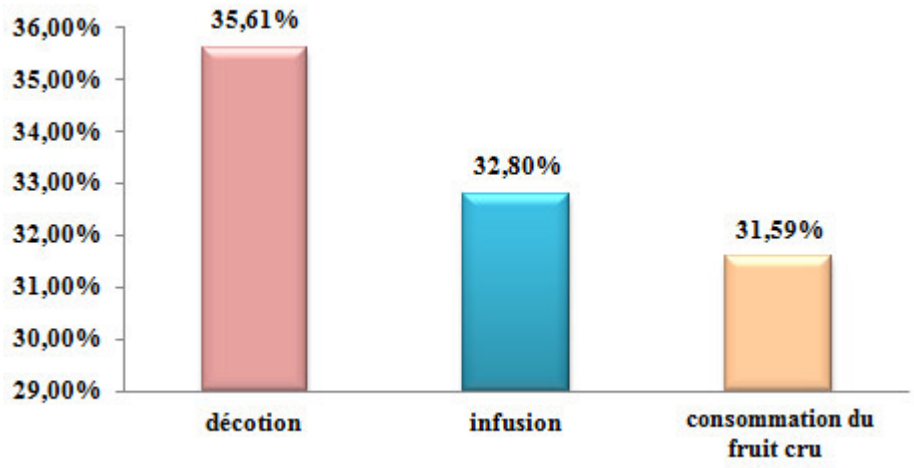


Figure 22: représentation de mode préparation.

VI-1-5-3- Domaines d'indication thérapeutique

L'enquête ethnobotanique a révélé que la majorité des espèces médicinales sont utilisées principalement contre les maladies de l'appareil circulatoire, notamment l'anémie et le cholestérol occupent la première place avec un taux de 38.53%, suivie des maladies de l'appareil digestif, avec un pourcentage de 34%, puis les maladies de l'appareil urinaire à un taux de 10.94%, l'appareil génital avec un taux de 9.65% et en fin les maladies dermiques (eczéma et l'acné) enregistre un taux de 6.88% (Figure 23).

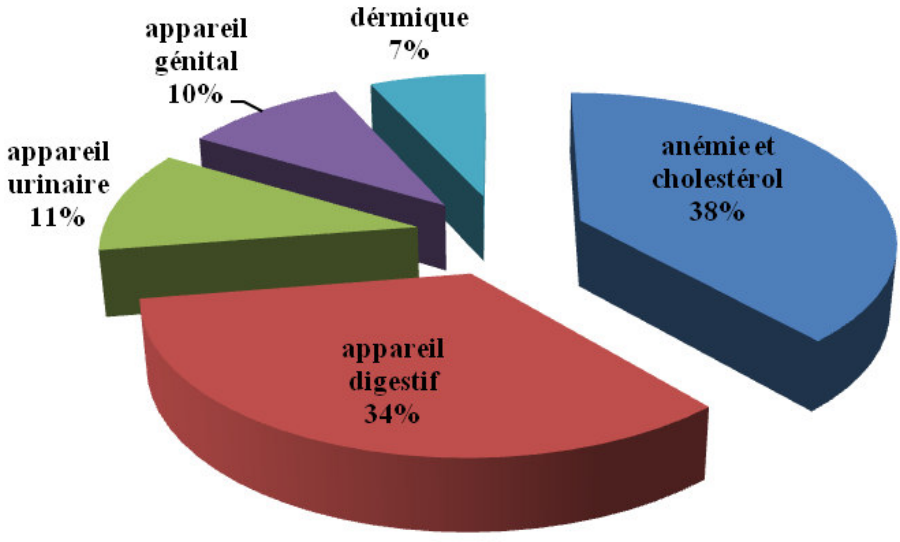


Figure 23: domaines d'indication thérapeutique.

Comparés aux autres phytothérapies observées à travers le monde, les résultats obtenus dans notre zone d'étude en Algérie restent concordants avec les études réalisées comme celles de (Ziyyat et Boussairi, 1998); (El-Hilaly et al. 2003); (Novais et al. 2004); (Pallauf et al. 2008); (Cornara et al. 2009); (Leonti et al. 2009); (Mariotto et al. 2008); (Afkir et al. 2008) et confirment les vertus thérapeutiques de la plante *Arbutus unedo* L.

De ce fait, nous disons que cette étude rapporte la première enquête quantitative ethnobotanique dans les 4 sites sélectionnés dans l'ouest algérien. Elle nous a permis d'inventorier la fréquence d'utilisation de la plante médicinale *d'Arbutus unedo* L. dans les stations de Tessala, Tenira, Zegla et Baudens (Sidi Bel Abbes), El Marsa, Djbel Guezoul et Terni qui renferment des substances actives d'un intérêt thérapeutique certain.

La phytothérapie traditionnelle reste actuellement sollicitée par la population ayant confiance aux usages populaires et n'ayant pas les moyens de supporter les conséquences de la médecine moderne; Ainsi, le présent travail a été mené dans le but de réaliser un inventaire le plus complet possible de la plante médicinale *Arbutus unedo* L. utilisée dans ces régions et de réunir les informations concernant les usages thérapeutiques pratiqués.

De point de vue ethnobotanique et pharmacologique, le feuillage et la racine constituent les parties favorisés des utilisateurs locaux. De même, la décoction et l'infusion sont les formes les plus pratiquées. Sur l'ensemble des maladies traitées, les maladies de l'appareil circulatoire et les affections digestives représentent les maladies les plus citées, suivies par les maladies de problèmes uro-génitaux et les infections cutanées.

La diversité de thérapies recensées dans la zone d'étude nous a fourni des informations inédites et constitue une véritable richesse culturelle. C'est pourquoi, les présents résultats bien que préliminaires pourraient également servir de base pour de nouvelles molécules bioactives ayant un potentiel thérapeutique qui permettront d'orienter et de guider la recherche pharmacologique.

VI-2- Etude phytochimique

VI-2-1- extraction

La préparation des extraits à partir du fruit *A.unedo* L. a été effectuée par des solvants à polarité décroissante, il s'agit du chloroforme, acétate d'éthyle, et le 1-butanol. Cette extraction a permis d'obtenir quatre fractions : la fraction chloroformique, la fraction d'acétate d'éthyle, du 1-butanol, et la fraction aqueuse. L'aspect et la couleur des extraits sont reportés dans le tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6: Aspect et couleur de différents extraits d'*Arbutus unedo* L.

Extrait	Aspect	Couleur
Chloroforme	Poudre	Jaune
Acétate d'éthyle	Pâteux	brune
1-butanol	Pâte collante	Couleur de miel
Aqueux	Pâte collante	Marron foncé

La concentration des composés phénoliques (phénols totaux et flavonoïdes) et leur pouvoir antioxydant ont été déterminés au niveau de l'extrait aqueux, du 1-butanol, du chloroforme et celui d'acétate d'éthyle, par contre le taux des tanins condensés a été quantifié au niveau de l'extrait méthanolique.

Les résultats du rendement de chaque extrait porté au 100 g de matière végétale sèche sont portés dans le tableau 7.

Nous constatons que le rendement le plus élevé a été observé dans l'extrait 1-butanol, de la région d'El Marsa, à raison de 1.89 g pour 100 g de matière végétale, suivi par l'extrait aqueux de la région de Tiaret (1.75 g), et enfin l'extrait du chloroforme qui possède le plus faible rendement avec (0.25 g) de la région de Tiaret. Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents (Figure 24).

Tableau 7 : Résultats des rendements de différents extraits des fruits séchés d'*A.unedo.*

Extrait	Rendement (%)		
	Terni	**Tiaret**	**El Marsa**
Chloroforme	**0.45 ± 0.02**	**0.25 ± 0.06**	**0.37 ± 0.05**
1-butanol	**0.78 ± 0.02**	**0.34 ± 0.09**	**1.89 ± 0.09**

Acétate d'éthyle	**1.38 ± 0.09**	**0.44 ±0.09**	**1.52 ± 0.09**
Aqueux	**1.42 ± 0.09**	**1.75 ± 0.16**	**0.50 ± 0.02**

Chaque valeur est la moyenne de trois mesures ± écart-type.

Figure 24: Aspect, couleur des quatre extraits obtenus à partir du fruit *Arbutus unedo* L. (Cliché, K. Bouzid, 2013).

Il est important de souligner que le choix des solvants, ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud et à froid), ont un impact directe sur la teneur des composés phénoliques et par conséquent sur leurs activités biologiques (Lee et al., 2003).

VI-2-2-Résultats de l'étude quantitative

VI-2-2-1- Dosage des phénols totaux

L'étude quantitative des extraits bruts d'*Arbutus unedo* L., au moyen des dosages spectrophotométriques, a pour objectif la détermination de la teneur des phénols totaux et des flavonoïdes.

Les phénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm.

La quantité des phénols totaux a été rapportée en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EAG/mg Ps).

À partir de la courbe d'étalonnage, la concentration des phénols totaux varie de 12.75 à 48.23mg EAG/g Ps.

Les extraits de la région d'El Marsa (wilaya de Chelef) révèlent les valeurs les plus remarquables par rapport aux extraits des autres régions.

Ainsi, l'extrait d'acétate d'éthyle, du 1-butanol et du chloroforme d'El Marsa enregistrent des taux de 48.23 mg EAG/g, 45.65 mg EAG/g et de 32.46 ± 0.59 mg EAG/g respectivement. Suivi de l'extrait 1-butanol, d'acétate d'éthyle et du chloroforme de la région de Tiaret avec un taux de 34.17 mg EAG/g, 32.84 ±0.53 mg EAG/g et 29.46 ± 0.34 mg EAG/g, respectivement.

Par contre les extraits de la région de Terni (wilaya de Tlemcen) renferment des teneurs moins importantes que ceux des deux régions citées ci-dessus, avec une teneur de 23.48 ± 0.41 mg EAG/g pour l'extrait de 1-butanol, 22.02 ± 0.38 mg EAG/g pour l'extrait du chloroforme, et 14.75 ± 0.08 mg EAG/g pour l'acétate d'éthyle.

La fraction aqueuse renferme la quantité en phénols totaux la moins importante, pour les trois zones d'étude, avec une valeur de 26.57 ±0.55 mg EAG/g, pour l'extrait d'El Marsa, 18.15 ± 0.12 mg EAG/g pour celui de Terni et enfin 12.75 ± 0.06 mg EAG/g pour celui de Tiaret (Tableau 8) (Figure 25).

Tableau 8 : La teneur des phénols totaux dans les extraits d'*Arbutus unedo* L.

Extrait	Phénols totaux (GAE mg / g d'extrait)		
	Terni	Tiaret	El Marsa
Chloroforme	22.02 ± 0.38	29.46 ± 0.34	32.46 ± 0.59
1-butanol	23.48 ± 0.41	34.17 ± 1.36	45.65 ± 0.26
Acétate d'éthyle	14.75 ± 0.08	32.84 ±0.53	48.23 ± 0.81
Aqueux	18.15 ± 0.12	12.75 ± 0.06	26.57 ±0.55

Chaque valeur est la moyenne de trois mesures ± écart-type.

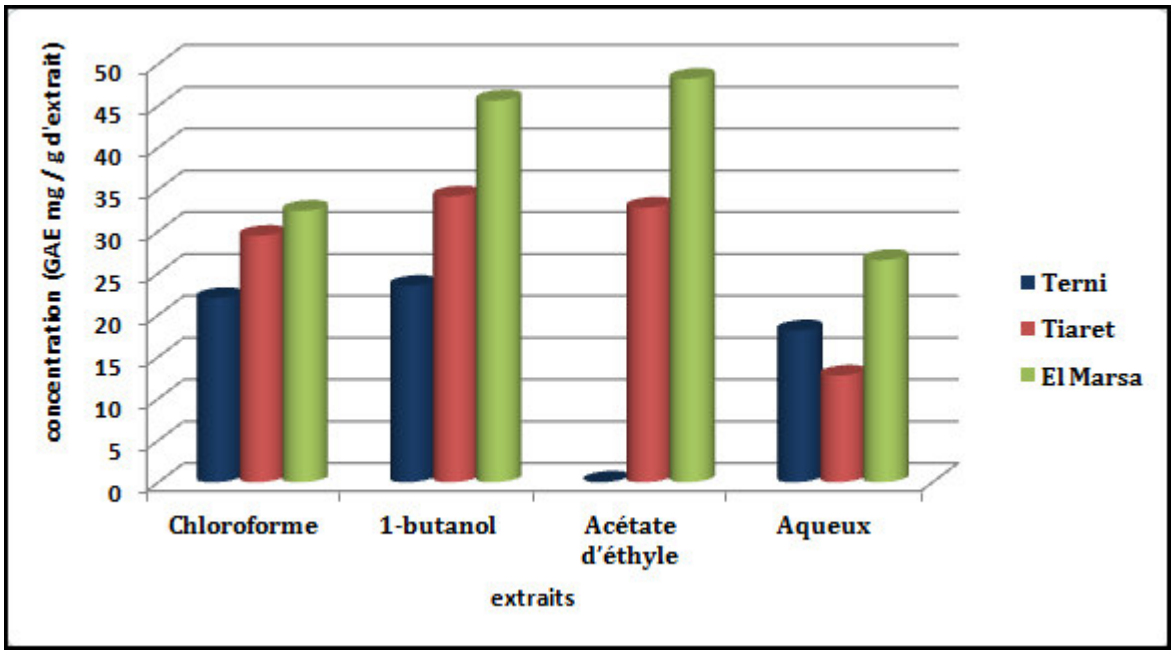


Figure 25: comparaison des teneurs des polyphenols entre différents extraits d'*A. unedo* L.

En comparant nos résultats avec les valeurs trouvées par (Doukani et Tabak, 2014) qui a travaillé sur le fruit d'arbousier provenant de la wilaya Tlemcen et de Tiaret, nous constatons que les teneurs sont similaires aux notre, avec des concentrations de 17.025 ± 0.148 mg GAE/g d'extrait et 14.74 ± 0.515 mg GAE/g d'extrait**,** respectivement. Ces valeurs sont enregistrées pour l'extrait d'acétate d'éthyle.

En parallèle, les travaux réalisés sur l'arbousier, dans différentes régions du monde, montrent que la teneur total des composés phénoliques n'est pas toujours la même que celle de l'arbousier originaire d'Algérie.

Ce pendant, les études de Barros et al. (2010) qui a travaillé sur l'arbousier d'origine de San Martín de Valdeiglesias (province de Madrid, Centre de l'Espagne) indiquent un montant de 126,83 ± 6,66 mg GAE / g d'extrait, tandis que Heinrich (2005) qui a traité l'arbousier d'Espagne rapport une valeur de 37,6 mg GAE / g d'extrait.

D'autre part, Fortalezas et al. (2010) indiquent 16,46 ± 3,66 mg GAE par g de poids sec, Tavares et al. (2010) ont trouvé environ 18 mg GAE par g des fruits secs, tandis que Alarcão-e-Silva et al. (2001) se réfèrent 15,5 ± 0,6 mg équivalents par g de poids sec comme quantité de composés phénoliques totaux présents dans les fruits.

En revanche, Fortaleza et al. 2010, qui a travaillé sur l'arbousier originaire de l'Espagne signale que seulement l'extrait chloroformique d'*A. unedo* qui donne un taux de composés phénoliques totaux similaire au notre (16,46 ± 3,66 mg GAE. G-1 ps).

Cette différence dans les teneurs peut être expliquée par les conditions environnementales, climatiques et période de collecte ainsi que par les facteurs génétiques et les conditions expérimentales.

Richter (1993) a signalé que la teneur et la composition chimique des métabolites secondaires varient en fonction d'un grand nombre de paramètres d'origine extrinsèque et intrinsèque et d'ordre technologique.

De ce fait, les facteurs extrinsèques touchent particulièrement l'origine géographique et les conditions écologiques (climat et sol). Ainsi, les rendements de ces composés et leur composition différente suivant l'origine géographique de la plante, la durée d'exposition au soleil, les températures minimales et maximales, le régime des vents et la pluviométrie.

Par contre, les facteurs intrinsèques sont des variables qui dépendent de la plante elle-même (Génétique, localisation et maturité). On cite comme exemple l'origine botanique, les chémotypes, les sites producteurs et le cycle biologique.

Les paramètres technologiques se résument surtout dans le mode d'extraction des composés naturels qui marque son empreinte sur la composition chimique et le rendement de ceux-ci. Ces multiples et divers paramètres sont liés entre eux et constituent un ensemble qui interfère au niveau du produit obtenu.

Dans des études antérieures, le méthanol, l'éthanol, l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le 1-butanol ont été utilisés pour extraire les phénols à partir des produits frais (Tan et al. 2012). La récupération des polyphénols à partir de matières végétales est influencée par leur solubilité dans le solvant d'extraction, le type de solvant, le degré de polymérisation des phénols, de l'interaction des phénols avec d'autres constituants de la plante et la formation des complexes insolubles (Galvez et al. 2005). En effet, Les différences dans la polarité des solvants utilisés peuvent aussi expliquer les différences de rendement d'extraction et leur activité antioxydante.

De ce fait, la polarité du solvant joue un rôle clé dans l'augmentation de la solubilité des composés phénolique (Naczk et Shahidi, 2006). Il est donc difficile de définir une procédure standard pour l'extraction des phénols des végétaux. Les solvants les moins polaires sont généralement considérés comme étant convenable pour l'extraction des phénols

lipophiles et les solvants polaires sont utilisés pour des phénols hydrophiles (Alothman et al. 2009).

VI-2-2- Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl3), la catéchine a été utilisé comme étalon. L'absorbance a été détermine à une longueur d'onde de 430 nm. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 9 et illustrés dans la figure 26.

Tableau 9 : La teneur totale des flavonoides dans les extraits d'*Arbutus unedo* L.

Extrait	Les flavonoïdes (CE mg / g d'extrait)		
	Terni	Tiaret	El Marsa
Chloroforme	24.36 ± 0.38	6.54 ± 1.14	52.65 ± 0.68
1-butanol	15.03 ± 0.06	3.61 ± 0.59	21.80 ± 0.41
Acétate d'éthyle	35.74 ± 0.57	5.59 ± 0.82	56.84 ± 0.60
Aqueux	12.88 ± 0.04	2.18 ± 0.10	17.98 ± 0.39

Chaque valeur est la moyenne de trois mesures ± écart-type.

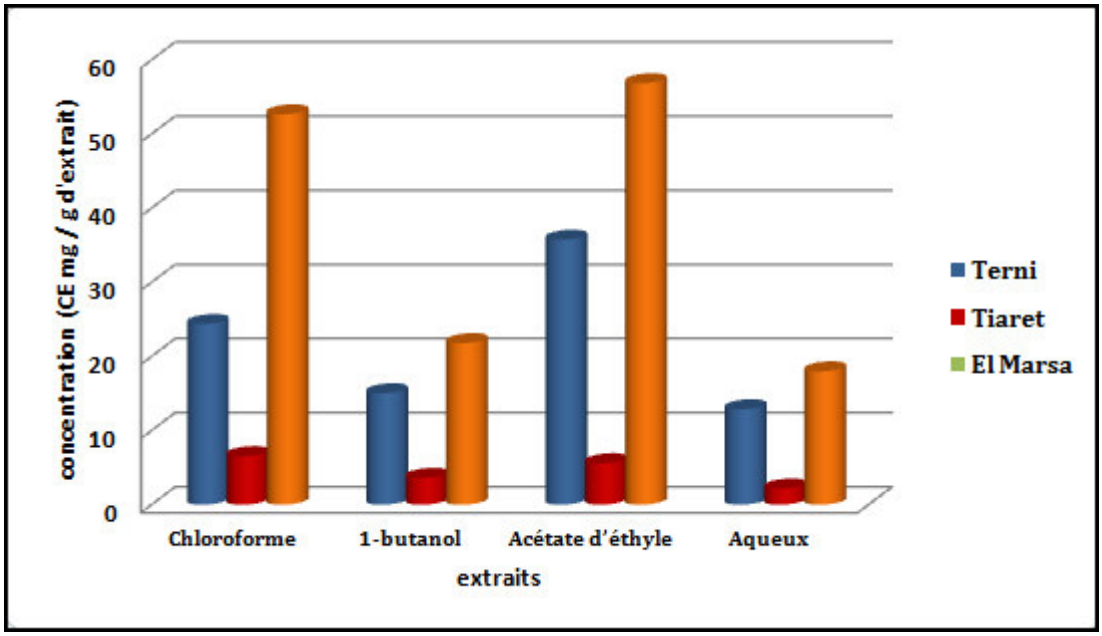


Figure 26: comparaison des teneurs des flavonoïdes entre différents extraits d'*A. unedo* L.

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la catéchine par milligramme de poids sec de l'extrait (mg EC/mg Ps). À partir de la courbe d'étalonnage, ayant pour équation: Y = 0,031x + 0,100 R^2 = 0,995, la concentration des flavonoïdes varie entre 2.18 mg EC/g Ps et 56.84 mg EC/g Ps.

Nous constatons, que les extraits de la région d'El Marsa (wilaya de Chelef) sont les extraits les plus riches en flavonoïdes, suivi par ceux de la région de Terni (wilaya de Tlemcen), puis ceux de Tiaret.

Ainsi, les fractions d'acétate d'éthyle, de chloroforme, de 1- butanol et la fraction aqueuse des fruits de la région d'El Marsa révèlent des valeurs très remarquables à raison de 56.84 CE mg / g d'extrait, 52.65 CE mg / g d'extrait, 21.80 ± 0.41 CE mg / g d'extrait et 17.98 ± 0.39 CE mg / g d'extrait**,** respectivement, suivie par les fractions d'acétate d'éthyle de la région de Terni avec un taux de 35.75 CE mg/g d'extrait, 24.36 ± 0.38 CE mg/g d'extrait pour le chloroforme puis 15.03 ± 0.06 CE mg/g d'extrait pour le 1-butanol enfin 12.88 ± 0.04 CE mg / g pour l'extrait aqueux.

Les extraits de l'arbousier de la région de Tiaret renferment la quantité la moins remarquable des flavonoïdes, avec une valeur de 6.54 ± 1.14 CE mg/g pour la fraction du chloroforme, 5.59 ± 0.82 CE mg/g d'extrait pour celle d'acétate d'éthyle, et 3.61 ± 0.59 CE mg/g d'extrait pour celle de 1-butanol, en fin 2.18 ± 0.10CE mg/g d'extrait pour la fraction aqueuse.

D'autre part, il est important de noter que la fraction d'acétate d'éthyle reste la plus riche en flavonoïdes pour les extraits des trois régions. Et la fraction aqueuse est la moins riche.

Des différences significatives sont alors constatées à travers cette étude. Ceux-ci peut être expliqué par la différence dans les conditions écologiques, telles que le type de sol, les conditions microclimatiques, position géographique, le site, l'âge et le stade végétatif des plantes et des fruits.

Les teneurs en flavonoïdes totaux obtenus sont supérieurs à celles rapportés par (Males et al. 2005) (0.29 ±0.03 CE mg/g poids sec).

VI-2-3- Dosage des tanins condensés

La quantification des tanins condensés a été effectuée par une méthode adaptée par Swain et Hillis (1959). Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale fraiche (mg EC/g) (Tableau 10) (Figure 27).

Tableau 10 : La quantification des tanins condensés des fruits d'*Arbutus unedo* L.

Fruit	Les Tanins (CE mg / g de matière fraiche)		
	Terni	**Tiaret**	**El Marsa**
	1.255 ± 0.021	**2.415 ± 0.021**	**1.02 ± 0.028**

Chaque valeur est la moyenne de trois mesures ± écart-type.

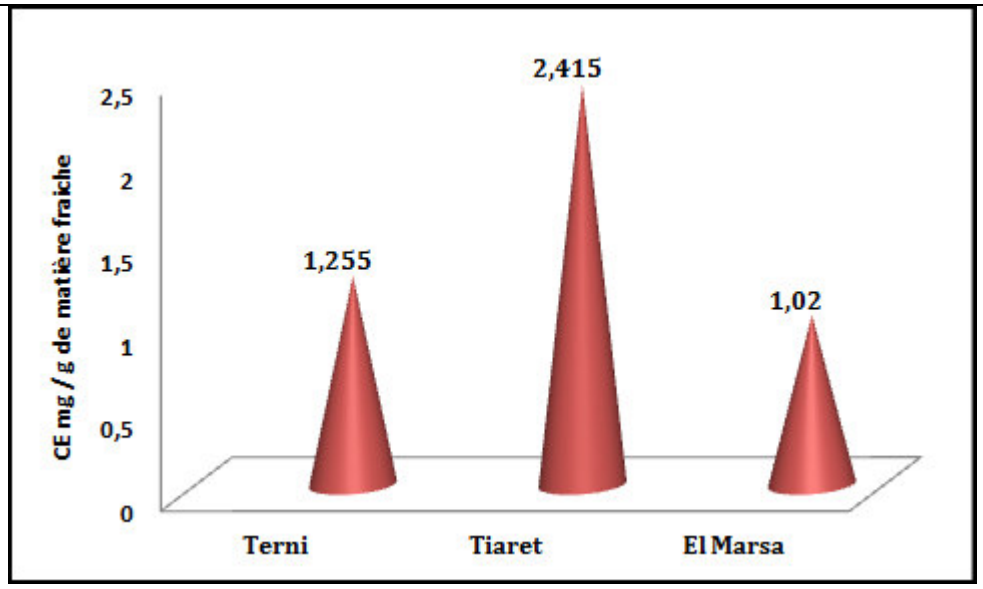


Figure 27: Teneurs en tanins condensés dans les fruits d'*Arbutus unedo* L.

Les résultats indiquent que les concentrations des tanins au niveau des extraits de l'arbousier de la région de Tiaret, Terni et celui d'El Marsa sont de l'ordre de 2.415 ± 0.021; 1.255 ± 0.021 et 1.02 ± 0.028 mg EC/g, respectivement, en remarquant que la teneur enregistrée dans les fruits de la région de Tiaret est la plus importante, suivi par celle e Terni puis celle d'El Marsa.

Alarcão-e-Silva et al. (2001) a mis en évidence le rôle des stades de la maturité du fruit d'arbousier dans la quantification des tanins condensés. Il a confirmé que la quantité totale des tanins baisse de plus en plus que le fruit devient mûr ; ainsi, ce taux passe de 3,13 ± 0,06 mg / g de matière sèche lorsque le fruit est en début de sa maturité à un taux de 1,75 ± 0,02 mg / g de matière sèche lorsque le fruit est rouge mature.

Ce taux de tanins se répercute sur le goût de ces fruits, qui sont considérés comme trop astringents quand ils sont verts, puis deviennent mois astringents et comestibles quand elles atteignent le stade de maturation et sont rouges; ce goût amer peut être dû à la grande quantité de tanins présents au niveau des fruits d'arbousier.

VI-3- Résultats de la caractérisation des flavonoïdes du fruit d'*Arbutus unedo* L.

Dans la continuité des travaux menés sur le potentiel phytochimiques des fruits d'*arbutus unedo* nous avons privilégié la caractérisation des flavonoïdes, en utilisant deux méthodes d'analyse distinctes.

Ce pendant, on a opté pour l'étude des échantillons d'une région interne qui se trouve à une haute altitude des hauts plateaux: Il s'agit des extraits des fruits de la région de Tiaret, et les échantillons d'une région littorale qui se trouve à une basse altitude : Il s'agit de la région d'El Marsa (Ténès, wilaya de chelef). En plus, il faut signaler que les extraits de ces deux régions présentent l'activité antioxydante la plus intéressante.

D'autre part, le choix est porté sur deux méthodes d'identification distinctes :
La méthode d'analyse chromatographie de type HPLC est retenue pour la caractérisation des molécules contenues dans les extraits des fractions des échantillons de la région de Tiaret,
Et la méthode d'analyse de résonance magnétique nucléaire RMN, pour la caractérisation des molécules contenues dans les extraits des quatre fractions des échantillons de la région d'El Marsa.

VI-3-1-Indentification des molécules par Chromatographie à haute performance en phase liquide (HPLC) :

La chromatographie a été utilisée pour définir le contenu moléculaire des acides phénoliques des quatre extraits d'*A.unedo* L de la région de Tiaret.

Ainsi, le spectre de chaque composé est enregistré et les valeurs des déplacements chimiques sont comparées à celles des composés standards utilisés dans cette étude, et qui sont :

La Naringine,

L'Apigenine,

La Taxifoline,

La Catéchine, la sylibine et la Fisetine.

Les résultats de l'analyse HPLC portés sur le tableau n° 11 montrent que la taxifoline est absente dans tous les extraits des fruits. La catéchine et la fisétine sont présentes dans l'extrait chloroformique, alors que l'apiginine et la silybine sont présentent dans l'extrait 1-butanol.

En revanche, ces acides phénoliques n'ont pas été détectés dans l'extrait aqueux, tandis que l'extrait d'acétate d'éthyle ne contient que la naringine.

Les Chromatogrammes d'HPLC des standards et des différents extraits sont représentés dans les figures 26 et 28 ci-dessous.

Nous constatons clairement que les pics 1, 2, 3, 4 et 6 ont été positivement identifiés, la naringine, la catéchine, l'apiginine, la fisetine et la silybine respectivement, en comparant le temps de rétention, l'absorption et les spectres avec celle des standards (Figure 28 et 29 ci-dessus).

Les structures chimiques des composés flavonoïques identifiés dans les différents extraits des fruits d'*arbutus uedo.L* originaire de Tiaret sont reportées sur la figure n°30.

Tableau 11 : composés identifiés dans les différentes fractions flavonoïques de l'arbousier originaire de Tiaret par *HPLC.*

Extraits	**Molécules flavonoïques identifies**
Chloroforme	Catéchine et fisétine
1- butanol	l'apiginine et la silybine
Acétate d'éthyle	Naringine
Extrait aqueux	Néant

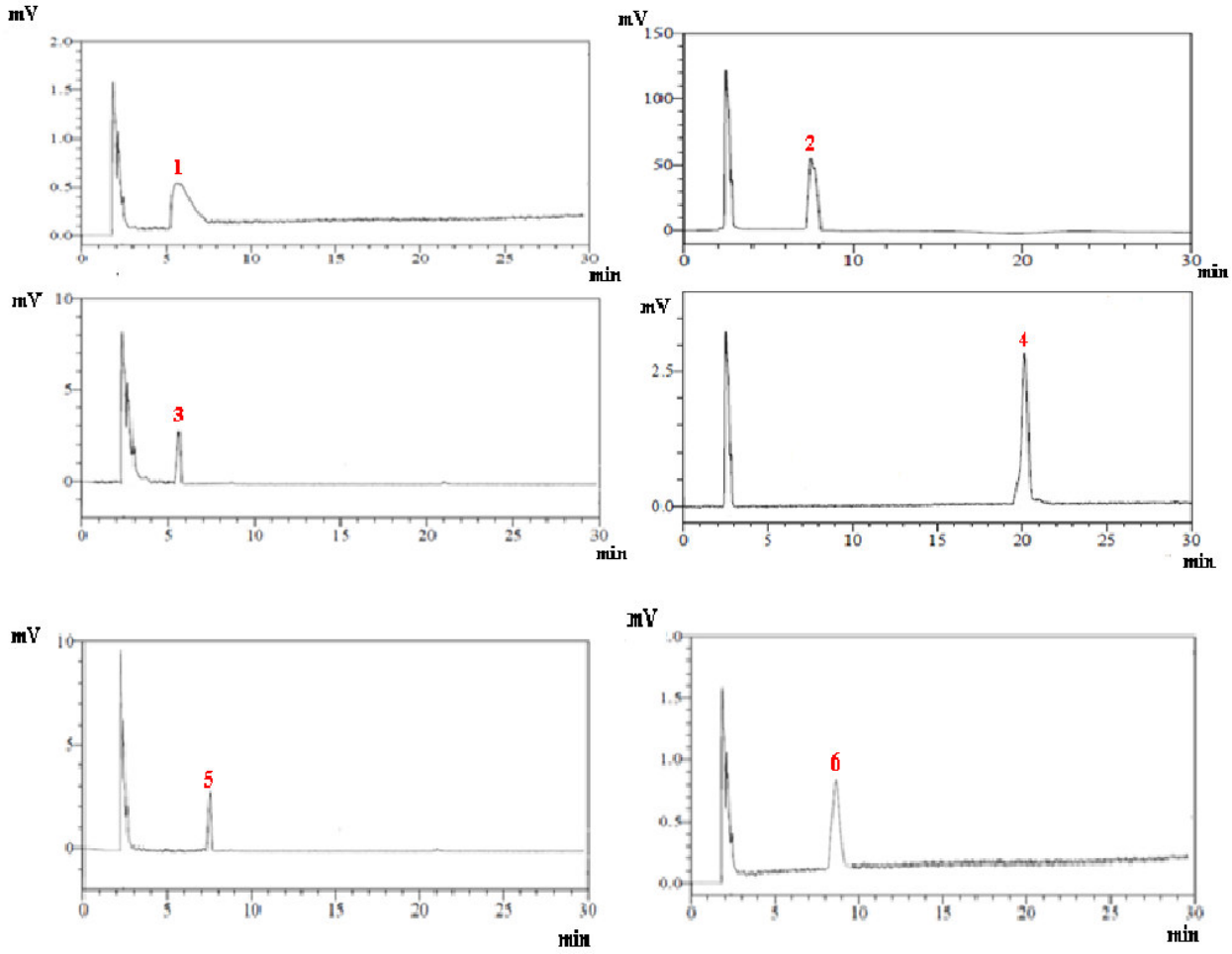


Figure 28: chromatogrames d'HPLC des standards à 280 nm

Piques: **1**, Naringine; **2**, Catechin; **3**, Apiginine; **4**, Fisetine; **5**, Taxifoline; **6**, Silybine.

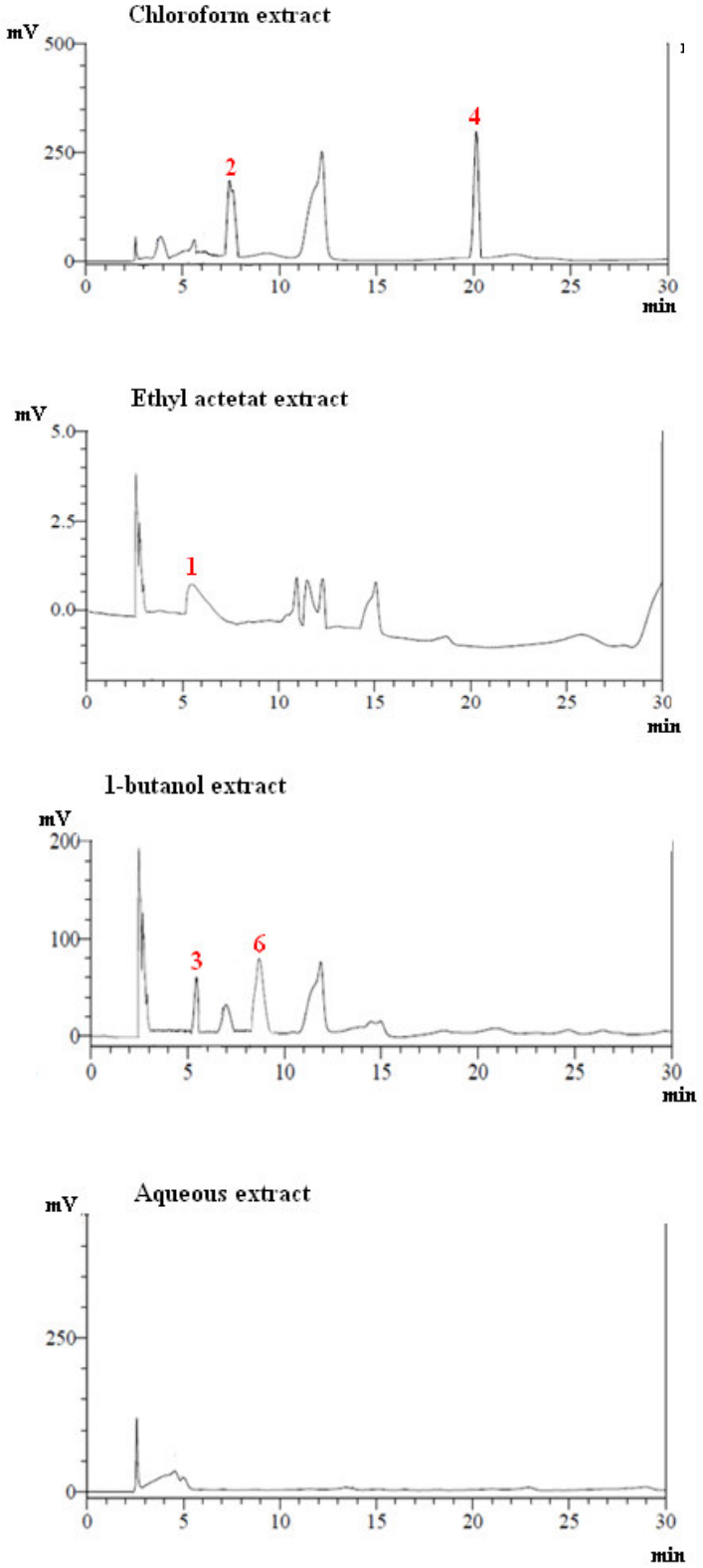


Figure 29: chromatogrames d'HPLC des extraits du fruit d'arbousier de Tiaret à 280 nm.

Piques: **1**, Naringine; **2**, Catechine; **3**, Apiginine; **4**, Fisetine; **6**, Silybine.

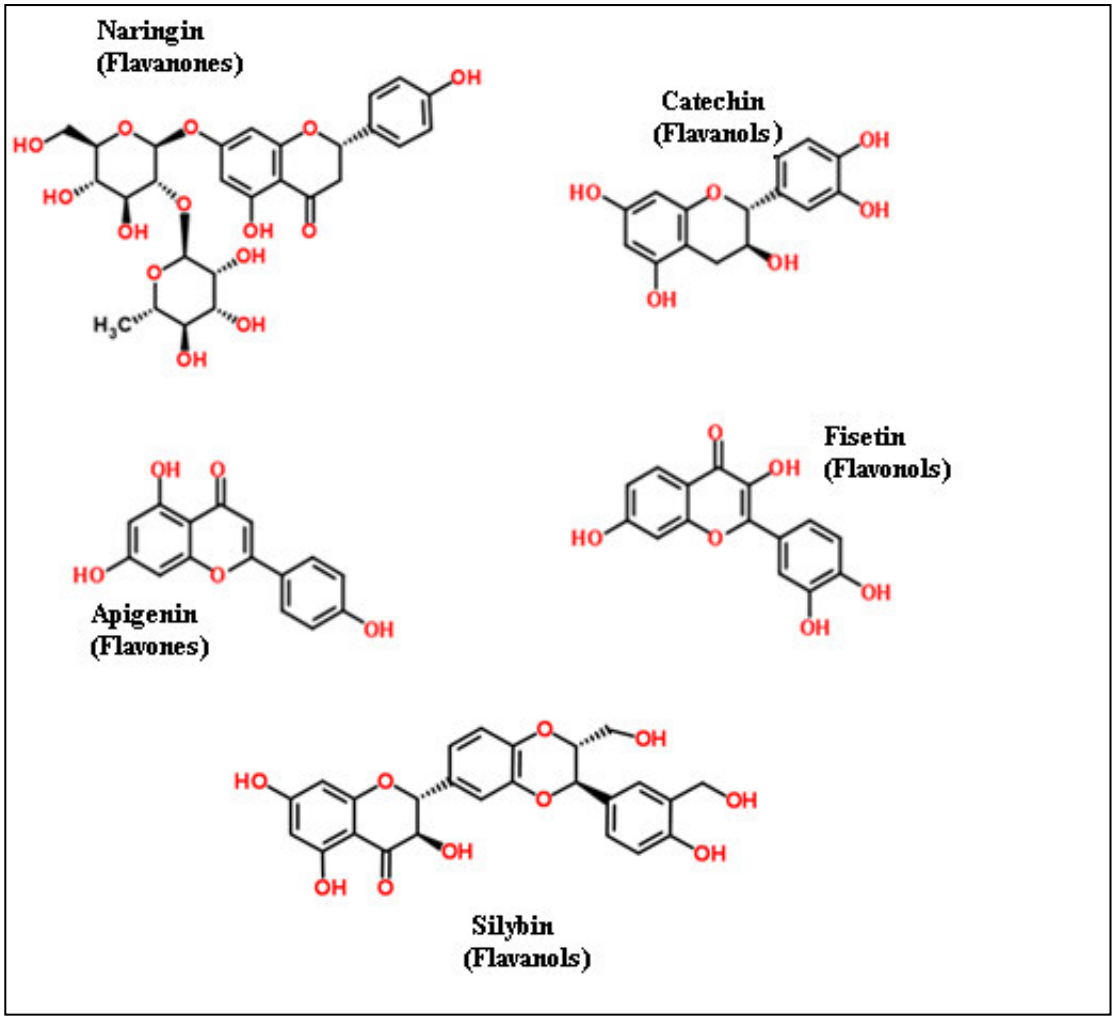


Figure 30: Structures des composés phénoliques détectées dans les extraits de fruits d'arbousier originaire de Tiaret.

VI-3-2- Indentification des molécules flavonoïques par RMN ^{13}C, 1H, UV-visible

La caractérisation des molécules des quatre fractions flavonoïques des fruits de l'arbousier a été déterminée par la méthode RMN C^{13} H^{1}.

Les spectres de masse ont été alors, enregistrés sur le spectromètre de type AEI MS-50, et les spectres IR sur le spectromètre de type Shimadzu IR 470 H^{1} et C^{13}. Elles sont enregistrées au 300 MHz et 75 MHz, respectivement. Les normes 1H et 13C des spectres RMN ont été obtenus à partir d'un mélange de solvant, $CDCI_3$ et CD_3OD.

Au niveau de la fraction de 1butanolde extraite des fruits d'arbousier d'El Marsa , nous avons pu isoler et identifier le composé 1 qui a pour structure brute $C_{22}H_{22}O_{11}$ nommé 2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (flavonoïde glycoside).

Ainsi, le spectre RMN 1H représenté dans a montré un doublet δ 6,45 (*J* = 1,8 Hz, H-6) et δ 6,75 (*J* = 1,8 Hz, H-8), ce qui indique la présence d'un cycle aromatique à tétra substitué.

Un autre doublet à δ 7,12 (*J* = 3,4 Hz, H-3'), 6,93 (J = 8,4 Hz, H-6') et 7,44 (*J* = 3,2, 8,2 Hz, H-5') a révélé la présence d'un autre cycle aromatique tri substitué. La position des deux maillots à δ 13,1 et 10,1 indique deux groupes hydroxyles, reliés étroitement à une fonction carbonyle affectée à la position OH-5.

Une forte singulet à δ 3,62 corrélée à C-4' (δ 145,81), indiquant la présence d'un groupement méthyle au niveau du OCH3-4'.

Un doublet à δ 5,07 (*J* = 7,2 Hz) représente le signale anomérique avec d'autres signaux dans la gamme de 3.3 à 4.7 pour δ relié à sucre en β.

D'autre part, dans le spectre RMN de 13C, le signal se dirige vers les champs faibles à 182,8 δ indiquant un groupe carbonyle. La corrélation de H-3 '(δ 7,11) à C-4' (δ 145,90) et C-5 '(δ 116,01); H-5 '(δ 7,45) à C-3' (113,6 δ), C-4" (δ 145,81) et C-6' (δ 120,23) et H-6' (6,91 δ) à C-1' (δ 121,40) et C-4' (δ 146,01) délectait la substitution en C-2' (OH) et C-4' dans l'anneau B. La corrélation entre le proton anomérique (δ 5,08) et la position de sucre C-7 (δ 163,01) a indiqué au C-7 la présence d'un sucre. Le sucre a été identifié comme D-glucose (Figure 32 et 33). A partir de toutes ces combinaisons et la masse moléculaire déterminée, on a pu identifier le composé au niveau de la fraction1-butanol, dont la structure chimique est donnée dans la figure 31.

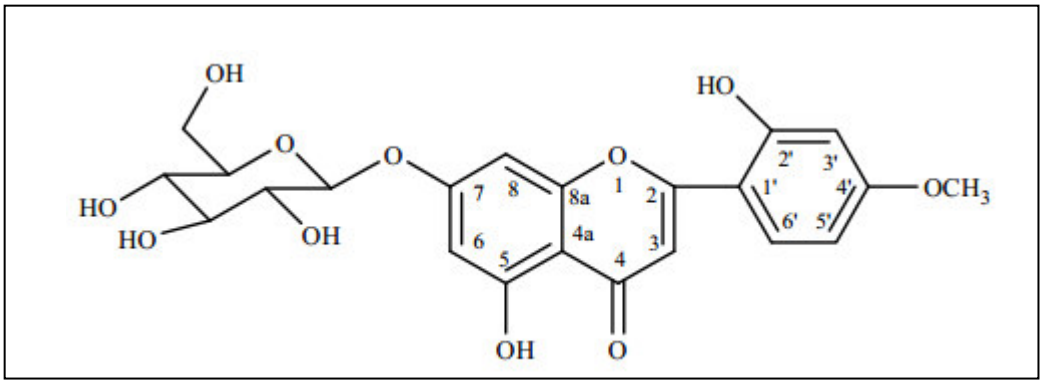


Figure 31 : structure chimique du 2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside.

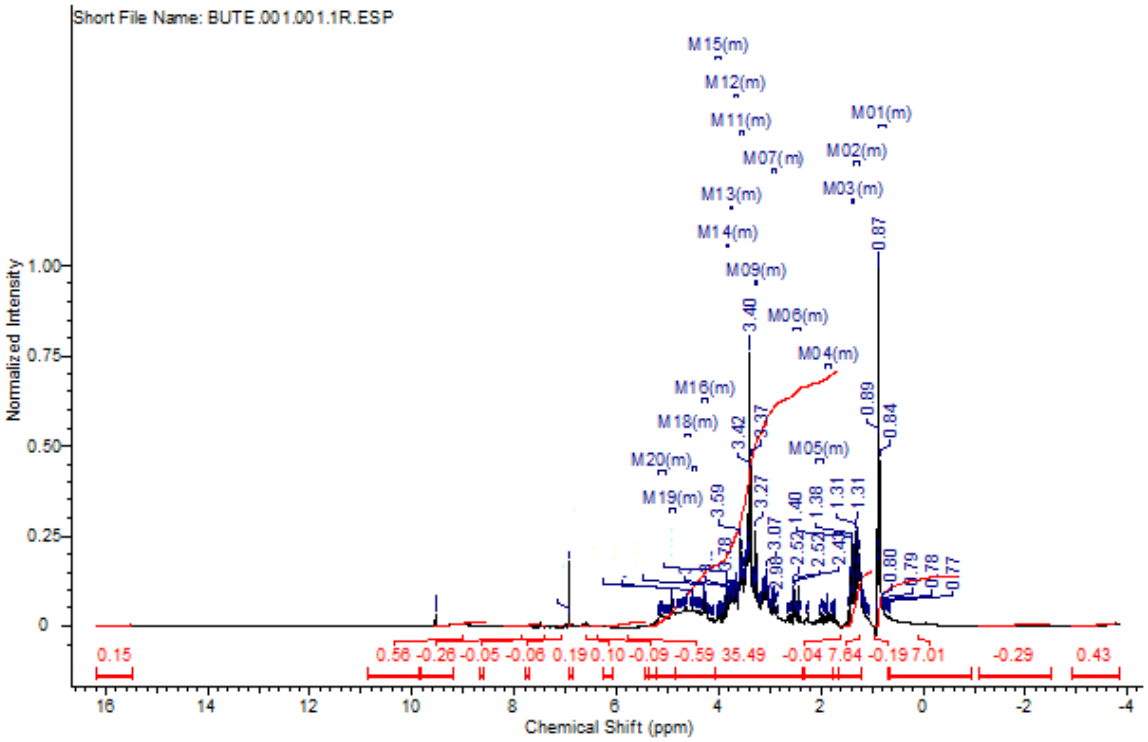


Figure 32 : spectre 1H du composé 1 (2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside)

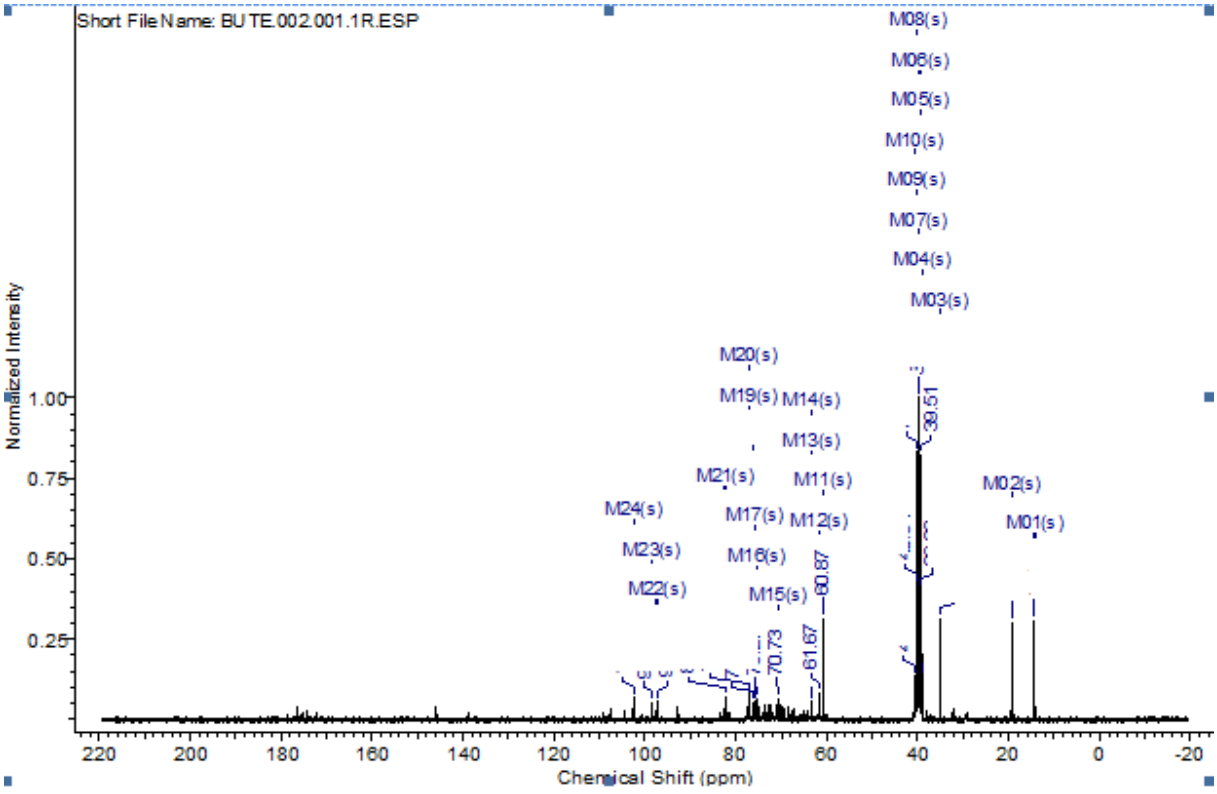


Figure 33 : spectre 13 C du composé 1 (2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside).

Par ailleurs, au niveau de la fraction aqueuse extraite des fruits d'arbousier d'El Marsa, un composé 2 a été identifié et isolé sous la formule moléculaire $C_{21}H_{22}O_5$ (Figure 34). Cela a été confirmé à partir du spectre C13-RMN qui a montré la présence de 21 signaux de carbone.

Un système complet de spin de trois protons signalé à partir du spectre COSY, avec trois doublets dans le spectre 1H-RMN à δ H 5,42 (H-2, dd, *J* = 12,8, 3,1 Hz), δ H 3,01 (H-3a, dd, *J* = 12,6, 16,6 Hz) et δ H 2,72 (H-3b, dd, *J* = 16,6, 3,1 Hz) indiquant que le cycle C est saturée.

En outre, le proton alkyle α-O substitué en δ H 5,43 (H-2) indique que le composé 2 est une flavanone. Le composé 2 est ainsi identifiée (-)-7,3′-dihydroxy-4′-methoxy-5′-(γ,γ-dimethylallyl) flavanone (5- deoxysigmoidin B-4′-methyl ether) (Figure 35 et 36).

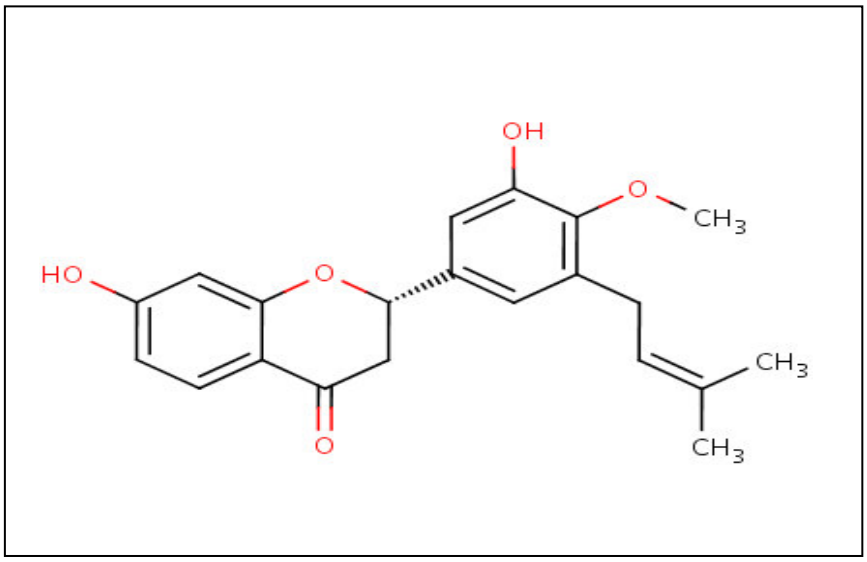


Figure 34 : structure du composé 2 (5- deoxysigmoidin B-4′-methyl ether)**.**

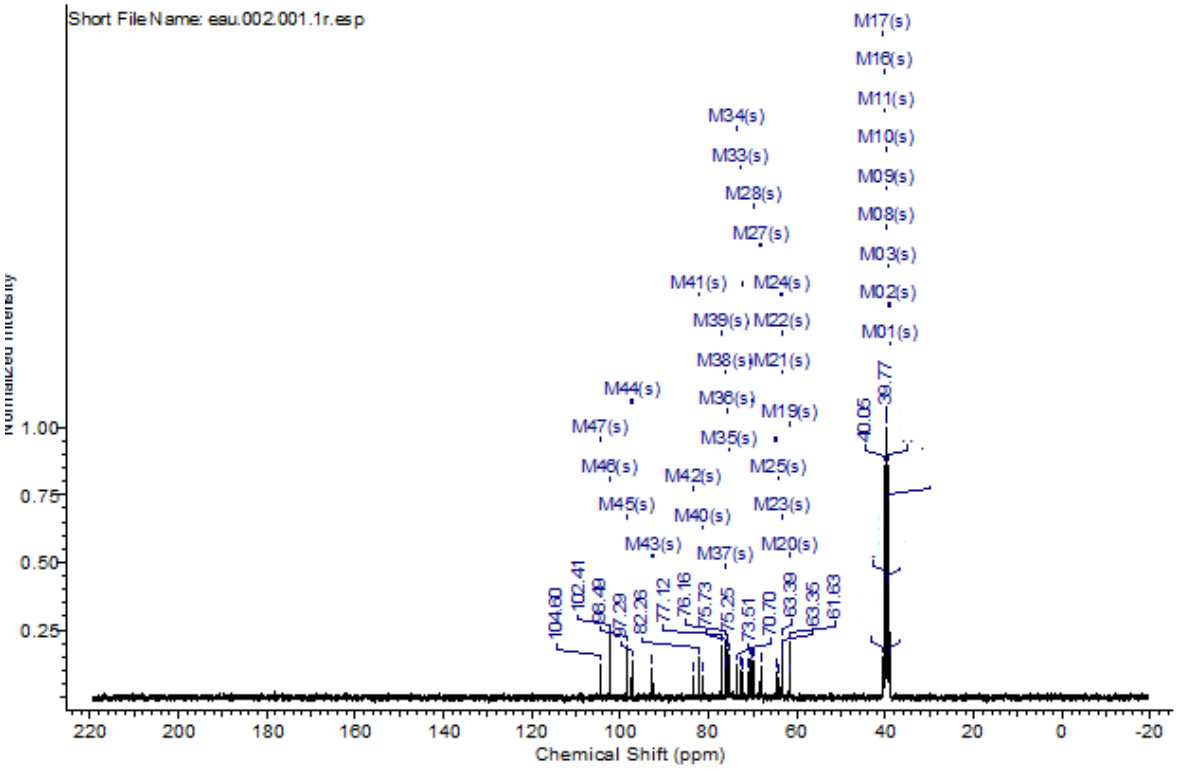


Figure 35: spectre 1H du composé 2 (5- deoxysigmoidin B-4′-methyl ether).

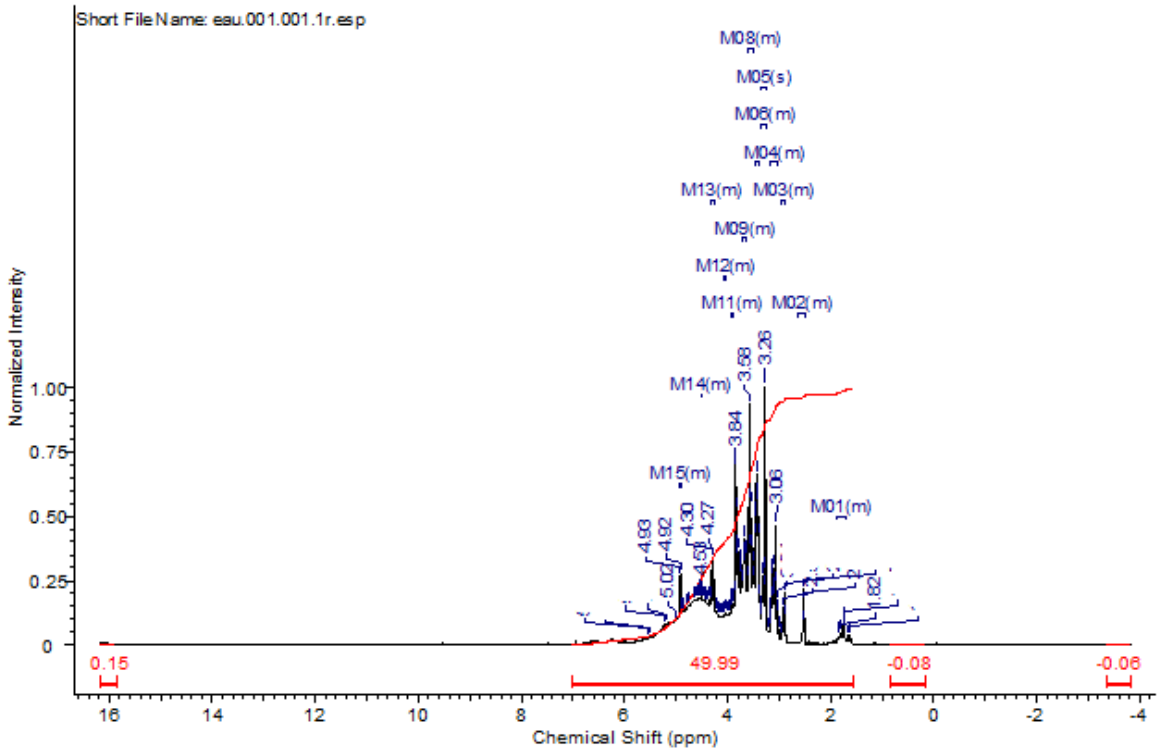


Figure 36 : spectre 13C du composé 2 (5- deoxysigmoidin B-4′-methyl ether**).**

Toute fois, à cause d'un manque d'une banque de données exhaustif au niveau des laboratoires d'analyse « chimie organique » dans les quels on a effectué notre étude, nous nous sommes retrouvés dans l'incapacité d'identifier les composés signalés par les spectres RMN de la fraction d'acétate d'éthyle et celle du chloroforme.

VI-4- Valorisation *d'Arbutus unedo* par la détermination du pouvoir antioxydant

L'activité anti radicalaire des différents extraits a été évaluée par le test au DPPH (Figure 37), qui se manifeste par un virage de coloration du violet au jaune. Celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité et l'efficacité des résultats ; il est aussi employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi et al., 2008).

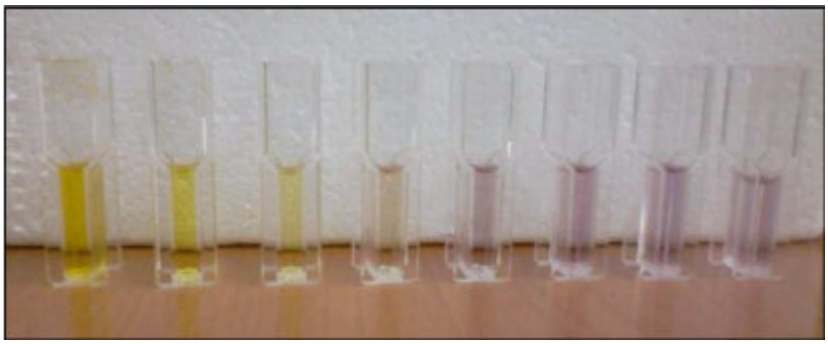


Figure 37: Détermination de l'activité anti radicalaire par la solution
(Cliché, K. Bouzid, 2013).

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, le tocophérol, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (Ozkan et al. 2007). Les composés phénoliques contenus dans les extraits d'*A.unedo* L sont, de ce fait, responsables de cette activité antioxydante.

Nous rappelons que l'activité antioxydante des extraits est déterminée à partir des IC50, qui correspondent à la concentration nécessaire pour réduire 50% du radical DPP.

Ainsi, les résultats de cette étude sont portés dans le tableau ci-contre Tableau n°11 et illustrés dans la figure n°38.

Tableau 11 : valeurs des IC50 trouvées dans les extraits d'*Arbutus unedo* L.

Extrait	(IC 50 mg / g d'extrait)		
	Terni	**Tiaret**	**El Marsa**
Chloroforme	0.082	0.015	0.019
1-butanol	0.01	0.022	0.024
Acétate d'éthyle	0.052	0.009	0.005
Aqueux	0.021	0.048	0.028

Chaque valeur est la moyenne de trois mesures ± écart-type.

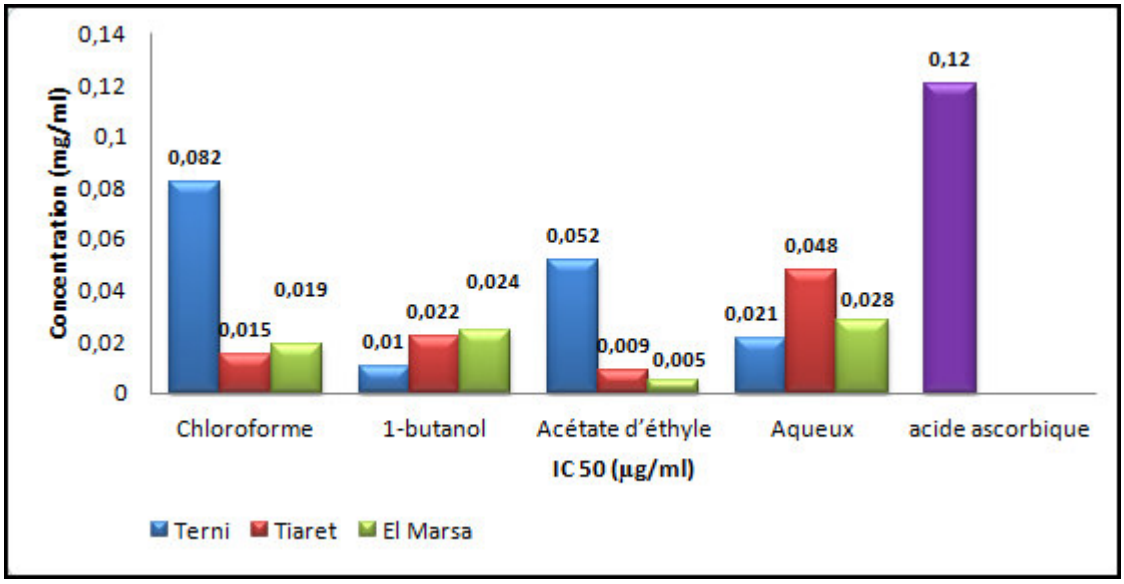


Figure 38: Activité antioxydante au test diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH) des différents extraits d'*A. unedo* L.

La valeur IC50 est un paramètre largement utilisé pour mesurer l'activité de piégeage des radicaux libres. Un IC50 inférieure indique une activité anti-oxydante supérieure (Maisuthisakul et al. 2007).

Selon les résultats enregistrés (Tableau 13, Figure 38), les extraits d'El Marsa, de Tiaret et de Terni sont dotés d'un pouvoir antioxydant remarquable si on le compare à celui de l'acide ascorbique, notamment celui de la région de Tiaret et d'El Marsa ; d'ailleurs c'est la raison pour la quelle on a opté pour la caractérisation des flavonoïdes de ces deux régions

pour pouvoir identifier et isolé par la suite, les molécules responsables de ce pouvoir antioxydant.

En revanche, Nous constatons que pour les extraits d'El Marsa et ceux de Tiaret, la fraction la plus intéressante, au point de vue activité antioxydante, est celle d'acétate d'éthyle (0,05mg/ml ; 0,09mg/ml) du 1- butanol (0,024mg/ml ; 0,022mg/ml), ensuite du chloroforme (0,019mg/ml ; 0,015mg/ml) puis de l'extrait aqueux (0,028 mg/ml; 0,021mg/ml), respectivement.

Par contre pour les extraits de Terni, la fraction la plus intéressante est celle du 1-butanol puis celle de l'extrait aqueux, avec une IC50 de 0,015mg/ml et 0,021mg/ml, respectivement. Les deux autres fractions (chloroforme et acétate d'éthyle) présentent une activité moins remarquable mais plus ou moins acceptable (0,052mg/ml ; 0,082 mg/ml) respectivement.

Par ailleurs, (Alarcão-E-Silva et al., 2001) indique que les valeurs de IC 50 sont de l'ordre de 0.58±0.03 mg / g lorsque les fruits sont immatures, et 0.25±0.02 mg / g lorsque les baies sont rouges matures, de ce fait, le pouvoir antioxydant est d'autant plus intéressant que le fruit soit mûr.

Les résultats trouvés par le même auteur indiquent que nos échantillons présentent une activité meilleure et que les conditions écologiques et l'origine géographique ainsi que le capital génétique ont encore une fois leurs mots à dire dans cette activité biologique.

Les fruits d'*A. unedo* ont été caractérisés comme de bonnes sources d'antioxydants, avec leurs propriétés antioxydantes due à différents groupes de composés.

Pour l'*A. unedo*, cette activité est attribuable à la forte teneur en flavonoïdes, (constitués principalement par des proanthocyanidines, cyanidine et delphinidine glycosides), l'acide ellagique et son dérivé diglucoside, la vitamine C et E et des caroténoïdes (Pallauf et al. 2008).

Ainsi, plusieurs études montrent que la capacité de piégeage DPPH est un indice fiable du potentiel antioxydant. La différence dans l'activité antioxydante des extraits peut être attribuée à la différence de la teneur en flavonoïdes phénoliques ainsi que la composition de ces composés phytochimiques bioactifs.

Chanter et al. (2007), Révèle que les fruits et légumes ont des valeurs élevées de nutriments et de composés phytochimiques qui présentent des fonctions antioxydantes importantes.

Naturellement, les fruits et légumes comprennent une énorme quantité d'antioxydants qui réduisent les radicaux et protègent les cellules du corps. Par conséquent, les résultats confirment que le fruit d'*Arbutus unedo* L. présente une excellente activité antioxydante. Plusieurs études ont montré le contenu phénoliques d'extraits de plantes contribuent à l'excellent antioxydant / capacité de piégeage des radicaux (Hamza et *al,* 2013).

Des études antérieures ont confirmé que les composés phénoliques sont les principaux constituants antioxydants dans les plantes médicinales, les légumes, les fruits et les épices (Cai et al. 2004). Normalement, l'effet de la capacité antioxydante dépend de la solubilité de l'antioxydant, ils sont solubles dans l'eau ou soluble dans les lipides (Hosseinian et al. 2007).

Conclusion générale

Conclusion générale

L'étude que nous avons entreprise s'inscrit dans les perspectives de la caractérisation et la valorisation des espèces végétales médicinales poussant à l'état spontané dans l'ouest algérien, sachant que l'usage des plantes médicinales constitue un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années, grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimique contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants.

Dans le même contexte, et pour la première fois dans l'ouest algérien, nous avons mis en relief les potentialités thérapeutiques de l'*Arbutus unedo* L. de trois localités différentes situées dans l'ouest algérien, à travers la caractérisation du profil chimique de ses composés phénoliques,(détermination de leur composition chimique), leur quantification et la détermination de leurs pouvoirs anti oxydant, qui lui permet d'être, éventuellement, valorisée dans des secteurs industriels variés.

D'autre part, l'utilisation de l'arbousier en abondance, depuis l'antiquité, en médecine traditionnelle dont les vertus thérapeutiques sont reconnues, nous a incitées, tout d'abord, à entamer une enquête ethnobotanique. D'ailleurs, le critère du choix de cette espèce est dû essentiellement au fait qu'elle est largement utilisée dans la région, et qu'elle fait partie intégrante de l'arsenal thérapeutique traditionnel de la population locale. L'enquête effectuée dans quatre zones choisies pour cette étude, a révélé une multitude de résultats sur l'utilisation de cette plante médicinale, notamment sur les organes utilisés et sur les maladies traitées. Elles montrent que:

-Les analphabètes prédominent avec un taux de 60.27%, par contre les intellectuelles représentent un pourcentage de 8,48%.

-Les racines et les feuilles représentent les parties les plus utilisées, elles occupent la première place avec un pourcentage de (35.26%) et (30%) respectivement. Quant aux fruits et l'écorce, ils occupent la deuxième place avec un pourcentage respectif de 21% et 13.74%.

-Pour les maladies traitées, ce sont les maladies de l'appareil circulatoire notamment l'anémie et le cholestérol élevé dans le sang qui occupent la première place, avec un taux de 38.53%, ensuite les maladies de l'appareil digestif, avec un pourcentage de 34%, puis les maladies de l'appareil urinaire avec un taux de 10.94%, celles de l'appareil génital avec un taux de 9.65% et enfin, les maladies dermiques (eczéma et l'acné) avec un taux de 6.88%.

Il est de ce fait indispensable de noter que cette étude ethnobotanique de l'arbousier a fait l'objet d'un article accepté pour publication.

Dans la deuxième partie, la quantification par les méthodes spectrophotomètriques a permis de déterminer au niveau du fruit d'arbousier des trois localités :

Les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu, en révélant que l'extrait d'acétate d'éthyle d'El Marsa représente le taux le plus élevé 48.23 mg EAG/g, suivi par celui de Terni avec une valeur de 35.74 mg EAG/g, puis celui de Djbel Ghezoul en enregistrant une valeur de 34.17 mg EAG/g.

La technique de spectrophotométrie est aussi utilisée pour déterminer la teneur des flavonoïdes en utilisant le test de trichlorure d'aluminium, en enregistrant la valeur la plus importante (56,84mg.EC/g Ps), dans l'extrait d'acétate d'éthyle Correspond à celui de la localité d'El Marsa par contre la teneur la plus basse (2.18 mg EC/g Ps), a été trouvée dans l'extrait aqueux de la localité de Tiaret

Pour compléter cette étude phytochimique quantitative, les tannins ont aussi été quantifiés par le test de la catéchine.

Ainsi, le fruit de l'arbousier de trois localités (Terni, El Marsa, Djbel Ghezoul), présente des teneurs en tannins allant de 1.02 mg EC/ g MF, 1.255 mg EC/ g MF à 2.415 mg, respectivement EC/ g MF.

Par ailleurs, au cours de la caractérisation des flavonoïdes nous avons privilégié l'utilisation de la chromatographie en phase liquide à haute performance et la Résonance Magnétique Nucléaire du C^{13}, et H^{1} pour l'analyse de la composition chimique du mélange flavonoïque. Cette dernière technique permet d'identifier les constituants d'un mélange complexe sans séparation préalable ou avec une séparation réduite. Elle est assistée par un logiciel d'aide à l'identification et de bibliothèque de spectre qui n'est pas tout à fait complète, d'ailleurs c'est la cause principale pour la quelle nous n'avons pas pu identifier certains spectres de nos échantillons.

L'analyse détaillée du mélange des flavonoïdes du fruit d'arbousier originaire de Tiaret par la méthode HPLC a pu identifier cinq composés et qui sont :

la Naringine; la Catechine; l'Apiginine; la Fisetine; la Silybine

Par contre l'analyse détaillée des flavonoïdes du fruit d'arbousier originaire d'El Marsa a révélé deux composés. Leurs structures ont été identifiées par la méthode RMN. Il s'agit de: 2',5-dihydroxy-3'-methoxyflavone-7-O-β-D-glucopyranoside (flavonoïde glycoside) et le 5-deoxysigmoidin B-4′-methyl ether (flavanone).

D'autre part, Après la caractérisation chimique des flavonoïdes de l'*Arbutus unedo L.,* nous avons testé le potentiel de ces produit naturels, en étudiant le pouvoir antioxydant des quatre extraits (chloroforme, acétate d'éthyle, 1-butanol, eau) du fruit de l'arbousier par le test au DPPH. Tous les extraits ont révélé des réponses inhibitrices à différents niveaux à piéger les radicaux DPPH, par rapport à l'acide ascorbique.

En effet, la capacité antioxydante la plus importante est observée dans l'extrait d'acétate d'éthyle de la région d'El Marsa (Wilaya de Chlef), qui est de l'ordre de 0,005 mg / ml. Cette propriété est en corrélation avec la teneur en phénols totaux, suivi par celle de la région de Tiaret qui est de 0.009 mg/ml et enfin celle de Tlemcen

De ce fait, l'origine géographique et les conditions écologiques pourraient être la cause de cette variabilité que ce soit pour le rendement ou la caractérisation des substances phénoliques.

En perspectives, on compte caractériser les composés naturels que renferment les autres organes de la même espèce notamment les feuilles, les racines et les rameaux. Ceux –ci pourrait peut être mettre en évidence d'autre composés possédant un intérêt pharmaceutique, on recommande aussi de réaliser d'autres test du pouvoir antioxydant et antimicrobien.

A la fin de cette contribution, nous pensons qu'il serait intéressant de mener d'autres étude sur d'autres plantes médicinales spontanées qui n'ont pas été encore valorisées, pour les caractériser et recommander leur domestication et du coup leur valorisation dans le domaine industriel. Toute fois, il est indispensable avant l'utilisation de ces composés naturels dans divers secteurs, d'entamer des études toxicologiques et pharmacologiques approfondies, pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ces composés naturels.

Références bibliographiques

Références bibiliographiques

Adrian, J ; Frangne, R (1991). La science Alimentaire de A à Z, Ed. Lavoisier, Paris.

Afkir S, Nguelefack T. B, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Lahlou S, Ziyyat A (2008). Arbutus unedo prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats. Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of Arbutus unedo in L- NAME-induced hypertensive rats. J. Ethnopharmacol. 116: 288-295.

Ait Hammou M, Hadjadj Aoul S, Miara M D, Zerrouki D (2011). Aspects taxonomiques des lichens du pin d'Alep (Pinus halepensis) et du Cyprès (Cupressus sempervirens) de la foret de Guezoul (Tiaret). Rev. Eco. Env. N° :07 : 15-26.

Alarcão-E-Silva M. Leitão A.E.B. Azinheira H.G. Leitão M.C.A , (2001). The Arbutus Berry: Studies on its Color and Chemical Characteristics at Two Mature Stages. Journal of Food Composition and Analysis, 14, pp. 27-35.

Alarcon A.C. (1995). Gastroprotection induced by slymarine; the hepatho- protective principle of Silybum marianum in its chemia. Role of neutrophis. Planta. Med. 6 (2):116-19.

Andrade, D. Gil, C. Breitenfeld, L. Domingues, F. Duarte, A, (2009). Bioactive extracts from Cistus ladanifer and Arbutus unedo L. Industrial Crops and Products, 30, 2009, pp. 165-167.

Anonyme. (1997). Rational phyto therapy). A physicians guide to herbal medecine. 3éme édition. Springer-Verlage. Germany. 218.

Antwerpen, P.V. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système mycloperoxydase / Peroxyole d'hydrogène / Clilorure. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques Bruxelles.

Arnal-Schnebelen B (2004). La place de la phytothérapie dans l'arsenal des traitements mis en œuvre par les médecins généralistes. Paris : Pierre Fabre.

Aruoma, O, (1996). Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. Journal of the American Oil Chemists' Society, 73, pp. 1617-1625.

Aruoma, O., (1996). Assessment of Potential Prooxidant and Antioxidant Actions. J. Am. Oil Chem. Soc. 73, 1617-1625.

Ayaz, F. Kucukislamoglu, M. Reunanen. M, (2000) . Sugar, Non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (Arbutus unedo L. var. ellipsoidea) fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 13, pp. 171-177.

Babou B, Sibiri O, Sita G (2001). Longévité des graines et contraintesà la survie des plantules d'*Afzelia africana* Sm. dans une savane boisée du Burkina Faso. Ann. For. Sci. 58 :69-75 © INRA, EDP Sciences.

Barboni, T. (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Corse, p26.

Barlow S.M (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. Ed. Hudson B.J.F. Food Antioxidants. pp 253-307.

Barnea, A., YoM-Tov, Y and Friedman, J (1990). Differentiai germination of two closely related species of Solamum in response to bird ingestion. Oikos, 57 : 222-228.

Barros L, Carvalho AM, Morais JS, Ferreira I (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. Food Chemistry, 1:247– 254.

Bassas J., Garcia F., Thrup. P .L .D. (2007). An improves single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. Am. J. Clin. pathol. 53: 149-58.

Bell A. D. and Bryan A. (1993). Plant Form: an Illustrated Guide to Flowering Plant Morphology. Oxford University Press, Oxford.

Benabdeli K (1996). Aspects physionomico-structuraux et dynamique des écosystèmes forestiers faces à la pression anthropozoogène dans les monts de Tlemcen et les Monts de

Benabdeli K (1998). Réflexions sur les possibilités et les contraintes de valorisation des espèces végétales naturelles à vertus médicales en Algérie. Séminaire national sur les plantes médicinales. Sidi Bel Abbes le 15 novembre 1998.

Benabdeli K (2010). Quelques réflexions sur la stratégie de gestion durable de la biodiversité dans le bassin méditerranéen : rôle de l'identification de seuils de perturbation acceptable des

écosystèmes. Colloque international sur la gestion et la préservation de la biodiversité continentale dans le bassin méditerranéen. Tlemcen 11 au 13 octobre 2010

Benabdeli K (2011). Les possibilités et les risques de valorisation des espèces végétales naturelles à vertus médicales en Algérie Colloque national Santé végétale et environnement. 7 p. Mascara les 3 et 4 mai 2011.

Benhammou N, Atik F, Bekkara , Kadifkova Panovska T (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacia lentiscus L. and Pistacia atlantica Desf. Adv Food Sci, 29(3):155-16.

Berker, K., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R., (2007). Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. Talanta 72, 1157-1165.

Bernard M et Hervé C (2010). La valorisation des plantes médicinales, documentation horizon.

Beta, T; Nam, S; Dexter, J.E; Sapirstein, H.D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, Creal Chem: 390 -393.

Bianchi, F. Careri, M. Musci, M. Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (Arbutus unedo L.) honey: Characterization of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography– mass spectrometry. Food Chemistry, 89, 2005, pp. 527-532.

Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. The Cochrane Hepato-Biliary Group, Copenhagen Trial Unit, Centere for Clinical Intervention Research, Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.

Boizot, N et J-P. Charpentier (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cah. Tech. INRA. N°special . pp. 79-82

Bouzid K, Benali Toumi F (2014). Influences géo-climatiques sur les constituants et effets antioxydants du fruit Arbutus unedo L. Phytothérapie, Volume 12, Issue 4, pp 229-233.

Khadidja Bouzid, Fouzia Toumi Benali, Rabah Chadli, Mohamed Bouzouina, Aman Bouzid, Amal Benchohra, Mustapha Mahmoud Dif (2014). Extraction, Identification and Quantitative HPLC Analysis of Flavonoids From Fruit Extracts of *Arbutus unedo* L from

Tiaret Area (Western Algeria) *European Journal of Molecular Biotechnology, 2014, Vol.(6), № 4, pp. 160-168.*

Celikel G, Demirsoy L, Demirsoy H (2008). The strawberry tree (Arbutus unedo L.) selection in Turkey. Sci. Hortic. 118:115-119.

Bruneton J (1999). Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier 3 ème édition, Paris.

Bruneton J. (1933). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, techniques et documentation. Lavoisier. Paris.

Calixto J. B (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. Journal of Ethnopharmacology 100: 131 - 134.

Carcache-Blanco, E. Cuendet, M. Park, E.J. Su, B.N. Rivero-Cruz, J.F. Farnsworth, N.R. Pezzuto, J.M. Douglas Kinghorn, A, (2006). Potential cancer chemopreventive agents from Arbutus unedo. Natural Product Research, 20, pp. 327–334.

Cavaco, T., Longuinho, C., Quintas, C., Carvalho, I., (2007). Chemical and microbial changes during the natural fermentation of strawberry tree (Arbutus unedo L.) fruits. J. Food Biochem. 31, 715-725.

Cavin, A. (1999). Investigation phytochimique de trios plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: Tinos poracispa (Menispermacées), Merremia emarginata (Convolvalacées) et Oropea enneanda (Annonacées). Thèse de doctorat Lausanne, p 241 .

Celikel, G., Demirsoy, L., Demirsoy, H., (2008). The strawberry tree (Arbutus unedo L.) selection in Turkey. Scientia horticulturae, 118, 115-119. Chun, O.K., Kim, D.-O., Lee, C.Y, 2003. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. J. Agric. Food Chem. 51, 8067-8072.

Chabot B.F. and Hicks D.J (1982). The ecology of leaf life spans. Annual Review of Ecology and Systematics, 13, 229-259.

Chen, Y.F; Tsai, H.Y; Wu, T.S. (1995). Anti-Inflammatory and analgesic activities from the roots of Angelica pubescens, Planta Med., 61: 2-8.

Closs (2002). Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. Planta Medicva. (55): 417-419.

Cornara L, La Rocca A, Marsili S, Mariotti M (2009). Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). Journal of Ethnopharmacology, 125: 16-30.

Cornu D., Boulay M. (1986). La Multiplication Végétative, Techniques Horticoles et Culture In Vitro, Revue Forestière Française, Spécial Amélioration Génétique, 60-68.

Costa, R.M., Magalhães, A.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Carvalho, M., Silva, B.M.,(2009). Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (Cydonia oblonga) leaf: A comparative study with green tea (Camellia sinensis). Food Chem. Tox. 47, 860-865.

Cuendet, M. (1999). Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « Fagraea blumei » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « Bartsia alpina » (Scrophulariaceae), « Loiseleuria procumbens » (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 24.

De la Fuente, E. Sanz, M. Martínez-Castro, I. Sanz, J. Ruiz-Matute, A, (2007). Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. Food Chemistry, 105, pp. 84-93.

De Souza F.S., Spinelli A., Corros. (2009). Sci. 51, 642.

Dhaya. Algérie occidentale. Doct. Es-sci. Univ. Djilali Liabes de Sidi Bel Abbés, pp356

Diplok, A.T. (1991). Antioxydant nutriments and disease prevention: an Overview. Am J Clin Nutr: 53 (suppl): 189S-93S.

Djebaili, S (1984). Steppe algérienne. Phytosociologie et écologie. Ed. OPU, Ben-Aknoun, Alger, p177.

Duriez F (2000). Dictionnaire des médicaments naturels. Paris : Seuil Pratique.

El Haouari, M. López, J. Mekhfi, H. Rosado, J. Salido, G, (2007). Antiaggregant effects of Arbutus unedo extracts in human platelets. Journal of Ethnopharmacology, 113, pp. 325-331

El-Hilaly J, Hmammouchi M, Lyoussi B (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). Journal of Ethnopharmacology, 86: 149-158.

Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.

Evans R J ; Reynhout G S. (1992). Alternates to synthetic antioxidants. Food Science and human Nutrition. P 29: 27-42.

Evans R.J et Reynhout G.S (1992). Alternates to synthetic antioxidants. Food Science and human Nutrition. P 29: 27-42.

Evenari, M. Farooqi, M.I.H. and Kapoor, L.D (1957). The beginning of cell division and cell elongation in germinating lettuce seeds. Bulletin of the Research Council of Israel, Section D. 6: 33-37.

F. Muanda , A. Dicko, R. Soulimani (2010). Chemical composition and biological activities of Ficus capensis leaves extracts. Journal of Natural Products 3, 147-160.

Falleh H, R. Ksouri, K. Chaieb, N. Karray-Bouraoui, N. Trabelsi, M. Boulaaba and C. Abdelly (2008). Phenolic composition of Cynara cardunculus L. organs, and their biological activities. Compt. Rend. Biol. Vol. 331. pp. 372-379.

Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D. et Guo Z (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé. 64 (2) : 159-164.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Actualité en chimie, 108-115.

Ferenci R, et al. (1989). Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. J. Hepatol. 9:105-13.

Fernandes, E., Borges, F., Milhazes, N., Carvalho, F. D., Bastos, M. L., (1999). Evaluation of superoxide radical scavenging activity of gallic acid and its alkyl esters using an enzymatic and a non-enzymatic system. Toxicol. Lett. 109, 42.

Ferreres, F., Sousa, C., Valentão, P., Seabra, R.M., Pereira, J.A., Andrade, P.B., (2007). Tronchuda cabbage (Brassica oleracea L. var. costata DC) seeds: phytochemical characterization and antioxidant potential. Food Chem. 101, 549–558. Finkel T., Holbrook N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408, 39-247.

Fiorentino, A. Castaldi, S. D'Abrosca, B. Natale, A. Carfora, A. Messere, A. P., Monaco, (2007). Polyphenols from the hydroalcoholic extract of Arbutus unedo living in a monospecific Mediterranean woodland. Biochemical Systematics and Ecology, 35, pp. 809-811.

Fiorentino, A., Castaldi, S., D`Abrosca, B., Natale, A., Carfora, A., Messere, A., Monaco, P., (2007). Polyphenols from the hydroalcoholic extract of Arbutus unedo living in

a monospecific Mediterranean woodland. Biochem. Syst. Ecol. 35, 809811. Fridovich, I., 1999. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? Ann.NY Acad.Sci. 893, 13-18.

Fleurentin J. (1993). Ethnopharmacologie et aliments : introduction au sujet et réflexions sur l'efficacité biologique. ". Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique, IIe Colloque européen d'Ethnopharmacologie et XXIe Conférence internationale d'Ethnopharmacologie, Heidelberg.

Fleuriet. A., Rice. E., Macheix. J.J. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. press polytechniques et universitaires, Romandes.160.

Fortalezas, S. Tavares, L. Pimpão, R. Tyagi, M. Pontes, V. Alves, P. McDougall, G.Stewart, D. Ferreira, R. Santos, C,(2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (Arbutus unedo). Nutrients, 2, pp.14-229.

Frankel E.N et meyer A.S. (2000). "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants". Journal of Science and FoodAgriculture. P 80: 1925-1941.

Fujioka, T ; Furumi, K ; Fujii, H ; Okabe, H ; Mihashi, K ; Nakano, Y ; Mastunga, H ; Katano, M. et Mori, M. (1999). Antiproliferative constituents from umbelliferae plants., V. A., New furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ether from the root of Angelica japonica, Chem. Pharm. Bull, 47,96-100.

Garcia-Agaez, A. N ; Apan, T. O. R ; Delgado, H. P ; Velazquez, G. et MaetinezVazquez, M. (2000). Anti-Inflammatory activity of coumarins from Decatropis bicolor on TPA ear mice model, Planta Med, 66: 279-281.

Gardès- Albert C (2003). Phytochemical Methods: A guide to moderne techniques of plant analysis. Ed 3. CHAPMAN & HALL. p: 202-209.

Gaspar, E. - Neves, H. - Noronha, J,(1997). Application of HPLC-PBMS to the identification of unknown components in a triterpenoid fraction of Arbutus unedo fruits. Journal of High Resolution Chromatography, 20, pp. 417-420.

Gaspar, E. Neves, H. Noronha, J (1997). Application of HPLC-PBMS to the identification of unknown components in a triterpenoid fraction of Arbutus unedo fruits. Journal of High Resolution Chromatography, 20, pp. 417-420.

Gerard-Monnier, D et Chaudière, J (1996). Métabolisme et fonction antioxydante du glutathion, Path Biol , 44 : 77 – 85.

Gomes, F. Canhoto, J, (2009). Micropropagation of strawberry tree (Arbutus unedo L.) from adult plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 45, pp. 7282.

Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, SeguraCarretero A, Fernández-Gutiérrez A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41, 1220-1234. PMid:16621403.

Gonçalves, C. Dinis, T. Batista, M, (2005). Antioxidant properties of proanthocyanidins of Uncaria tomentosa bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. Phytochemistry, 66, pp. 89-98.

Gonzalez, A. G et Estevez-Braun, A. (1997). Coumarins, Nat. Prod. Reprod, 14 : 465-475.

Gorse, V (1994). Reproduction sexuée et hétérogénéité spatiale des semis chez quelques arbres des savanes arborées du Nazinon (Burkina Faso), O.R.S.T.O.M. 37 p.

Goudable, J. et Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Laboratoire de biochimie C, hôpital Edouard, Herriot, Lyon, GREPO, Université de Grenoble, la Tronche.

Goudable, J. et Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Laboratoire de biochimie C, hôpital Edouard, Herriot, Lyon, GREPO, Université de Grenoble, la Tronche.

Goussard, J. P. (1999). Les radicaux libres et antioxydants, p 7-11.

Gratani L. and Crescente M.F (1997). Phenology and leaf adaptive strategies of Mediterranean maquis plants. Ecol. Medit., 23: 11-19.

Gravot, A. (2008). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.

Gueneau S., Ilbert H., Motte (1998). Gestion des ressources naturelles : droits de propriété, institutions et marché. Document préparatoire à la journée de débat " SOLAGRAL, Programme environnement, Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement ", 26 novembre.

Guingard, J. (1996). Biochimie végétale, Ed. Lavoisier, Paris, p 175-192. UE PHR.

Gülcin, I., (2007). Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of Ltyrosine and L-Dopa. Amino Acids 32, 431-438.

Gurib-Fakim A (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27: 1-93.

Gutteridge, J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, Free Radic Res Commun, 19:141-158.

Hallé F., Oldeman R. A. A. (1970). Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux. Masson et Cie, Liège, 178 pages.

Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine, Oxford, UK.

Harbone H, (1998). Ultra structural cytology of pathogenic fungi .In: Howard .D.H. (Ed). Fungal protoplasts. application in Biochemistry and genetics. 3-30. Marcel Dekker New York.

Heinrich, (2005), M. Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. Pharmacological Research, 52, pp.353-366.

Heller R., Esmault R., Lance C. (1998). Physiologie Végétale. 6eme édition. Dunod, Paris. p:290.

Hemingway, R.W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York.

Hertog M.G.L., Kromhout., Aravanis et al. (1995). Apport en flavonoides et risque à long terme de coronaropathie et le cancer, étude dans sept pays. Arch. Intern. Med .155:381-86.

Hikino, H Kiso, Y, Wagner, H and Fieig M (1984). antihépatotoxic actions of flavonolignans from Silybum marianum fruits ", Planta Medica, 1984, 50, pp 248-50.

Hosseinian FS, Li W, Hydamaka AW, Tsopmo A, Lowry L, Friel J, Beta T (2007). Proanthocyanidin profile and ORAC values of Manitoba berries, chokecherries, and seabuckthorn. J Agric Food Chem.2007;55(17):6970–6976. doi: 10.1021/jf071163a.

Huang D., OU B., Prior R L. (2005). "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays". Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53 (6): 1841-1856.

Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A (2001). Larousse des plantes medicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.

Jouad, H. - Haloui, M. - Rhiouani, H. - El Hilaly, J. - Eddouks, M,(2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). Journal of Ethnopharmacology, 77, pp. 175-182.

Justice, M (1972). Guide de manipulation des semences forestières. Document FAO, 88 page.

Kahriman, N. Albay, C. Dogan, N. Usta, A. Karaoglu, S. Yayli, N,(2010). Volatile constituents and antimicrobial activities from flower and fruit of Arbutus unedo L. Asian Journal of Chemistry, 22, pp. 6437-6442.

Kambouche N, El Abed D (2003). Composition of the volátil oil from the arial parts of *Trashispermum ami* L. Sparag from oran (Algeria). J .Essent Oil. Res, 15-39.

Kansole, M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de Leucas martinicansis (Jacquin) R. Brown, Hoslundia oppossta vahl et Orthosiphon pallidus royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso.

Kayser, O and Kolodziej, H. (1997). Antibacterial activity of extrats and constituents of Pelargomun sidoides and Plelargonium reniforme, Planta Med, 63: 509-510.

Kikuzaki, H. Hisamoto, M. Hirose, K. Akiama, K. Taniguchi, H, (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2161-2168.

Kikuzawa, K (1989). Ecology and evolution of phenological pattern, leaf longevity and leaf habit. Evol. Trends Plants 3: 105–110.

Kim D, Chun O, Kim Y, Moon H, Lee C (2003). Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. J. Agric. Food Chem., 51: 6509-6515.

Kim, M.Y., Seguin, P., Ahn, J.K., Kim, J.J., Chun, S.C., Kim, E.H., Seo, S.H., Kang, E.Y., Kim, S.L., Park, Y.J., Ro, H.M., Chung, I.M.,(2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. J. Agric. Food Chem. 56, 7265–7270.

Kivcak, B. Mert, T. Denizci, A, (2001 a). Antimicrobial activity of Arbutus unedo L. FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 26, pp. 125-128.

Kivçak, B., Mert, T., (2001). Quantitative determination of α-tocopherol in Arbutus unedo by TLC-densitometry and colorimetry. Fitoterapia 72, 656-661. Larson, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry, 27, 969-978.

Krugman, S. L.; Stein, W. I.; Schmitt, D. M (1974). Seed biology. In: Schopmeyer, C.S., coord. Seeds of woody plants in the United States. Agric. Handb. 450. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture: 1-40.

Kuntic V, Pejic N, Ivkovic B (2007). Isocratic RP-HPLC method for rutin determinationin solid oral dosage forms. J Pharm Biomed Anal,43(2),718–721.

Larson, R.A. (1997). Naturally occuring antioxidants, Ed. Boca raton.

Lebham, (2005). Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Legssyer, A. Ziyyat, A. Mekhfi, H. Bnouham, M. Herrenknecht, C. Roumy, V. Fourneau, C. Laurens, A. Hoerter, J. Fischmeister, R, (2004). Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of Arbutus unedo on the rat isolated aorta. Phytotherapy Research, 18, pp. 889-894.

Leonti M, Casu L, Sanna F, Bonsignore L (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily, De Materia Medica revisited,J. Ethnopharmacol. 121: 255-267.

Leonti, M. Casu, L. Sanna, F. Bonsignore, L, (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited? Journal of Ethnopharmacology, 121, pp. 255-267.

Leopoldini, M. Marino, T. Russo, N. Toscano, M, (2010) . Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. The Journal of Physical Chemistry A, 108, pp. 4916-4922.

Lesgards, J.F. (2000). Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme ; aspect chimiques et biochimique. Thèse de doctorat, 19-20.

Lhuillier A (2007). Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: agauria salicifolia hook.f ex oliver, agauria polyphylla baker (ericaceae), tambourissa trichophylla baker (monimiaceae) et embelia concinna baker (myrsinaceae)

Lim TK (2012). Edible Medicinal and non-medicinal plants, volume 2, fruits. pp1088.

Lindau-sehpard, B; Shaffer, J. (1993). Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxiadative damage, Free rad boil Med , 15:581-8.

Liu, F. Ng, T. B, (2000). Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. Life Sciences, 66, pp. 725-735.

Liyana-Pathirana CM, Shahidi F (2005). Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (Triticum aestivum L.) as affected by gastric pH conditions. J. Agric. Food Chem., 53: 2433-2440.

LLusià, J. - Peñuelas, J, (2000). Seasonal Patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions. American Journal of Botany, 87, pp. 133-140.

Lois, R. (1994). Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in Arabidopsis thaliana L. I. Mechanisms of UV resistance in Arabidopsis, Planta; 194: 498-503.

Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L. (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. Acta. Biologica Szegedientsis 1-4: 119-125.

Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R (2007). Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem., 100(4): 1409-1418.

Males, Z. Plazibat, M. Vundac, V.B. Zunta, I, (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree – Arbutus unedo L. (Ericaceae). Acta Pharmaceutica, 56, pp. 245-250.

Manthey., Fleuriet.A., Macheix.J.J., Sarni.M. (2005). Les composés phénoliques dans la plante: Structure, Biosynthése, Répartition et roles.In: les polyphénols en agroalimentaires. Eds, Tech & Doc, Lavoisier, Paris. 32, 150, 153-155, 160-161.

Mariotto S, Esposito E, Di Paola R, Ciampa A, Mazzon E, Carcereri de Prati A, Darra, E, Vincenzo S, Cucinotta G, Caminiti R, Suzuki H, Cuzzocrea S (2008). Protective effect of Arbutus unedo aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. Pharmacol. Res. 57:110-124.

Marston A. L. M. and Hosttemann K (2003). Triterpenoid saponins from the roots of Silene cucubalus. Fitoterapia 74: 237 - 241.

Martini M.C. (2006). Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. P 331.

Matkowski, A and Piotrowska, M. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae, Fitoterapia, 77: 346-353.

Mazza (2000). Programme de recherches alimentaires, Agriculture et agroalimentaire Canada. Numéro spécial du Journal of food. Science and Agriculture. 80 (7).

Mazza, G. Miniati, E, (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton : CRC Press. 362 pp. ISBN 0849301726.

Mehdioui R, Kahouadji A (2007). Etude ethnobotanique auprès de la population riveraine de la forêt d'Amsittène: cas de la Commune d'Imi n'Tlit (Province d'Essaouira). Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie 29: 11 20.

Mekhfi H, El Haouari M, Bnouham, M Aziz, M, Ziyyat, A, Legssyer A (2006). Effects of extracts and tannins from Arbutus unedo Leaves on rat platelet aggregation. Phytotherapy Research, 20, 2006, pp.135-139.

Mekhfi, H. El Haouari, M. Legssyer, A. Bnouham, M. Aziz, M. Atmani, F. Remmal, A. Ziyyat, A, (2004). Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 94, pp. 317–322

Mekkioui A. (1989). Etude bioclimatique des méditerranéennes occidentales et de l'ouest algerien.Thése D.E.S Dep.Bio.Fac.Sci.Uni.Tlemcen 111p.

Miara, M.D (2011). Contribution à l'étude de la végétation du massif de Guezoul (Tiaret). Mém. Mag, Univ- Oran. Algérie. pp 126.

Milane, H (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.

Miller N.J, Sampson J, Candeias L.P, ET AL (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. FEBS Lett. 384: 240-2.

Mohsen, S., Ammar, S., (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. Food Chem. 112, 595-598.

Mole S and Waterman P.G., (1987). A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. II. Techniques for biochemically defining tannins. Oecologia, 72: 148-156.

Moreno-Jiménez, E. Peñalosa, J. Carpena-Ruiz, R. Esteban, E,(2008). Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. Chemosphere, 71,pp. 466-473.

Mortensen, A. Skibsted, L. Sampson, J. Rice-Evans, C. Everett, S, (1997). Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. FEBS Letters, 418, pp. 91-97.

Moure, A; Cruz, J.M; Franco, D; Dominguez , J.M. et Sineiro, J. (2001). Natural antioxydants from residual sources, Food Chemistry, 72: 145-171.

Naczk, M., Shahidi, F (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. 41, 1523-1542.

Namiki M. (1990). Antioxidants/Antimutagens in Food. CRC critical reviews in Food Science and Nutrition. P 29- 273-300.

Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M (2000). The influence of natural products upon drug discovery. Natural Product Report 17: 215 - 234.

Niki, E (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. Free Radical Biology & Medicine, 49, pp. 503-515.

Novais M, Santos I, Mendesa S, Pinto-Gomes C (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). Journal of Ethnopharmacology, 93: 183-195.

Nutra news. (2003). Information et actualité santé, nutrition, prévention du vieillissement – htm.

Ody P. (2001). Complete Guide to Medicinal Herbs. Dorling-Kindersley, London.

Oliveira, I., Sousa, A., S Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J. A.,(2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) green husks. Food Chem. Tox. 46, 2326-2331.

Oliveira, I., Valentão, P., Lopes, R., Andrade, P.B., Bento, A., Seabra, R., Pereira, J.A (2009). Phytochemical characterization and radical scavenging activity of Portulaca oleracea L. leaves and stems. Microchem. J.

Ouedraogo J.S., Alexandre D.Y (1994). Distribution des principales espèces agroforestières à Watinoma, terroir du plateau central burkinabè, une résultante de contraintes écologiques et antropiques, J. Agric. Trad. Bot. Appl. XXXVI (1994) 101–111.

Owen, S. Boissard, C. Street, R. Duckham, S. Csiky, O. Hewitt, C, (1997). Screening of 18 Mediterranean plant species for volatile organic compound emissions. Atmospheric Environment, 31, pp. 101-117.

Oyaizu, M., (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Jpn J. Nutr. 44, 307315.

Özcan, M. Hacıseferoğulları, H,(2007). The Strawberry (Arbutus unedo L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. Journal of Food Engineering, 78, pp. 1022-1028.

Pabuçcuoğlu A. - Kıvçak, B. - Baş, M. - Mert, T, (2003). Antioxidant activity of Arbutus unedo leaves. Fitoterapia, 74, pp. 597-599.

Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, Del Castillo MD, **Cano MP, de Pascual-Teresa S (2008)**. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (Arbutus unedo L.) fruits. J Food Comp Anal 21: 273–81

Pallauf K, Rivas-Gonzaloa JC, del Castilloc MD, Canob MP, de Pascual-Teresa S (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (Arbutus unedo L.) fruits. J Food Compos Anal. 21 (4):273–281.

Pascual-Teresa, S. -Santos-Buelga, C. Rivas-Gonzalo, J, (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, pp.5331-5337.

Pawlowska AM, Leo M, Braca A (2006). Phenolics of Arbutus unedo L. (Ericaceae) Fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 1023410238.

Pawlowska, A. Leo, M. Braca, A, (2006). Phenolics of Arbutus unedo L. (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, pp.10234-10238.

Peñuelas, J. Llusià, J, (2001). Seasonal patterns of non-terpenoid C6-C10 VOC emission from seven Mediterranean woody species. Chemosphere, 45, pp. 237-244.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products, 63: 1035-1042.

Pincemail ,J ; Defraigne, J.D. (2004). Les antioxidants un vaste réseau de defenses pour latter contre les effets toxiques de l'oxygène. Service de Chirurgie Cardio-vasculaire, Pro biox SA. Sart Tilman 4000 Liège, Belgique.

Pinchuk, I. - Lichtenberg, D,(2002). The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. Progress in Lipid Research, 41, pp. 279-314.

Price M.L., Vanscoyoc S et Butler G., (1978). Article evaluation of vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. I- Agric. Food. Chem: 26. pp: 1210-1218.

Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F.,(2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. J. Agric. Food Chem. 48, 3396-3402.

Quezel P, Santa S (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, C.N.R.S. Paris).

Ramos M., Santos E.P., Bizarri C.H.B., Mattos H.A., Padilha M.R.S., Durate H (1996). Preliminary studies toward utilization of various plant extracts as antisolar agents.International journal of cosmetic science.18: 87-101.

Resch, M Steigel, A Chem, Z L et Bauer, R. (1998). 5-Lipoxygenase and cycloxygenase- 1 inbitory active compounds from Atratylodes lancea, J. Nat. Prod., 61 : 347- 350.

Ribereau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod.paris. p254.

Rice.E., Macheix.J.J. (1996). Les composés phénoliques des végétaux. press polytechniques et universitaires, Romandes.160.

Rice-Evans, C., Miller, N., Bolwell, P., Bramley, P., Pridham, J., (1995). The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. Free Radical Res. 22, 375-383.

Sambou B., Goudiaby A., Madsen J.E., Bâ A.T (1994). Étude comparative des modifications de la flore et de la végétation ligneuse dans les forêts classées de Koutal et de l'île Kouyong (centre-ouest du Sénégal), J. Agric. Trad. Bot. Appl. XXXVI ,87–100.

Sanjust, E. Mocci, G. Zucca, P. Rescigno, A, (2008). Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. Natural Product Research, 22, pp. 689-708.

Sarre H. (1971). "Experience in the treatment of chronic hepatopathies with Silymarin ". Arzeim Forsch. 21 (1): 209-12.

Sassi, A.B., Harzallah-Skhiri, F., Aouni, M., (2007). Investigation of Some Medicinal Plants from Tunisia for Antimicrobial Activities. Pharm. Biol. 45, 421-428.

Scortichini, M (1986). ll mirto. Rivista di frutticoltura e diortofloriocoltura 48:47-53.

Serhrouchni M, Benjelloun W (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, J. Ethnopharmacol., 58: 45–54

Shi, J.; Gong, J., Liu, J., Wu, X., Zhang, Y.,(2009). Antioxidant capacity of extract from edible flowers of Prunus mume in China and its active components. LWT-Food Sci. Technol. 42, 477-482.

Singh R, Singh S, Kumar S, Arora S (2007). Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of Acacia auriculiformis A Cunn. Food ChemToxicol 45, 1216–23.

Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol., 299: 152-178.

Singleton, V.L and Rossi, J.A. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144-158.

Soufleros, E. Mygdalia, S. Natskoulis, P, (2005). Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate __Koumaro'' by aromatic and mineral composition. Journal of Food Composition and Analysis, 18, pp. 699-716.

Spano, N. Piras, I. Ciulu, M. Floris, I. Panzanelli, A. Pilo, M. Piu, P. Sanna, G, (2009). Reversed-phase liquid chromatographic profile of free amino acids in strawberry-tree (Arbutus unedo L.) honey. Journal of AOAC International, 92, pp. 1145-1152.

Strang C (2006). Larousse medical. Ed Larousse.

Swain T et Hillis W.E (1959). The phenolics constituants of prunus domestica -I- the quantitative analysis of phenolics constituents. Journal of the science of food and agriculture: 10. p: 13.

Swaminathan M.S., (1996). Inaugural address. In S.K. Jain : Ethnobiology in human welfare, Lucknow (Inde), novembre 1994. DEEP publ., New Delhi.

Tabuti, J.R.S, Lye K.A, Dhillion S.S (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. J. Ethnopharmacology 88: 19-44.

Tavares LR, Fortalezas S, Carrilho C, McDougall GJ, Stewart D, Ferreira RB (2010). Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. Journal of Berry Research. 2010;1(1):3-12. Available from: 10.3233/BR-2010-001.

Thomas, O.P. (2009). Métabolisme secondaire et Biosynthèse. Master 2 VEM. Univesité Nice Sophia Antipolis.

Torres J, Valle F, Pinto C, García-Fuentes A, Salazar C, Cano E (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. Plant Ecology, pp 207-223.

Vermerris, W (2006). Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1-4020-5163-8 (HB).

Vesna T, Tumbas, Anamarija I, Mandić, Gordana S, Ćetković, Sonja M, Đilas, Jasna M, Čanadanović-Brunet (2004). Hplc analysis of phenolic acids in mountain germander (Teucrium montanum L.) Extracts. APTEFF, 35, 1-280.

Vetaas O.R (1992). Microsites effects of tree and shrubs in dry savannas, J. Végét. Sci. 3:337–344.

Vinet R., (1972). L'économie forestière. P.U.F. Paris, 125 p.

Wanasundara, U.N; Shahidi, F. (1994). Stabilization of canola oil with flavonoids. Food Chemistry, 50: 393-396.

Wang, S., Lin, H., (2000). Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. J. Agric. Food Chem. 48, 140-146.

Wang, S.Y., (2006). Effect of Pre-harvest Conditions on Antioxidant Capacity in Fruits. Acta Hortic. 712, 299-305.

Yi Z ., Yan Y ., Liang Y., Zeng B. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid.LWT, 41:597-603

Yoshikawa, M; Harada, E; Naitoh, Y; Inoue, K; Matsouda, H; Shimoda, H; Yamahara, J. et Murakami, N. (1994). Developpement of bioactive Function in Hydrangeae dulcis.

Zhao, B., Hall C (2008). Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. Food Chem. 108, 511-518.

Zheng, W., Wang, S. Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J. Agric. Food Chem. 49, 5165-5170. Ziyyat, A., Boussairi, E., (1998). Cardiovascular effects of Arbutus unedo L. in spontaneously hypertensive rats. Phytother. Res. 12, 110-113.

Zhishen, J; Mengcheng, T; Jianming ,W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scanenging effects on superoxide radicals, Food chemistry, 64 (4): 555-559.

Ziyyat A, Boussairi E (1998). Cardiovascular effects of Arbutus unedo L. in spontaneously hypertensive rats. Phytotherapy Research, 12: 110-113.

Ziyyat, A. Legssyer, A. Mekhfi, A. Dassouli, A. Serhrouchni, M. Benjelloun, W. (1997) Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. Journal of Ethnopharmacology, 58, pp. 45–54.

Site web 1: www. Détour Santé.com/flavo-perso.htm

Publications Internationales

Phytothérapie (2014) 12:229-233
© Springer-Verlag France 2014
DOI 10.1007/s10298-014-0884-4

Article original

Pharmacognosie

Geoclimatic influences on the constituents and antioxidant activity of extracts from the fruit of *Arbutus unedo* L.

K. Bouzid, F.B. Toumi

Laboratory of Spaces Eco-development, Faculty of Natural and Life Sciences, Djillali Liabes University, Sidi Bel Abbes 22000. Algeria
Correspondance : bouzid_khadidja@yahoo.com

Abstract: We made a comparison between the total phenolic content, concentrations of flavonoids and antioxidant activity of four different extracts (1-butanol, ethyl acetate, chloroform, water) of *Arbutus unedo* L. fruit (Ericacea) of El Marsa and Terni area. The total phenolic content in the extracts was determined using the Folin-Ciocalteu reagent and it ranged between 26.57 and 48.23 gallic acid equivalents mg/g of dry weight of extract. The concentrations of flavonoids in plant extracts varied from 17.98 to 56.84 catechin equivalents mg/g. The antioxidant activity was analyzed in vitro using the DPPH reagent; among all extracts, ethyl acetate fraction from El Marsa area showed the highest antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant activity – *Arbutus unedo* L. – Fruit – Flavonoids – Phenols – Western Algeria

Influences géoclimatiques sur les constituants et effets antioxydants du fruit *Arbutus unedo* L.

Résumé : Nous avons fait une comparaison entre la teneur en composés phénoliques totaux, les concentrations en flavonoïdes et l'activité antioxydante de quatre extraits différents (1-butanol, acétate d'éthyle, chloroforme, eau) du fruit d'*Arbutus unedo* L. (Ericaceae) d'El Marsa et Terni. La teneur totale des composés phénoliques dans les extraits a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, et leur teneur varie entre 26,57 et 48,23 GAE mg/g du poids sec de l'extrait. Les concentrations de flavonoïdes dans les extraits de plante varient de 17,98 à 56,84 CE mg/g. L'activité antioxydante a été analysée in vitro en utilisant le réactif DPPH ; parmi tous les extraits, la fraction d'acétate d'éthyle venant de la zone El Marsa a montré la plus forte activité antioxydante.

Mots clés : Activité antioxydante – *Arbutus unedo* L. – Fruit – Flavonoids – Phenols – Ouest algérien

Introduction

From a historical perspective, the production of medicines and the pharmacologic treatment of diseases began with the use of herbs. In fact, the very word drug used to denote a medicinal preparation is derived from the old Dutch word droog meaning "to dry", as plants were dried to be used as medicines [1]. Oxidative stress has been identified as a key factor in the development of chronic diseases such as cancer and cardiovascular diseases which, according to the CDC Report on National Vital Statistics for 2006, are still the leading causes of death in the United States [2]. The development of these diseases as well as their metabolic risk factors (hyperlipidemia, hypertension, diabetes and obesity) has been attributed to several factors which are based primarily on diet and lifestyle [3]. Key recommendations for the prevention and mitigation of these conditions have been centered on increased consumption of plant-based foods (fruits, vegetables and nuts) that are rich in phenolic [4–7].

Arbutus unedo L. is indigenous to the Mediterranean countries (excluding Egypt and Libya) [8]. In Portugal the fruits are processed into liqueurs such as the Portuguese *medronho*, a type of strong brandy. In Morocco, *Arbutus unedo* L. is used in cooking to bring out the flavor in a dish or to complement it [9], Although the fruits of the strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) are consumed mainly as processed product, they may be a good source of antioxidants if consumed as fresh fruit [10]. They contain a wide and excellent range of antioxidant components including phenolic compounds (e.g. anthocyanins, gallic acid derivatives, flavonoids, and tannins), vitamin C, vitamin E and carotenoids suggesting a potentially high value as a "health promoting food" [11].

In the present work we have estimated the phenolic compound (totals phenols and total flavonoids) of *Arbutus unedo* L. fruit then we had evaluated the antioxidant activity of its extracts by different solvents.

Materials and methods

Sampling site

Fruit of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) were collected respectively in October 2013, in the area of El Marsa (latitude 36° 22′31″ N, longitude 0°37′27″ E, altitude 351 m), near the chief town of the province of Chlef, this area is characterized by a Mediterranean humid climate and Terni forest (latitude 34°49′ N, longitude 1°19′ E, altitude 1190 m), about 20 km South of Tlemcen. This area is characterized by subhumid Mediterranean climate at fresh variant. The samples were stored at –18°C until analysis.

Phytochemical study

Extraction by maceration

100 g of fine powder were macerated in a hydro-alcoholic mixture (methanol/water 80/20: v/v) for 72 hours, in the dark at room temperature, with renewal of solvent every 24 hours (350 ml x 3). Macerate was filtered through filter paper to obtain a clear extract, and then solvent was evaporated under vacuum at a temperature of 40° C [12].

After complete evaporation of the solvent, 200 ml of hot water are added to the dry residue and stored for one night and then we have filtered with Whatman n°1 to obtain a clear solution. The liquid-liquid extraction has been then carried out with a solvent system of increasing polarity: petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and finally the 1-butanol [13]. The residue of each solvent extract was dissolved in water, frozen and lyophilized. Chloroform, ethyl acetate, 1-butanol and aqueous phase (water) crude extract powder were used for investigate phytochemical compounds, determination of total phenol, flavonoid content and for antioxidant screening.

Preparation of plant extracts

The plant extracts were prepared in methanol by adding 20 ml of methanol to 1 g of extract powder for 24h at room temperature. The extract was cooled and filtered through Whatman filter paper n° 1. The resulting solutions were evaporated under vacuum at 60°C by Buchi Rotavapor R-200 to dryness. The residues were then dissolved in 3 ml of methanol [14].

Determination of total phenolic contents in the plant extracts

The determination of total phenols was carried out by [15] reactive Folin-Ciocalteu, while the flavonoids are quantified by aluminum trichloride [16]. The maximum absorption of coloring varied between 725 and 750 Nm and it was proportional to the quantity of polyphenols present in the vegetable extracts [17].

Determination of flavonoid concentrations in the plant extracts

The amount of total phenolics in extracts of fruit was measured using the Folin-Ciocalteu reagent method of [18]. The ethanol/acetone solution of each extract (0.2 ml, 500 mg/ml) was taken in a test tube. 0.5 ml distilled water and 0.5 ml Folin–Ciocalteu reagent was added and the tubes were shaken thoroughly. After 1 min, 0.8 ml of sodium carbonate solution (7.5%) was added and the mixture was allowed to stand for 30 min with intermittent shaking. Absorbance was measured at 750 nm using a UV–Vis spectrophotometer (Thermo Aquamate). The total phenolic content was expressed as gallic acid equivalents (GAE) in milligram per gram fresh fruit.

DPPH free radical-scavenging activity assay

The effect of the oxidized fruit extracts on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was estimated as described by [19]. Each sample was diluted in methanol prior to the analysis (1 mg/ml). The DPPH solution was added to the diluted sample, thoroughly mixed, then left for 30 min for the reaction to occur. After that, the absorbance of the sample was measured at 515 nm using a UV–Vis spectrophotometer (Thermo Aquamate). The absorbance of DPPH solution in methanol, without any antioxidant (control), was also measured. The percentage of DPPH radical scavenging activity was calculated by using the following equation:

DPPH scavenging (%) = [(A control – A sample)/A control] × 100

Where a sample is the absorbance of the sample after the time necessary to reach the plateau (30 min) and A control is the absorbance of DPPH. Extract concentrations providing IC50 inhibition values (defined as the concentration of the compounds that was able to inhibit 50% of the total DPPH radicals) were calculated from graph plotting using nonlinear regression and expressed in microgram material equivalents per milliliter for sample extracts. Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as a positive control. A lower value of IC50 indicates a higher antioxidant activity and vice versa.

Statistical analysis

All evaluations of results were performed in twice. Data were expressed as means standard derivation (S.D.). Correlation coefficient of antioxidant activity was determined using Excel. p values below 0.05 were considered significant.

Result and discussion

Water, 1-butanol, chloroform and ethyl acetate extracts were prepared to examine the total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity. The yield of extract obtained from 100 g of dry plant material was measured for each extract (Table 1). The highest yield of solid residue was obtained using 1-butanol or ethyl acetate as

extraction solvents for the El Marsa area, in contrast water and ethyl acetate for the Terni area.

Total phenolic content of the extracts is calculated by the equation of calibration curve (Table 2). Values are expressed as gallic acid equivalents gram extract or fraction (GAE mg/g). The results showed that the difference between the contents of the extracts of the fruit of El Marsa is highly significant from those of Terni. Indeed the extracts of *Arbutus unedo* L. fruit of El Marsa have significantly higher levels of flavonoids and polyphenols than those Terni. Among the four extracts, ethyl acetate extract contained the highest (48.23 mg/g) amount of phenol compounds followed by 1-butanol extract (45.65 mg/g), chloroform extract (32.46) and water extract (26.57 mg/g).

The total phenolics present was quantified in different studies: [20] indicate an amount of 126.83 ± 6.66 mg GAE/g of extract while [21] report a value of 37.6 mg/g extract. By other hand, compared to the results of [11] indicate 16.46 ± 3.66 mg GAE/g of dry weight, Mendes et al., 2011 found about 16.7 ± 0.4 mg GAE/g of dry weight and Vidrih et al. 2013 quantified 0.59 ± 0.01 mg GAE/g of dry weight. Some authors [22,23] indicating that content of total phenols fluctuate during ripening and the highest amount being found in an intermediate stage of maturity.

While the total flavonoids is determined by the equation obtained by a calibration curve established using spectrophotometric method with aluminum chloride. Data are expressed in micrograms per gram catechin equivalents extract or fraction (mg CE/g) (Table 2).

Table 1. The yields of solid residue after extraction and evaporation from 100 g dried plant fruit.

Sample	Yields (g)	
	El Marsa	Terni
1-butanol	1.89 ± 0.09	0.78 ± 0.02
Ethyl acetate	1.52 ± 0.09	1.38 ± 0.09
Water	0.50 ± 0.02	1.42 ± 0.09
Chloroform	0.37 ± 0.05	0.45 ± 0.02

Each value is the average of three measurements ± standard deviation.

The concentration of flavonoids in fruit extracts from *Arbutus unedo* L. *from* El Marsa area ranged from 21.80 to 56.84 mg/g, 12.88 to 35.74 mg/g from Terni area. Ethyl acetate, chloroform extracts contains the highest flavonoid concentration was observed in El Marsa area 56.84 mg CE/g, which was very close to the value of chloroform extract concentration 52.65 mg CE/g. The lowest flavonoid concentration was measured in water and 1-butanol extract 12.88 and 15.03 mg/g respectively from Terni area.

The content of phenolic compounds is expressed in equivalent milligrams to gallic acid (mg GAE), that of the total flavonoids in milligrams of catechin equivalents (CE mg). These results are related to a gram of dry matter. Values represent the average of three measurements ± deviation standard. ($p < 0.05$) –ANOVA

The DPPH method has been used for evaluating the scavenging activities of antioxidants in lipophilic systems [24]. The results obtained in terms of the quantification of the total content of phenols, show that in two different regions, the content of these compounds can vary significantly with total GAE 56.84 ± 0.60 mg/g.

The antioxidant activity of the extracts of the fruit of *Arbutus unedo* L.

The IC50 values of different solvent extract of fruit are shown in Figure 1. The extract (or fraction) with the lowest value, has the most powerful anti-radical activity. According to the Figure 1, all extracts and fractions are endowed with antioxidant activity, which varies from one extracted another. The result suggested higher contents in fruit extract of *Arbutus unedo* L. was observed in El Marsa area. Ethyl acetate extract exhibit highest activity (IC50 = 0.005 µg/ml) followed by the 1-butanol extract from Terni area which also gave better result (IC50 = 0.001 µg/ml) while the lowest activities were observed in fractions chloroform extract by IC50 = 0,052 µg/ml and ethyl acetate extract by IC50 = 0.082 µg/ml from Terni area. DPPH assay is the common spectrophotometric method for analyzing the antioxidant property and it involves a hydrogen atom transfer process [25]. The ethyl acetate extract of fruit of *Arbutus unedo* L. which contains the enormous amount of hydrogen donor molecules (IC50 = 0.005 µg/ml) found from the reduced

Table 2. Total phenolic contents in the plant extracts expressed in terms of gallic acid equivalent (mg of GAE/g of extract).

Sample	El Marsa		Terni	
	Total phenols (GAE mg/g extract)	Flavonoids (CE mg/g extract)	Total phenols (GAE mg/g extract)	Flavonoids (CE mg/g extract)
1-butanol	45.65 ± 0.26	21.80 ± 0.41	23.48 ± 0.41	15.03 ± 0.06
Ethyl acetate	48.23 ± 0.81	56.84 ± 0.60	14.75 ± 0.08	35.74 ± 0.57
Water	26.57 ± 0.55	17.98 ± 0.39	18.15 ± 0.12	12.88 ± 0.04
Chloroform	32.46 ± 0.59	52.65 ± 0.68	22.02 ± 0.38	24.36 ± 0.38

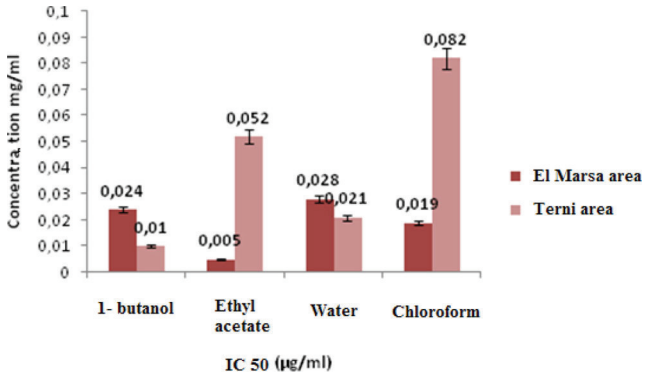


Fig. 1. Antioxidant activity of different extracts of *Arbutus unedo* L. fruit using DPPH method determined at different concentrations)

production of radicals and their ability to decolorize the purple colour of the DPPH.

The antioxidant activity by the same method is measured for ascorbic acid, taken as reference antioxidant. The latter has shown in vitro low capacity on the free radical DPPH, justified by the IC50 value most High experimentally obtained by this method (IC50 = 0.12 µg/ml). This standard (ascorbic ac.) remains the scavenger the less effective directed against the radicals Free soluble in biological systems. [26] quantified the antioxydant activity with 0.790 ± 0.016 mg/ml for fruit extracts.

Naturally, fruits and vegetables comprise a huge amount of antioxidants which diminish the radicals and protect the body cells. Hence the results supported that the fruit of *Arbutus unedo* L exhibit excellent antioxidant activity. Several studies have found the phenolic contents of plant extracts contribute to the excellent antioxidant/radical scavenging ability [27].

Previous studies revealed that phenolic compounds are major antioxidant constituents in medicinal plants, vegetables, fruits, and spices [28]. Normally, the effect of antioxidant capacity depends on the solubility of the antioxidants e.g., whether they are water-soluble or lipid-soluble [29].

Conclusion

From the observed results it could be concluded that the ethyl acetate extract of *Arbutus unedo* L. fruit may be a probable source of natural antioxidant reveled from various in vitro assays. Very effective solvents for extraction of phenolic compounds from these plants of it are polar solvents. The highest concentration of flavonoids was measured in ethyl acetate and chloroform fruit extracts. This information indicates effective flavonoid extraction from fruit using a moderately polar solvent.

Fruits, in addition to present a remarkable ability to block free radicals, and to prevent the formation superoxide radicals, one of the most important on oxidative processes in cells. This ability to reduce the activity of free radicals is associated with the presence of phenolic compounds, which have proven antioxidants. These preliminary results are interesting and we think further investigation on this fruit.

References

1. Schulz V, Hansel R, Tyler V, Blumenthal M (2004) *Rational Phytotherapy* 5 th ed. Springer-Verlag, Berlin, pp. 376–7
2. Heron MP, Hoyert DL, Xu J, et al. (2008) Deaths: Preliminary data for 2006. Natl Vital Stat Rep 56: 1–52
3. Willett WC (2002) Balancing life-style and genomics research for disease prevention. Science 296: 695–8
4. Lizcano LJ, Bakkali F, Begoña Ruiz-Larrea M, Ignacio RJ (2010) Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. Food Chem 119: 1566–70
5. Chukwumah Y, Walker T, loyd L, Verghese M (2009) Peanut Skin Color: A Biomarker for Total Polyphenolic Content and Antioxidative Capacities of Peanut Cultivars. Int J Mol Sci 10: 4941-52
6. Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 63: 1035–42
7. Croft KD (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. Ann N Y Acad Sci 854: 435–42
8. Lim TK (2012) Edible Medicinal and non-medicinal plants, volume 2, fruits, p. 1088
9. Bnouham M, Merhfour FZ, Ziyyat A, et al. (2010) Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. Hum Exp Toxicol 29: 865-71
10. Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, Del Castillo MD, et al. (2008) Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. J Food Comp Anal 21: 273–81
11. Fortalezas S, Tavares L, Pimpão R, et al. (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). Nutrients 2: 214–29
12. Torck M, Pinkas M (1992) Flavonoids in the genus Vicia. Biochem System Ecol. 20: 453–7
13. Dastmalchi K, Damien-Dorman HJ, Laakso I, Hiltunen R (2007) Chemical composition and antioxidative activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. LWT 40: 1655–63
14. Benhammou N, Atik Bekkara F, Kadifkova-Panovska T (2007) Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacia lentiscus L and Pistacia atlantica Desf. Adv Food Sci 29: 155–161
15. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol 299: 152–78
16. Ozkan IA, Akbudak B, Akbudak N (2007) Microwave drying characteristics of spinach. J Food Eng 78: 577–83
17. Boizot N, Charpentier JP (2006) Rapid method for evaluating the content of phenolic compounds in organs of a forest tree; Notebook of Techniques of INRA, Special Issue, pp. 79–82
18. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, et al. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chem 97: 654–60
19. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT. Food Sci Technol 28: 25–30
20. Barros L, Carvalho A, Morais J, Ferreira I (2010) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. Food Chem 120: 247–54
21. Heinrich M (2005) Understanding local Mediterranean diets: a multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. Pharmacol Res 52: 353–66

22. Oliveira I, Baptista P, Malheiro R, et al. (2011) Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. Food Res Int 44: 1401–7
23. Oliveira I, de Pinho, P.G, Malheiro R, et al. (2011) Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage. Food Chem 128: 667–73
24. Singh S, Singh RP (2008) In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. Food Rev Int 24: 392–415
25. Kaviarasan S, Naik GH, Gangabhagirathi R, et al. (2007) In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (Trigonella foenum graecum) seeds. Food Chem 103: 31–7
26. Mendes L, de Freitas V, Baptista P, Carvalho M (2011) Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. Food Chem Toxicol 49: 2285–91
27. Srinivasa Rao K, Chaudhury PK, Pradhan A (2010) Evaluation of antioxidant activities and total phenolic content of Chromolaena odorata. Food. Chem Toxicol 48: 729–32
28. Cai YZ, Luo Q, Sun M (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci 74: 2157–84
29. Hosseinian FS, Li W, Hydamaka AW, et al. (2007) Proanthocyanidin profile and ORAC values of Manitoba berries, chokecherries, and seabuckthorn. J Agric Food Chem 55: 6970–6

Copyright © 2014 by Academic Publishing House *Researcher*

Published in the Russian Federation
European Journal of Molecular Biotechnology
Has been issued since 2013.
ISSN: 2310-6255
E-ISSN 2409-1332
Vol. 6, No. 4, pp. 160-169, 2014

DOI: 10.13187/ejmb.2014.6.160
www.ejournal8.com

UDC 553

Extraction, Identification and Quantitative HPLC Analysis of Flavonoids From Fruit Extracts of *Arbutus unedo* L from Tiaret Area (Western Algeria)

[1] Khadidja Bouzid
[1] Fouzia Toumi Benali
[2] Rabah Chadli
[2] Mohamed Bouzouina
[2] Aman Bouzid
[1] Amal Benchohra
[1] Mustapha Mahmoud Dif

[1] Djillali Liabes University, Algeria
Laboratory of Spaces Eco-development, Faculty of Natural and Life Sciences
Sidi Bel Abbes 22000
E-mail: bouzid_khadidja@yahoo.com
[2] University of Mostaganem, Algeria
Faculty of Sciences and the Natural Sciences and Life, BP300, Mostaganem 27000

Abstract

The aim of the current study was to evaluate the total phenolic, flavonoid content and to investigate the antioxidant capacities of the fruit extracts of *Arbutus unedo* L. that grows in Tiaret area (Western Algeria). First we have extracted the fruit by some non-polar solvent (chloroform, ethyl acetate, 1-butanol).

Total phenolic content and total flavonoid content were evaluated according to the Folin-Ciocalteu procedure, and a colorimetric method, respectively. Extracts content was determined by using a high-performance liquid chromatography (HPLC)-UV method. The total phenolic contents of *A.unedo* L. varied between 12.75±0.06 to 34.17±1.36 mg gallic acid equivalent/g of dry weight of extract. The total flavonoid varied from 2.18±0.10 to 6.54±1.14 mg catechin equivalent/g.

The antioxidant potential of all extracts was evaluated using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity, the IC50 of acetate ethyl was the best by 0,009 mg/ml may due to the phenolic compound, in the second was the chloroform extract by IC50=0,015mg/ml, in the third was butanol extract by IC50= 0,022 mg/ml and in the last was water extract by IC50= 0,048mg/ml. the antioxidant activity of all extracts was better than ascorbic acid. The extract obtained under optimum conditions was analyzed by HPLC and five flavonoid compounds were identified; they are catechin, apiginin, silybin, fisetine and naringin.

Keywords: antioxidant activity; *Arbutus unedo* L.; fruit; flavonoids; phenols; HPLC; Western Algeria.

Introduction

The fruits of the strawberry tree (Arbutus unedo L.) are consumed mainly as processed product, but may be a good source of antioxidants if consumed as fresh fruit (Pallauf et al, 2008).

A. unedo, the strawberry tree, belongs to the Ericaceae family, and it is native of the Mediterranean climate (Celikel et al., 2008). It grows wildly in Mediterranean basin from sea level to about 600 m above sea level (Ayaz et al., 2000).

This species have been traditionally used as food, by using the arbutus berries in the production of alcoholic beverages, jams, jellies and marmalades (Alarcao-e-Silva et al., 2001; Pallauf et al., 2008); and as phytopharmaceuticals. The fruits are well known in folk medicine as antiseptic, diuretic, and laxative, while the leaves are used as astringent, diuretic, urinary antiseptic, antidiarrheal, depurative and more recently in the therapy of hypertension, diabetes and in the treatment of inflammatory diseases (Ziyyat et al., 1997; Ziyyat and Boussairi, 1998; Mariotto et al., 2008; Afkir et al., 2008). It is therefore of considerable interest to validate the bioactivities of *A. unedo* fruits in cell/organism-based assays to assess their potential therapeutic effect against a wide range of human diseases.

Polyphenolic compounds, such as phenolic acids and flavonoids, are important constituents in many plants, and their identification and quantification can give vital information relating to antioxidant function, food quality, and potential health benefits (Vesna et al, 2004). Wild fruits have been for a long time part of the human diet. In rural areas, wild fruits are consumed because of economic reasons not only as vitamin sources but also for medicinal purposes. Recent studies have focused on the description of phenolic compounds, such as flavonoids, phenolic acids and anthocyanins, as a part of the antioxidant compositions of these fruits (Pawlowska et al., 2006; Barros., 2008).

This paper is concerned with high performance liquid chromatography (HPLC) qualitative analysis of in *A.unedo* L. extracts obtained by successive extraction with solvents of different polarities (chloroform, ethyl acetate,1-butanol). Total phenolic and flavonoid contents as well as antioxidant activity of different extracts were investigated.

Materiel and methods:

Sample preparation and extraction

Biological material

Fruits of *A.unedo* L. (Ericaceae) were collected, in November 2013, from Guezoul djebel located at the end in North of the wilaya of Tiaret (latitude 35°22'26" N, longitude 1°10'30" E, altitude 1150 m), characterized by a semi-arid climate at fresh variant.

Powder preparation

Fruits randomly collected were oven dried (<40 ° C) until a constant dry weight, then ground to a fine powder using an electric grinder and finally stored at darkness at 25 ° C.

Extraction

100 g of fine powder of the dried fruit were macerated in a hydro-alcoholic mixture (methanol / water 80/20: v/v) for 72 hours, in the dark at room temperature, with renewal of solvent every 24 hours (350 ml x 3). Macerate was filtered through filter paper to obtain a clear extract, and then solvent was evaporated under vacuum at a temperature of 40° C, 200 ml of distilled water was added to the residue, extract was kept for 48 h in a refrigerator, then decanted, and was filtered again through filter paper (Lim et al., 2012).

The liquid-liquid extraction has been then carried out with three organic solvent system of increasing polarity: 200 ml of petroleum ether, 200 ml of chloroform, 200 ml of ethyl acetate and finally 200 ml of 1-butanol **(**Benhammou et al., 2007**)**. The residue of each solvent extract was dissolved in water, frozen and lyophilized. Chloroform, ethyl acetate, 1-butanol and aqueous crude extract powder were used for investigate phytochemical compounds, determination of total phenols, flavonoids content, antioxidant screening and for HPLC.

Determination of total phenolic contents

Total soluble phenolics of each fraction (chloroform, ethyl acetate, 1-butanol, aqueous) were determined with Folin-Ciocalteu reagent according to the method of (Singleton et al, 1999) using gallic acid as a standard phenolic compound. A volume of 40 µL of each fraction and standard was transferred into separate test tubes and to each added 3.16 mL water and 200 µL of Folin-Ciocalteu's reagent. The mixture was mixed well, waited for 8 min and then added 600 µL of sodium carbonate solution with continuous stirring. The solution was allowed to stand for 1 hour at

room temperature in a dark place and the absorption was measured at 750 nm using a spectrophotometer. The concentration of total phenolic compounds of all fractions of *A.unedo* fruit was determined as milligrams of gallic acid equivalent (GAE).

Determination of Flavonoid Content

The total flavonoid content of different fractions was analyzed by using catechin as standard (Kim et al., 2003). To 1 ml of extract solution (each of 100 µg/ml concentration), 4 ml of distilled water, 300 µl of sodium nitrite and aluminium chloride were added. The mixture was incubated at room temperature for 5 min. After the completion of incubation, 2 ml of sodium hydroxide was added and final volume of solution was raised to 10 ml by addition of distilled water. The absorbance of samples was measured at 510 nm. The total flavonoid content for all the fractions was expressed in terms of catechin equivalents (mg/g).

DPPH free radical-scavenging activity assay

The DPPH radical scavenging activity of extract was measured according to the slightly modified method of Liyana-Pathirana and Shahidi (2005). Sample extracts at various concentrations were taken and the volume was adjusted to 100 µl with methanol. 900 µl of 0.1 mM methanolic solution of DPPH was added and shaken vigorously. The tubes were allowed to stand for 20 min at 27 °C. The absorbance of the sample was measured at 517 nm. Radical scavenging activity was expressed as the inhibition percentage of free radical by the sample and was calculated using the formula: % DPPH radical scavenging activity = (control OD – sample OD/control OD) × 100.

Qualitative HPLC Analysis:

Analysis of extracts and standards were performed by Liquid chromatography was performed using a Shimadzu HPLC apparatus equipped with two LC-6A Vp pumps, an UV- VIS SPD-10A Module, an SLC-6B system controller, a Rheodyne injector 20 µL loop with RP-8 LiChroCart column (125 mm × 4.60 mm, 5 µm particle size). Chromatograms were obtained and analyzed using the software Class-VP ® (Shimadzu, Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of a binary mixture of methanol- water (50:50 v/v) adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid (Kuntić et al 2007) at isocratic flow rate of 1.0 mL min^{-1}. The absorbance was monitored at λ = 280 and 350 nm.

The need to know and identify flavonoidy individual compounds in the samples requires the replacement of traditional methods of separation techniques. High performance liquid chromatography is probably the most widely used analytical technique for characterizing the polyphenolic compounds (Gomez-Caravaca et al., 2006). This technique is used for the qualitative analysis of different extracts of the fruit of *A.unedo* L. taken from Tiaret area.

Statistical analysis

All tests were performed in triplicate and the results are presented as mean±standard deviation (SD). Differences with P values of <0.05 were considered significant.

Results and discussion

The yields of the extracts obtained per 100 g of dry plant material with the different solvents are given in Table 1.

Extract	Total extract (g/100 g of dry plant material)
Chloroform	0.25 ± 0.06
Aqueous	1.75 ± 0.16
1-butanol	0.34 ± 0.09
Ethyl acetate	0.44 ±0.09

The yield of aqueous extract was higher than yield of ethyl acetate,1-butanol and chloroform extract.

Total phenolic and flavonoid content

Total phenolic content of four crude extracts was determined by Folin-Ciocalteu method (Figure 1). Total phenols of *A.unedo* L. extracts were calculated according to the equation y= 0.001x + 0.0015 (r^2= 0.995) as Gallic Acid Equivalent (GAE, mg/g dry material), while total flavonoid contents were determined in accordance with the equation y= 0.002 x - 0.003 (r^2= 0.993) obtained by calibration curves as Catechin Equivalent (CE, mg/g dry material).

Total phenolic varied in different extracts was reported in Table 1: 29.46, 12.75, 34.17 and 32.84 mg Gallic Acid Equivalent /g of the dry extract in chloroform, aqueous, 1-butanol and ethyl acetate extract, respectively. Among the four crude extracts, 1-butanol extract contained the highest (34.17 mg GAE g of dry extract) amount of phenol compounds.

Figure 1: Gallic acid standard curve.

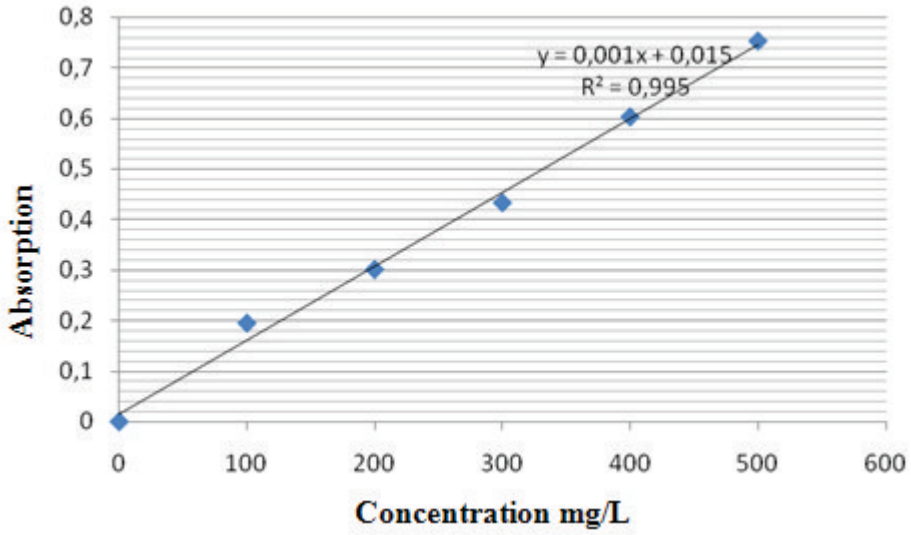


Table 1: Total phenolic content in *A.unedo* L. extracts

Extract	Total phenolic content (GAE mg/g extract)
Chloroform	29.46 ± 0.34
Aqueous	12.75 ± 0.06
1-butanol	34.17 ± 1.36
Ethyl acetate	32.84 ±0.53

In regard to the amount of flavonoids in the different crude extracts varied from 2.18 to 6.54 mg catechin equivalent/g (Tableau 2), chloroform extract contained a higher content of flavonoids (6.54 mg CE/g of the dry material), compared to ethyl acetate (5.59 mg CE/g), 1-butanol (3.61 mg CE/g) and aqueous extracts (2.18 mg CE/g) (figure 2).

Figure 2: Calibration cruve of quercetin standard.

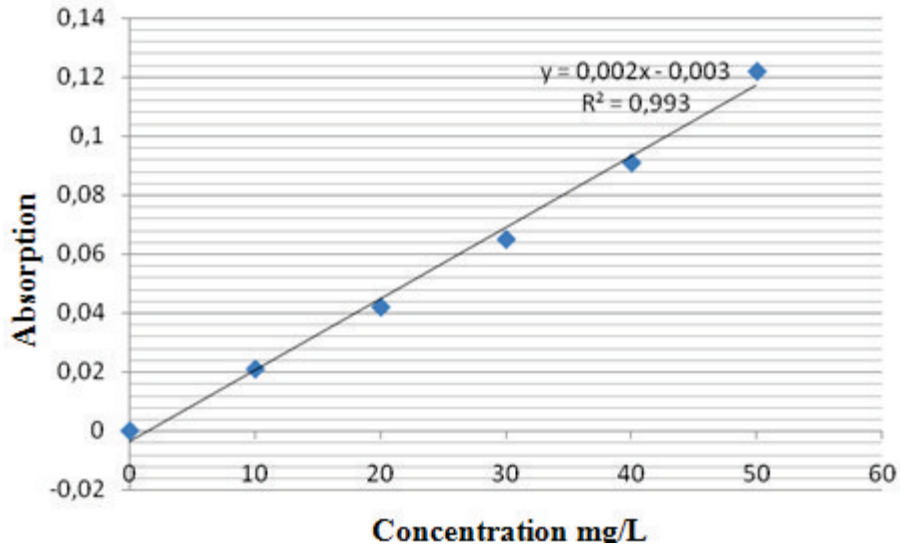
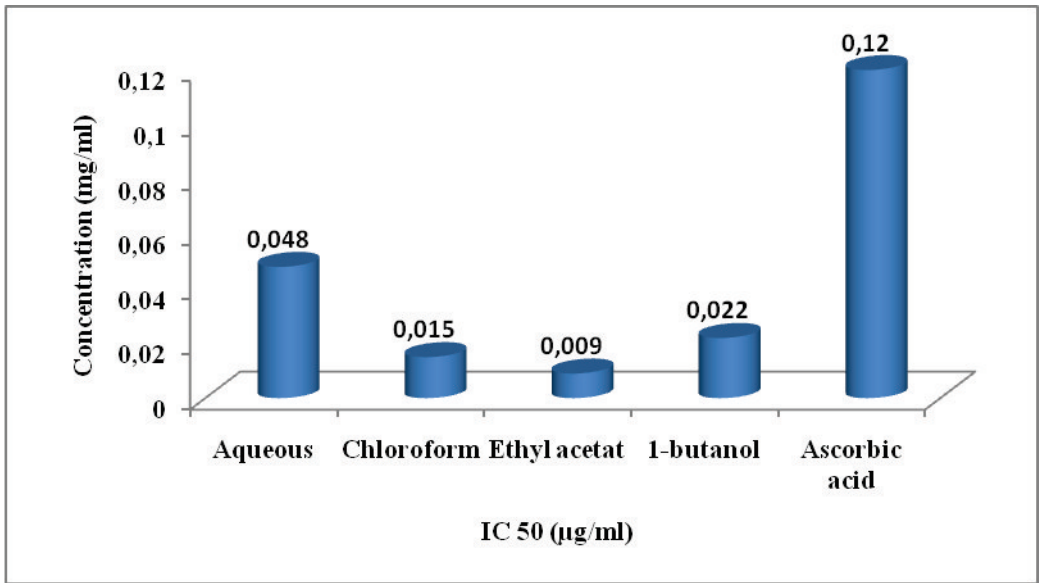


Table 2: Total flavonoid content in *A.unedo* L. extracts

Extract	Total flavonoid content (CE mg/g extract)
Chloroform	6.54 ± 1.14
Aqueous	2.18 ± 0.10
1-butanol	3.61 ± 0.59
Ethyl acetate	5.59 ± 0.82

Figure 2: IC50 (µg/mL) values of the DPPH assay in A.*unedo* L. fruit fractions



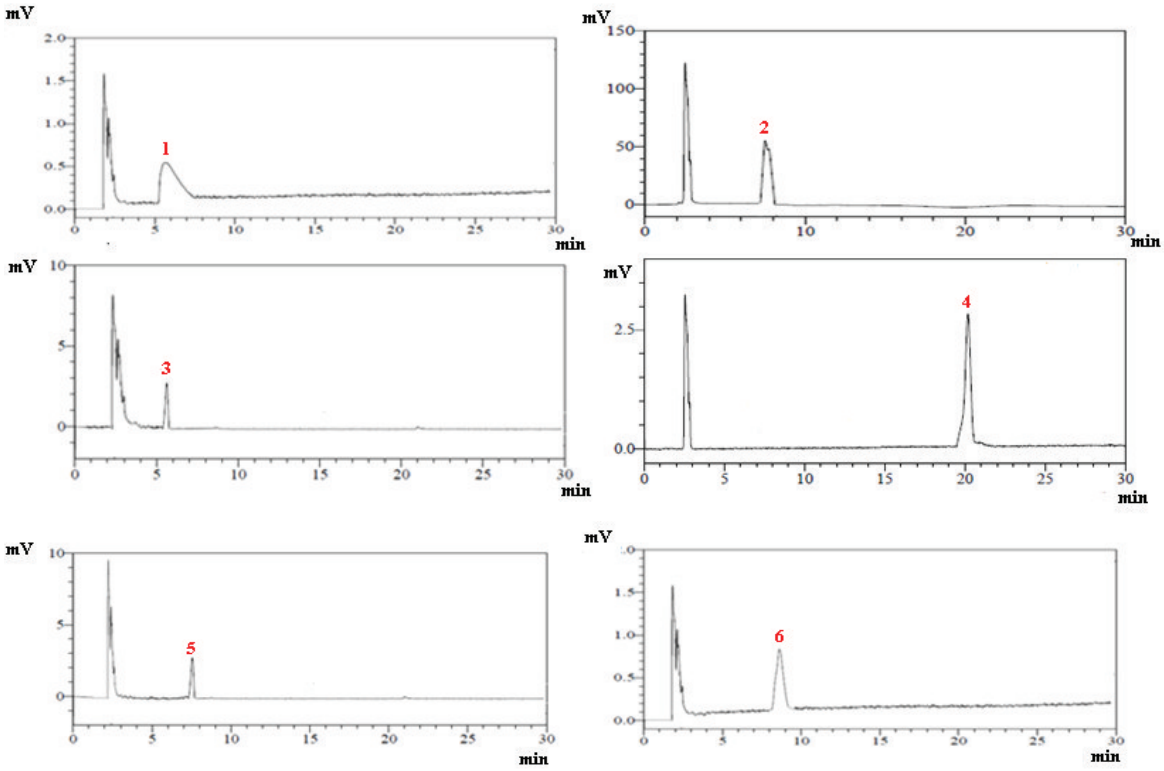
The IC50 value is a widely used parameter to measure the free radical scavenging activity. A lower IC50 indicates a higher antioxidant activity (Maisuthisakul et al., 2007). IC50 values for 1-butanol, aqueous, chloroform and ethyl acetate extract were: 0.022, 0.048, 0.015 and 0.009 mg/ml respectively, compared to the other work carried out by (Bouzid and Toumi, 2014). Several studies provide evidence to the fact that DPPH-scavenging ability is a reliable index of antioxidant

potential. The difference in the antioxidant activity of extracts may be attributed to the difference in the total phenolic and flavonoid content as well as the composition of these bioactive phytochemicals (sing et al., 2007). Reveals that fruits and vegetables have high values of important nutrients and phytochemicals which exhibit antioxidant functions (Hamza et al., 2013).

Identification of Various Phenolic Acids and Flavonoids in *A.unedo* L.

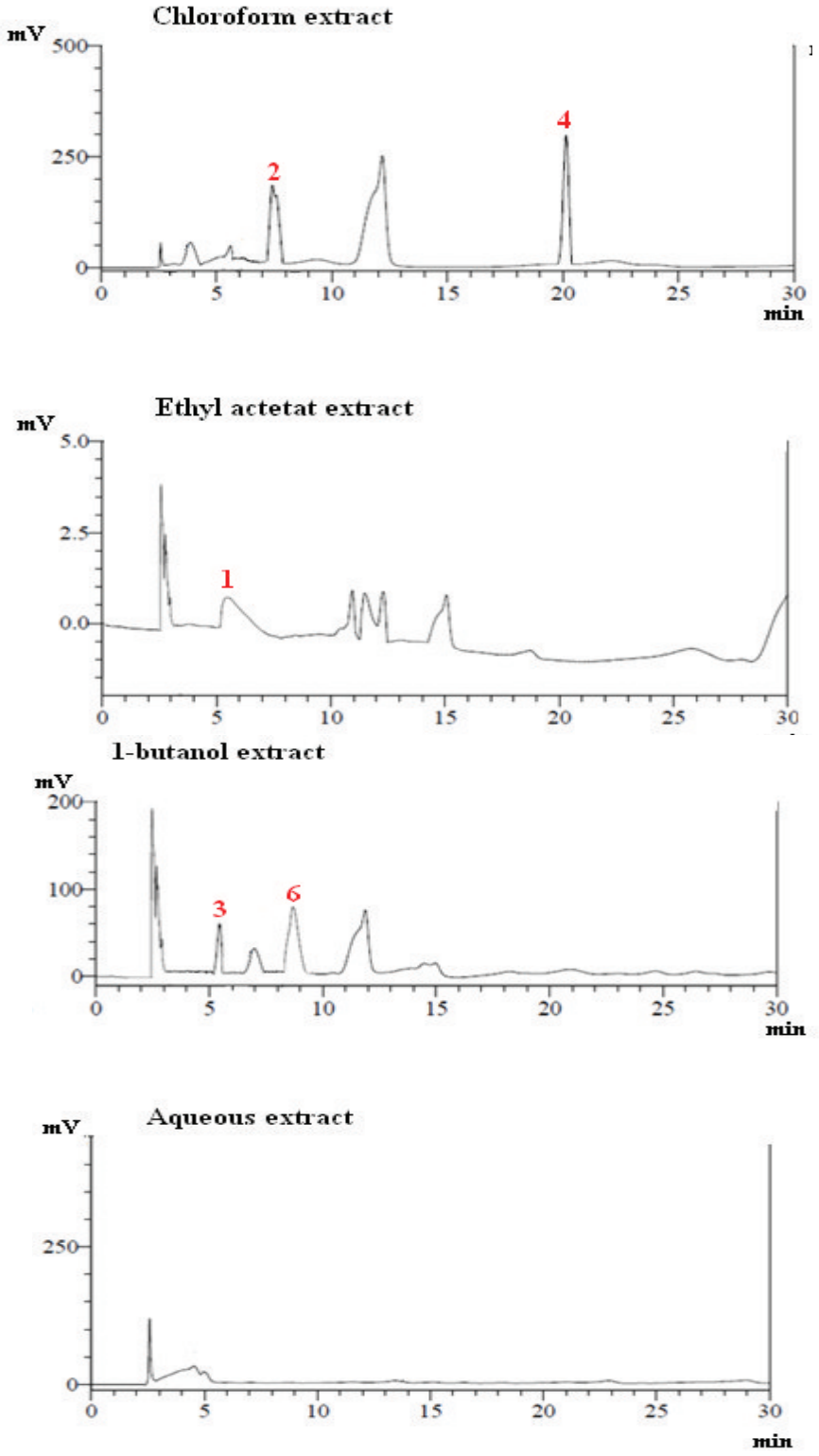
Based on these results, HPLC analysis was employed to define qualitative content of phenolic acids in A.*unedo* L extracts. HPLC Chromatograms of standards and different extracts are represented in Figure 4. (Naringin, Catechin, Apiginin, Fisetin, Taxifolin, Silybin) were identified in the investigated extracts by comparing spectra with those of standards (Figure 3).

Figure 3: HPLC chromatogram of part of phenolic standards at 280 nm



Peaks: **1**, Naringin; **2**, Catechin; **3**, Apiginin; **4**, Fisetin; **5**, Taxifolin; **6**, Silybin.

Figure 4: HPLC profiles of four fruit extract at 280 nm.



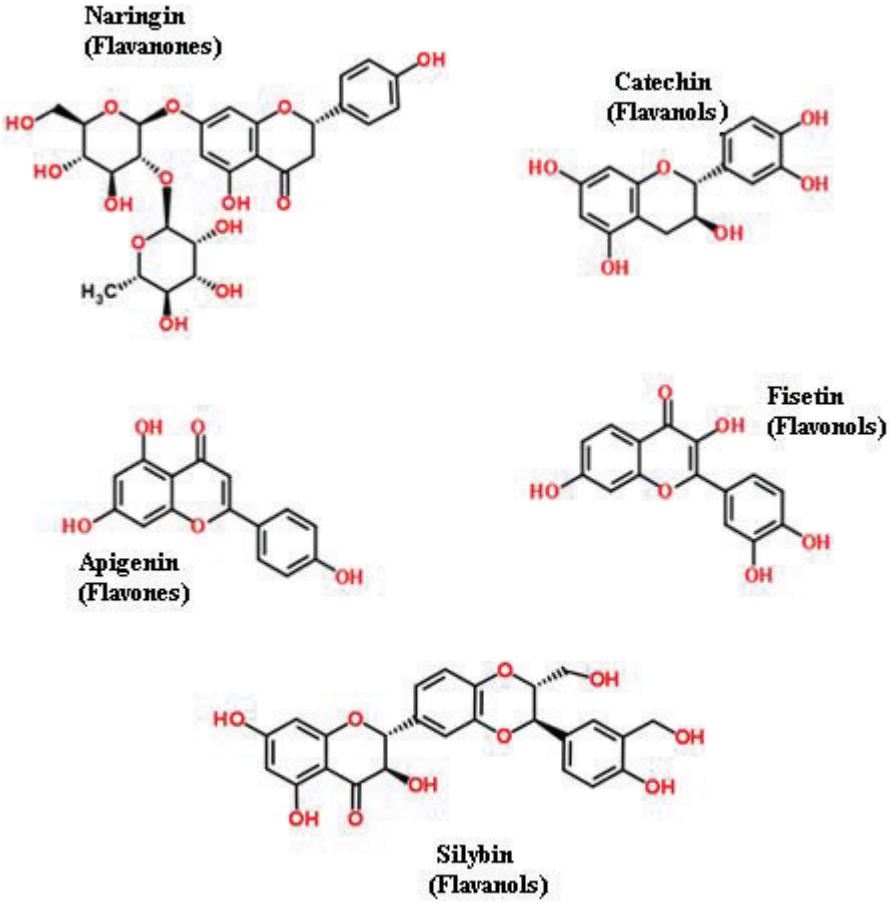
Peaks: **1**, Naringin; **2**, Catechin; **3**, Apiginin; **4**, Fisetin; **6**, Silybin

The results of qualitative HPLC analysis showed that Taxifolin was absent in all the fruit extract. Catechin and fisetin are present in chloroform extract, apeginin and silybin in 1-butanol

extract. These phenolic acids were not detected in aqueous extract, while ethyl acetate extract contained only naringin.

Peaks 1, 2, 3, 4 and 6 were positively identified as Naringin, Catechin, Apiginin, Fisetin and Silybin respectively, by comparing the retention time, absorption and mass spectra with that of standards (Figure 3 and 4). Figure 5 shows the chemical structures of phenolic compounds positively identified by comparison with standards.

Figure 5: Structures of phenolic compounds detected in fruit extracts.



Conclusion

In conclusion, this study indicates that the extracts obtained from the fruit of *A. unedo* L. have significant free radical scavenging activity on stable DPPH• and high reactive hydroxyl radical. The data suggest that aqueous, ethyl acetate and chloroform extracts of *A.unedo* L. from Tiaret area are a potential source of natural antioxidants.

References

1. Pallauf K, Rivas-Gonzaloa JC, del Castilloc MD, Canob MP, de Pascual-Teresa S. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. J Food Compos Anal. 2008;21 (4):273–281.

2. Celikel G, Demirsoy L, Demirsoy H. The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. Sci. Hortic. 2008;118:115-119.

3. F.A. Ayaz, M. Kucukislamoglu, M. Reunanen, Sugar, nonvolatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. ellipsoides) fruits. J. Food Compos. Anal., 13 (2000), pp. 171–177

4. Alarcao-E-Silva ML, Leitao AEB, Azinheira HG, Leitao MCA (2001).The Arbutus Berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. J. Food Comp. Anal. 14:27-35.

A. Ziyyat, E. Boussairi, Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L; in spontaneously hypertensive rats, Phytother. Res., 12 (1998), pp. 110–113

A. Ziyyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, A. Dassouli, M. Serhrouchni, W. Benjelloun

5. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, J. Ethnopharmacol., 58 (1997), pp. 45–54

6. S. Mariotto, E. Esposito, R. Di Paola, A. Ciampa, E. Mazzon, A. Carcereri de Parti, E. Darra, E. Vinzenzo, G. Cucinotta, R. Caminiti, H. Suzuki, S. Cuzzocrea,Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice, Pharmacol. Res., 57 (2008), pp. 110–124

7. S.T. Afkir, B. Nguelefack, M. Aziz, J. Zoheir, G. Cuisinaud, M. Bnouham, H. Mekhfi, A. Legssyer, S. Lahlou, A. Ziyyat, *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats, part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* L. in L-NAME-induced hypertensive rats, J. Ethnopharmacol., 116 (2008), pp. 288–295

8. Vesna T. Tumbas, Anamarija I. Mandić, Gordana S. Ćetković, Sonja M. Đilas and Jasna M. Čanadanović-Brunet, HPLC ANALYSIS OF PHENOLIC ACIDS IN MOUNTAIN GERMANDER (Teucrium montanum L.) EXTRACTS. APTEFF, 35, 1-280 (2004).

9. Pawlowska, A.M., Leo, M., Braca, A. Phenolics of Arbutus unedo L. (Ericaceae) Fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54, 10234-10238

10. Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., Ferreira, I. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. Food Chemistry, 2010, 1, 247–254.

11. Benhammou N, Atik F, Bekkara and Kadifkova Panovska T (2007). Antiradical capacity of the phenolic compounds of Pistacia lentiscus L and Pistacia atlantica Desf. *Adv Food Sci*, 29(3):155-16.

12. Lim T.K (2012). Edible Medicinal and non-medicinal plants, volume 2, fruits. pp1088

13. Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lamuela-Raventos, 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods Enzymol., 299: 152-178.

14. Kim, D., O. Chun, Y. Kim, H. Moon and C. Lee, 2003. Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. J. Agric. Food Chem., 51: 6509-6515.

15. Liyana-Pathirana, C.M. and F. Shahidi, 2005. Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. J. Agric. Food Chem., 53: 2433-2440.

16. Kuntic V., Pejic N., Ivkovic B. (2007). Isocratic RP-HPLC method for rutin determinationin solid oral dosage forms. J Pharm Biomed Anal,43(2),718–721.

17. Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41, 1220-1234. PMid:16621403.

18. Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R (2007). Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem., 100(4): 1409-1418.

19. Singh R, Singh S, Kumar S, Arora S (2007) Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of Acacia auriculiformis A Cunn. Food ChemToxicol 45, 1216–23.

20. Bouzid K, Benali Toumi F (2014) Influences géo-climatiques sur les constituants et effets antioxydants du fruit *Arbutus unedo* L. Phytothérapie, Volume 12, Issue 4, pp 229-233.