

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE SCIENCES ALIMENTAIRES

N°...../SNV/2018

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

CHALAKH HAFIDA

&

LIMAM MERIEM

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES ALIMENTAIRES

Spécialité: NUTRITION ET PATHOLOGIE

THÈME

Les effets biologiques de l'extrait de la *Maclura Pomifera*

Soutenue publiquement le 03/07/2018

DEVANT LE JURY

Président	Keddari Soumia	MCA U. Mostaganem
Encadreur	Boufadi Mokhtaria Yasmina	MCA U. Mostaganem
Co-encadreur	Saimi Yahia	Doc U. Mostaganem
Examineur	Benbouziane Bouasria	MCB U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de LMBAFS

Avant propos

Le présent mémoire a été réalisé au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, dirigé par le Pr Ali Riazi, on le remercie vivement de nous avoir accueillis au sein de son laboratoire, pour ses conseils avisés, ses orientations et sa grande gentillesse.

*Nous exprimons nos profonds remerciements et nos vives connaissances à **Dr Yasmina Boufadi**, maître conférence de classe A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, merci pour votre sympathie et la confiance que vous nous avez accordées tout au long de ce parcours.*

*Ce travail a été co-encadré par le **Doctorant Yahia Saimi**, on le remercie sincèrement pour toute l'aide qu'il nous a apporté, pour sa disponibilité, et ses conseils pour mener à bien ce travail.*

*Nous remercions également **Dr Soumia Keddari**, maître conférence de classe A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem qui a accepté de présider notre jury de soutenance.*

*Nos remerciements sont adressés au **Dr Bouasria Benbouziane**, maître conférence de classe B à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont apporté un plus à ce travail.



Dédicaces



Je dédie ce modeste travail :

À ma très chère et douce mère, Mon très cher père

À mes chers frères :

Mohamed, Kabib

À mes chères sœurs :

Kouria, Ouarda

À mes très chers amis

À toute la promotion des Nutrition et Pathologie

*Je remercie madame Djahira, et je la dédie cette fruit de son
soutien*

Hafida

À mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour,
leurs tendresses, leur soutien et leurs prières tout au long de
mes études,

À ma chère sœur Khadîdja pour son encouragement
permanent, et son soutien moral,

À mes chers frères, Djamel, Mohamed, Omar, Sid Ali
pour leurs appuis et leurs encouragements,

À toute ma famille pour leurs soutiens tout au long de mon
parcours universitaire,

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant
allégués, et le fruit de votre soutien infailible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Meriem

Liste des abréviations .

OH-	:	Ion Hydroxyde
C6	:	Phénols Simples
C6-C3	:	Acides phénoliques
C6-C3-C6	:	Flavonoïdes
(C150) n	:	Tannins
LDL	:	Low Density Lipoprotein.
DMP	:	Diméthylpyrane
CHI	:	Chalcone Flavonone Isomérase
SOD	:	Super Oxyde Dismutase
GPx	:	Glutathion Peroxydase
C₇H₆O₅H₂O	:	Acide gallique
NaHCO₃	:	Carbonate de sodium
AlCl₃	:	Trichlorure d'aluminium
Fe⁺³	:	Ferric Ion.
DPPH	:	1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
BHT	:	Hydroxytoluene Butyle
K₃ Fe (CN) ₆	:	Ferrocyanure De Potassium
NO	:	Le monoxyde d'azote.
NO₂	:	Nitrique dioxyde.
BHP	:	<i>Tert</i> -Butyle Hydroperoxyde
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice
IL8	:	Interleukine 8.
LTB₄	:	Leukotriene B ₄ .
LB, LT	:	Lymphocyte B, T
PMNs	:	Polymorphonucléaires neutrophiles
PNN	:	Polynucléaires Neutrophiles
MC	:	Maladie De Crohn
AINS	:	Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens

COX	:	Cyclooxygenase.
AIS	:	Anti-inflammatoires Stéroïdiens
ROS	:	Réactive Oxygen Species (Derives Réactifs De L'oxygène).
EOR	:	Espèce Réactive De L'oxygène
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique.
NADPH	:	Nicotinamide Adénine Di Nucléotide Phosphate Hydrogynase
H2O2	:	Peroxyde D'hydrogène.
H2O	:	Eau
O2	:	Oxygène.
O2•-	:	Radical superoxide (anion superoxide)
GSH	:	Glutathion Réduit.
AGPI	:	Acide gras polyinsaturé.
AcEt	:	Acétate D'éthyle
CI50	:	Concentration inhibitrice a 50%.
Fe2+	:	Fer Ferreux.
K3Fe(CN) 6	:	Ferricyanure de potassium
NaOH	:	Hydroxyde de sodium
PBS	:	Phosphate Buffered Salin
PAF	:	Facteur D'activation Plaquettaire
TNF	:	Facteur De Nécrose Tumorale
% INH	:	Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte
% AUG	:	Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte
HCl	:	D'acide Chlorhydrique
g	:	gramme.
Mg	:	Milligramme.
ml	:	Millilitre.
%	:	Pourcent.
µl	:	Microlitre.

ER	:	Equivalant rutine
EAG	:	Equivalant acide gallique.
°C	:	Degré Celsius.
Lyo	:	Lyophilisat.
EC	:	Equivalant catéchine.
DPPH	:	2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl.
R²	:	Coefficient de corrélation.
MS	:	Matière sèche.
PAL	:	Phénylalanine ammonialyase.
TAL	:	Tyrosine ammonialyase.
CCR	:	Cinnamate CoA réductase.
CAD	:	Cinnamyl alcool déshydrogénase.
CHI	:	Chalone flavone isomérase.
PPO	:	Polyphénoloxydase.
POD	:	Péroxydases ; Lacc : laccase.

La liste des Figures :

Figure 1 : image représente la forme d'arbre du <i>Maclura Pomifera</i>	3
Figure 2: image représente la forme des feuilles d'Orange des Osage.....	3
Figure 3: image r des fleurs vertes à jaune verdâtre.....	4
Figure 4: image présente la forme (externe et interne) du fruit d'Orange d'Osage	5
Figure 5: Classification de l'espèce <i>Maclura Pomifera</i> Raf. Schneid.....	6
Figure 6: Distribution d'orange en provenance de la base de données USDA-NRCS PLANTS. Iowa et Montana.....	7
Figure 7: Schéma du noyau commun aux alcaloïdes pyrrolizidiniques : la pyrrolizidine (A.) et du noyau commun aux alcaloïdes quinolizidiniques : la quinolizidine (B.).....	13
Figure8: de deux alcaloïdes isoquinoliniques : la codéine (A.) et la morphine (B.).....	13
Figure 9: structure chimique des polyphénols.....	16
Figure 10: Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols	19
Figure 11 : Effets biologiques des polyphénols.....	21
Figure 12 : Dérivés de l'acide benzoïque formule générale	22
Figure 13 : Dérivés de l'acide cinnamique formule générale	22
Figure 14 : Molécule de chalcone, premier composé produit dans la voie de biosynthèse des flavonoïde.....	23
Figure 15: Flavonones : naringénine (R=H) Eriodictyol (R=H).....	24
Figure 16 : Flavones : apigénine (R=H) lutéoline (R=H).....	24
Figure 17 : La formule générale de l'Anthocyanidines : pélagondine (R=H) cyanidine (R=H).....	25
Figure 18 : Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques	29
Figure 19 : Schéma des symptômes d'une réaction inflammatoire aigue	35
Figure 20 : Formation du transsudat et d'exsudat	36
Figure 21 : Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins.....	37
Figure 22 : L'homéostasie tissulaire dans le cas de l'inflammation aigue (A) et l'inflammation chronique (B)	39
Figure 23 : Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens	45
Figure 24 : Voies de formation des ROS, processus de peroxydation des lipides et le rôle de Glutathion (GSH) et autre antioxydants dans le mangement du stress	50

Figure 25 : Étapes de préparation des deux extrait de la <i>Maclura Pomifera</i>	56
Figure 26 : Les étapes de dosage des polyphénols	58
Figure 27 : Les étapes de dosage des flavonoïdes totaux.....	58
Figure 28 : Mise en évidence de la présence de tanins dans un extrait phénolique.....	59
Figure 29 : La coloration bleue qui exprime la présence des polyphénols totaux.....	65
Figure 30 : La coloration rouge qui exprime la présence des flavonoïdes.....	65
Figure 31 : La coloration bleu-vert qui démontre la présence des Tanins.....	65
Figure 32 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	67
Figure 33 : Taux des polyphenols totaux (mg EQ AG/g MS).....	67
Figure 34 : La courbe d'étalonnage de la quercétine.....	68
Figure 35 : Taux des flavonoïdes totaux (mg EQ quer/ g MS).....	69
Figure 36 : pourcentage d'inhibition de l'extrait éthyle acétate de <i>Maclura pomifera</i> et l'acide ascorbique.....	71
Figure 37 : IC ₅₀ de l'extrait éthyle acétate de <i>Maclura pomifera</i>	72
Figure 38 : Pouvoir réducteur de l'extrait éthyle acétate de <i>Maclura pomifera</i> et de l'acide ascorbique.....	74
Figure 39 : taux d'inhibition d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut d'éthyle acétate de <i>Maclura pomifera</i> après 120 min d'incubation.....	75
Figure 40 : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des rats témoins pendant 6 h.	
Figure 41 : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des rats standard pendant 6 h.	
Figure 42 : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des rats G1 (40mg/ ml) pendant 6 h.	

Figure 43 : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des rats G2 (80mg/ ml) pendant 6 h.

La liste des tableaux :

Tableau 1: Classification des triterpènes.....	14
Tableau 2: Les différents groupes de composés phénoliques	17
Tableau 3 : Les deux types de protections antioxydantes de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants.....	33
Tableau4 Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires	43
Tableau 5 : Exemples de maladies liées à l'inflammation	44
Tableau 6 : Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens	45
Tableau 7 : Principaux glucocorticoïdes(GC)	47
Tableau 8 : Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires	48
Tableau 9 : Exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-oxydantes	55
Tableau 10: Résultats des tests phytochimique sur les deux extraits (AcEt, Méth) de la <i>Maclura Pomifera</i> selon différentes modes de préparations	67
Tableau 11: Aspect, couleur et rendement de différents extraits.	
Tableau 12 : Résultats des tests phytochimique sur les deux extraits (AcEt, Méth) de la <i>Maclura Pomifera</i> selon différentes modes de préparations.	
Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibition (mm) et CMI obtenus avec les différentes souches.	
Tableau 14 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de <i>Shégélla</i> .	
Tableau 15 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de <i>E.coli</i> .	
Tableau 16: le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de <i>Pseudo</i> .	
Tableau 17 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de <i>Listeria</i> .	
Tableau 18 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de <i>Salmonella</i> .	
Tableau 19 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de <i>B.cereus</i> .	
Tableau 20 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de <i>E. herae</i> .	
Tableau 21 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de <i>M.luteus</i> .	
Tableau 22: le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de <i>S.aureus</i> .	

Table de matière

ABREVIATION

INTRODUCTION

Partie bibliographique

Chapitre I: ETUDE ETHNOBOTANIQUE DE LA *MACLURA POMIFERA*

I-1) Etude ethnobotanique	2
I-2) Description botanique.....	3
I-2-1) Caractéristiques morphologiques	3
I-2-2) Taxonomies et Systématiques.....	6
I-2-3) Habitat et répartition géographique.....	7
I-2-4) Noms vernaculaire	8
I-2-5) Utilisations en médecine traditionnelle.....	8
I-2-6) Donnée phytochimiques	9

Chapitre II: ETUDE PHYTOCHIMIQUES DES METABOLITES SECONDAIRES

II-1) Définition.....	10
II-2) Classification des métabolites secondaires.....	11
II-2-1) Les alcaloïdes.....	11
II-2-2) Les terpènes.....	14
II-2-3) Les Stérols	14
II-2-4) Les Stéroïdes.....	14
II-2-5) Les saponines	15
II-2-6) Composés phénoliques.....	16
II-2-6-1) Les non flavonoïdes.....	21
II-2-6-2) Les flavonoïdes.....	22
II-2-6-2-1) Les flavonoïdes au sens strict	23
II-2-6-2-2) Les isoflavonoïdes.....	24
II-2-6-3) Les anthocyanes	25
II-2-6-4) Les tanins.....	25
II-2-6-4-1) Les tanins hydrolysables	26
II-2-6-4-2) Les tanins condensés	26
II-3) Biosynthèse de quelques composés polyphénoliques de flavonoïdes	26
II-3-1) Biosynthèses des flavonoïdes au sens strict	
II-3-2) Biosynthèses des grandes classes des iso flavonoïdes et leurs inters conversions	28
II-4) Rôles et intérêts des composés phénoliques	29

Table de matière

II -4-1) Chez les végétaux.....	29
II -4-1) Chez les humains	30
II -5) Les antioxydants	32
II -5-1) Généralités sur les antioxydants	32
II -5-2) Mécanismes d'action des radicaux libres	32
II -5-3) Les principales sources des radicaux libres	33
II -5-4) Roules des complexes antioxydants	33
II -6) Intérêts des antioxydants dans la lutte contre le stress oxydatif	34
Chapitre III : INFLAMMATION	
III - Généralités.....	35
III-1) Inflammation aigue.....	35
III-1-1) La phase vasculaire.....	36
III-1-2) La phase cellulaire	37
III-1-3) La phase de résolution	38
III-2) Inflammation chronique.....	39
III-3) Les cellules impliquées dans la réaction inflammatoire.....	40
III-4) Médiateurs de la réaction inflammatoire	42
III-5) Implication pathologiques de l'inflammation.....	43
III-6) Anti-inflammatoires.....	45
III-6-1) Anti-inflammatoires non stéroïdiens	45
III-6-2) Anti-inflammatoires stéroïdiens	46
III-6-3) Anti-inflammatoires d'origine végétal.....	47
Chapitre IV: STRESS OXYDANT	
IV) Généralité	49
IV-1) Espèces oxygène réactives	49
IV-2) Sources des espèces oxygénées réactives.....	49
IV-2-1) Sources endogènes	50
IV-2-2) Sources exogènes	50
IV-5) Défenses anti oxydants	52
IV-5-1) Antioxydants enzymatiques	52
IV-5-2) Antioxydants non enzymatiques.....	53
IV-5-2) Antioxydants d'origine végétale.....	35
Chapitre V: MATERIEL ET METHODES	
V-Matériels et Méthodes.....	56

V-1) Matériels.....	56
V-1-1) Fruits de la <i>Maclura Pomifera</i>	56
V-1-2) Produits chimique utilisé.....	57
V-1-3) Réactifs chimique utilisé.....	57
V-2) Méthodes.....	57
V-2-1) Extraction	57
V-2-1-1) Macération /filtration	57
V-2-1-2) évaporation.....	57
V-2-2) Etude quantitative.....	58
V-2-2) Analyses phytochimiques.....	58
V-2-2-1) Quantification des composés phénoliques totaux.....	58
V-2-2-2) Quantification des flavonoïdes.....	59
V-2-2-3) Quantification des Tanins.....	60
V-2-3) Evaluation de l'activité antioxydant DPPH, FRAP	60
Chapitre VI: Résultat et discussion	
VI) Résultats et discussion	
VI-1) Rendements.....	66
VI-2) Analyse quantitative.....	66
VI-2-1) Détermination des composés poly phénols totaux.....	67.
VI-2-2) Détermination des Flavonoïdes totaux	69
VI-3) Activité antioxydant par le test DPPH et FRAP.....	71
VI-4) Activités <i>in vitro</i>	
VI-4-1) Activités antimicrobienne.....	78
VI-4-2) Test de la résistance des globule rouge humains prétraités par l'extrait du fruit d'Osage.....	85
Conclusion :	

Itroduction

Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires (Benaissa, 2008).

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse (Bourgaud, 1990).

De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques telles que les polyphénols, flavonoïdes, tanins ...etc.

En Algérie, les plantes sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire d'expériences des populations ainsi que de la médecine traditionnelle classique. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des nouvelles nécessités de la thérapeutique actuelle. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve l'Oranger des Osages (*Maclura Pomifera* (Raf.) C. Schneider de la famille des Moracées) est un arbre remarquable par ses fruits il est originaire de la Louisiane, la médecine traditionnelle l'utilise contre les rhumatismes, pour la cicatrisation des blessures ou encore en tant qu'antibiotique, ainsi que pour quelques maladies inflammatoire de la peau.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antioxydantes et antimicrobiennes et anti inflammatoire d'extrait phénolique de *Maclura pomifera*.

Le présent travail a pour objectif d'extraire les molécules bioactives, avec la détermination de la concentration de certains groupes, comme il vise à tester les activités biologiques d'extrait phénolique surtout l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne et anti inflammatoire.

CHAPITRE I

Chapitre I: ETUDE ETHNOBOTANIQUE DE LA *MACLURA POMIFERA*

I.1.1. Etude ethnobotanique

Maclura Pomifera, (Moraceae), appelé couramment Oranger des Osage ou bois d'arc, est un arbre caduc de petit à moyen développement. Il appartient à la famille des Moracées, comme **le murier** (Jean-Claude2016).est un arbre originaire de la région sud-ouest du Nord Amérique.

Au cours des temps géologiques, il y avait beaucoup d'espèces de *Maclura*. Les fossiles des périodes interglaciaires indiquent que certaines des nombreuses espèces de *Maclura* ont poussé aussi loin au nord que l'Ontario (JEFFREY L *et al.*, 1981).

Beaucoup de littérature existe sur la composition chimique de *Maclura Pomifera*.

L'Orange d'Osage a été nommée par Rafinesque, qui l'a appelé loxylon pomiferum en 1817(JEFFREY L *et al.*, 1981).

On a également trouvé que l'Orange d'Osage contenait de petites quantités d'iso-avonoïdes linéaires, (Delle Monache *et al.*, 1994).

Plusieurs activités biologiques de la *Maclura pomifera* et de ses composants, y compris des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales, cytotoxiques, antitumorales, œstrogéniques et antipaludiques ont été signalées jusqu'à présent (Peterson et Brockemeyer, 1953).

En outre, diverses études phytochimiques effectuées sur la *Maclura pomifera* montrent que la plante contient des lectines, des triterpènes, des xanthones et des composés de type flavone (Wagner et Harris, 1952).

La forte capacité antioxydante de la *Maclura pomifera* a été attribuée à des composants de type flavonoïdes, en particulier les isoflavones, osajin et pomiférine (Tsao *et al.*, 2003, Vesela *et al.*, 2004),(Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., 2003) ou un dérivé dihydroxychalcon dans *Maclura tinctoria* (Cioffi *et al.*, 2003).

Une activité antimicrobienne a été trouvée dans des extraits contenant de l'osajin ou de la pomiférine (Mahmoud 1981)., deux des principaux composants angulaires iso-avonoïdes présents dans les Osages d'Orange (Walter et al., 1938, Wolfrom et Mahan 1942).

I.1.1.2. Etude Botanique

Maclura Pomifera Raf. Schneid.est monotypique, ce qui signifie qu'il n'en existe qu'une seule espèce. Il se développe naturellement dans le sud des États-Unis. Il tire son nom des Oranger des Osage, Les premiers explorateurs français ont constaté que les indiens Osage ont utilisé ce bois pour les arcs, d'où les noms bois d'arc et bow-wood (Van den Berk B.V. 2017).

11I.1.2) Description botanique

Osage-orange est un grand arbuste ou petit arbre faisant la moyenne Pieds de hauteur.

Bien qu'il puisse devenir plus grand, il est rare atteint 70 pieds (un pied correspond à 0,3048 mètres). Il à un tronc court, profondément sillonné écorce brun-orange d'environ un pouce d'épaisseur (1 pouce=2.54 centimètre) (fig.1), Rameaux poussant en plein soleil épines, tandis que les rameaux à croissance lente dans les parties d'ombre de la couronne sont des épines. Ces épines, 1 'à 1 pouce longues, sont des brindilles modifiées; ils forment à l'aisselle des feuilles sur Rameaux d'un an (fig 2). (James D. Burton (1971).



Figure 1 : image représente la forme d'arbre du *Maclura Pomifera*.

I.1.2.1) Caractéristiques morphologiques

Feuille :

Les feuilles sont caduques et alternes. Leur forme varie de large-ovate ovale-lancéolé, arrondi ou subcordé à la base pour largement cunéiforme ou acuminé au sommet (JEFFREY L. *et al.*,(1981), (Vines, 1960). Ils ont 4-12 cm de long, 2-6 cm de large et avoir des marges entières. Les limbes des feuilles sont vert foncé, lisses et cireux au-dessus; plus pâle avec quelques poils en dessous (Stephens, 1969). Leur couleur d'automne est un jaune clair (McCurdy *et al.*, 1972). Les pétioles ont une longueur de 1,0-2,5 cm, sont minces, rainurés sur le dessus, et un peu poilu (Rogers, 1905). Les stipules sont triangulaires, petits et à feuilles caduques précoces. (JEFFREY L. *et al.*, 1981).



Figure 02 : image représente la forme des feuilles d'Orange des Osage.

Fleurs :

L'orange d'Osage est dioïque avec des fleurs vertes à jaune verdâtre apparaissant après les feuilles de la mi-mai à juin (Pool, 1919). Les fleurs staminées sont disposées en grappes axillaires à pédoncule long d'environ 2,5-4,0 cm de long sur l'éperon terminal de la feuille de la saison précédente (Rogers, 1905, Stephens, 1969). Ces fleurs ont un 4- calice lobé aux étamines exsertes, mais sans pétales (Vines, 1960). Le pistil les fleurs sont axillaires aux feuilles en grappes globulaires denses, de 1,5-2,5 cm de diamètre (Rogers, 1905, Stephens, 1969). Le calice est 4-lobé, épais, et renferme l'ovaire ovoïde, compressé, 1-loculaire (Vines, 1960). Les styles sont filiforme long. (JEFFREY L. *et al.*,(1981).



Figure 3 : image r des fleurs vertes à jaune verdâtre

Pollinisation :

L'orange des Osage est pollinies par le vent (Peattie, 1953). Les grains de pollen (Fig. 1) sont rond, lisse, et ont 1 (rarement), 2, 3 ou 4 pores. De grandes quantités sont libérées, causant occasionnellement le rhume des foins (Peattie, 1953).

Fruits :

La "haie-balle" est un fruit multiple composé de nombreuses druplets à 1 graine fusionnée dans une structure globuleuse, vert jaunâtre, de 8-12 cm de diamètre (Stephens, 1969; Vines, 1960). Les fruits ont en moyenne 450 g de poids mais vont de 150 à 700 g. Elles sont imprégnées d'un jus laiteux et collant qui provoque une dermatite chez certaines personnes. Les fruits mûrissent en septembre-octobre et tombent généralement au sol après le premier gel dur. Les arbres peuvent commencer à porter des fruits à 10 ans. Les graines sont de 8-12 mm long et sont intégrés dans le calice charnu (Vines, 1960). Ils sont de couleur crème au début, mais brunissent après vieillissement ou exposition à l'air.



Figure 4: image présente la forme (externe et interne) du fruit d'Orange d'Osage.

I.1.2.2) Taxonomies et Systématiques

Le schéma 1 donne une classification botanique de cette plante sous forme d'arbre phylogénique.

Schéma 1: Classification de l'espèce *Maclura Pomifera* Raf. Schneid

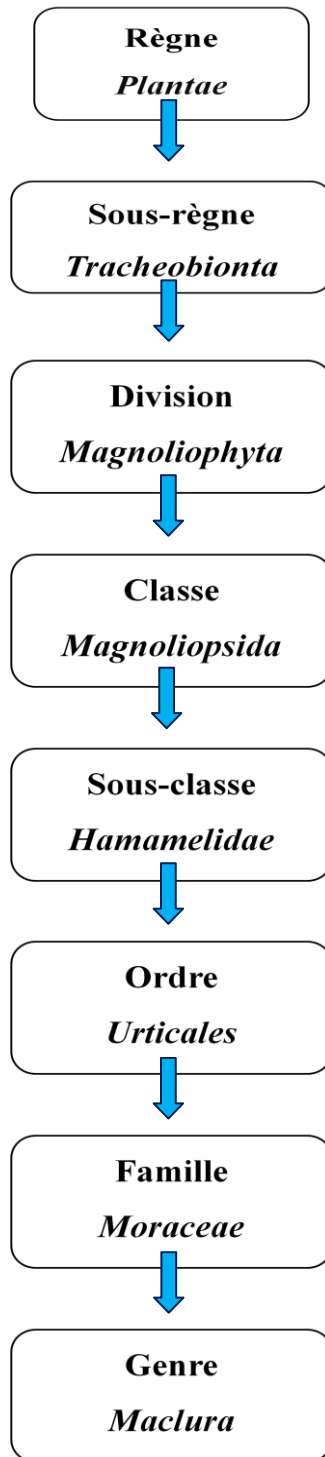


Figure 5 : Classification de l'espèce *Maclura Pomifera* (Raf. Schneid)

I.1.2.3) Habitat et répartition géographique

-La gamme naturelle d'Osage-Orange se trouve dans le rouge Le drainage fluvial de l'Oklahoma, de l'Arkansas et du Texas. Il pousse également dans certaines parties du Missouri et du Kansas et la plupart de l'est et du sud du Texas. Par conséquent, la gamme carte (fig 6) est seulement approximative.

-La distribution est inégale, couvrant seulement environ 10 000 miles carrés; et probablement la moitié de cette zone ne produit pas d'arbres de marchands Taille. Des parties de cette région, en particulier celles du sud de la rivière Rouge, étaient prairie, et Osage-Orange tendu envahir la prairie formant de petits peuplements isolés soit pur ou en mélange avec d'autres feuillus. Certains peuplements purs couverts autant que 100 acres, mais la plupart étaient beaucoup plus petit. Osage-orange était le plus abondant et a grandi dans le sud de l'Oklahoma.

-La distribution a été considérablement élargie par les premiers colons des États des Prairies qui ont utilisé des haies Osage-Orange pour Protéger les cultures céréalières et en rangs contre les animaux d'élevage à aire ouverte avant la clôture de fil est devenu disponible en 1875.

-Des milliers de kilomètres de clôture et de pare-vent ont été plantés. Des milliers de kilomètres de clôture et de pare-vent ont été plantés. Les haies d'Osage-orange étaient plantées pour marquer les limites des plantations dans le Sud. L'espèce a été plantée avec succès en Europe centrale et orientale et dans le sud-est du Canada contrôler l'érosion du sol et agir comme brise-vent. Ce n'est pas rustique, cependant, au Minnesota, dans les Dakotas, au nord Iowa et Montana.

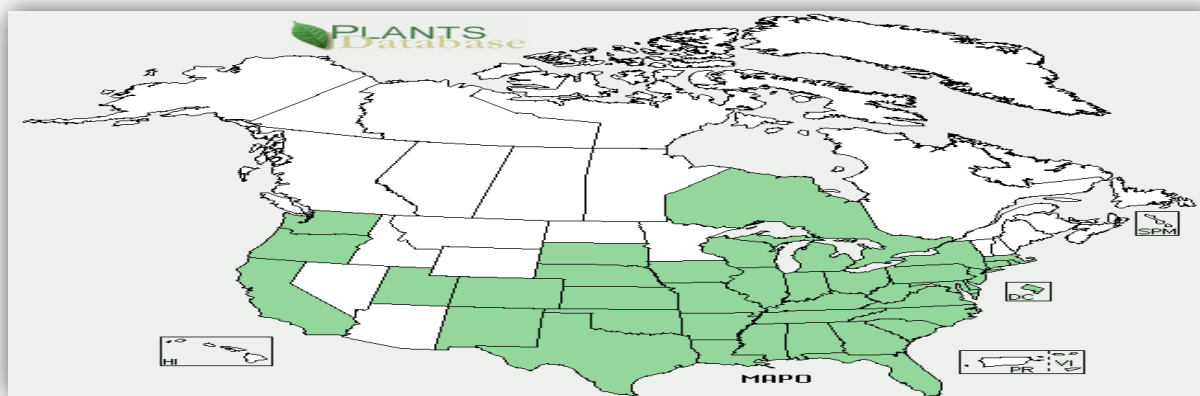


Figure 6 : Distribution d'orange en provenance de la base de données USDA-NRCS PLANTS. Iowa et Montana.

I.1.2.4) Noms vernaculaire : NOMS COMMUNS :

L'orange d'Osage a été nommée par Rafinesque, qui l'a appelé loxylon pomiferum en 1817.

Il a changé le nom à *Toxylon pomiferum* en 1818, puis à *Joxylon pomiferum* en 1819 (Morton, 1967). Thomas Nuttall a trouvé un peuplement de l'espèce en 1818, et l'a nommé *Maclura aurantiaca* en l'honneur de son ami William Maclure, un premier géologue américain (Peattie, 1953). En raison du prestige de Nuttall, son nom était généralement accepté (Morton, 1967). Les autres noms qui ont été donnés les espèces sont: *Broussonetia tinctoria*, *Toxylon aurantiacum* et *Toxylon Maclura* (Sargent, 1947). Le nom accepté aujourd'hui, *Maclura pomifera*, vient de Schneider bien que *Maclura aurantiaca* soit fréquemment trouvé dans la littérature.

Osage-Orange est le nom commun préféré pour l'espèce. On l'appelle aussi bois d'arc, bodark, haie, hedgeapple, osage-apple, pomme de cheval, mock.orange, bowwood et bois jaune. Bodark est une corruption du bois d'arc. Les fruits ressemblent à des oranges vertes, d'où les noms osage-orange et mock orange (Conrad 1992).

Certains de ces noms sont mal choisis. Mock.orange est plus approprié pour Philadelphus. Le bois jaune proprement dit est *Cladrastis lutea* (Michx.) K. Koch.

Le bois fut aussi utilisé pour la fabrication de leurs arcs d'où le nom vernaculaire de bois d'arc parfois donné à cet arbre (Peattie, 1953).

I.1.2.5) Utilisations en médecine traditionnelle

En Europe de l'Est, la médecine traditionnelle l'utilise contre les rhumatismes, pour la cicatrisation des blessures ou encore en tant qu'antibiotique, ainsi que pour stimuler l'activité cardiaque.

L'eau, l'éthanol et les constituants solubles dans l'acétone des fruits pleinement mûrs sont connus pour avoir des antibiotiques élevés activité contre les bactéries et d'inhiber la germination du blé.

Diverses parties de l'espèce *Maclura* sont utilisées en médecine folklorique dans le monde entier. La décoction préparée à partir des racines de *Maclura pomifera* est utilisée pour le traitement des yeux endoloris par les Indiens comanches d'Amérique du Nord (Carlson et Volney, 1940).

La sève de la plante est utilisée pour le traitement de la douleur dentaire et les aboiements et les feuilles pour l'hémorragie utérine en Bolivie (Bourdy et al., 2004).

Alors que l'écorce de *Maclura tinctoria* a été utilisée contre les maux de dents par les Kaiowa et les Guarani vivant dans la réserve de Caarapo au Brésil ainsi que dans les autres parties de la région amazonienne, elle a aussi été utilisée dans le sud du Ghana pour la santé dentaire (Elvin-Lewis et al., 1980).

I.1.2.6) Donnée phytochimiques

Le profilage phytochimique de l'orange Osage a été fait principalement dans la première moitié du 20ème siècle. Les scientifiques ont essayé de trouver les composés magiques dans l'orange d'Osage qui repoussent des insectes ou tue des mycètes. Beaucoup de métabolites secondaires ont depuis été isolés et identifiés (Smith, J. L **1981**), (Delle Monache, 1995), peu de composés ont montré une utilisation pratique en tant que médicaments ou agents antiparasitaires (Peattie1953). (Smith, J. L *et al***1981**), (Mahmoud, **1981**), (Peterson *et al.*, **2000**).

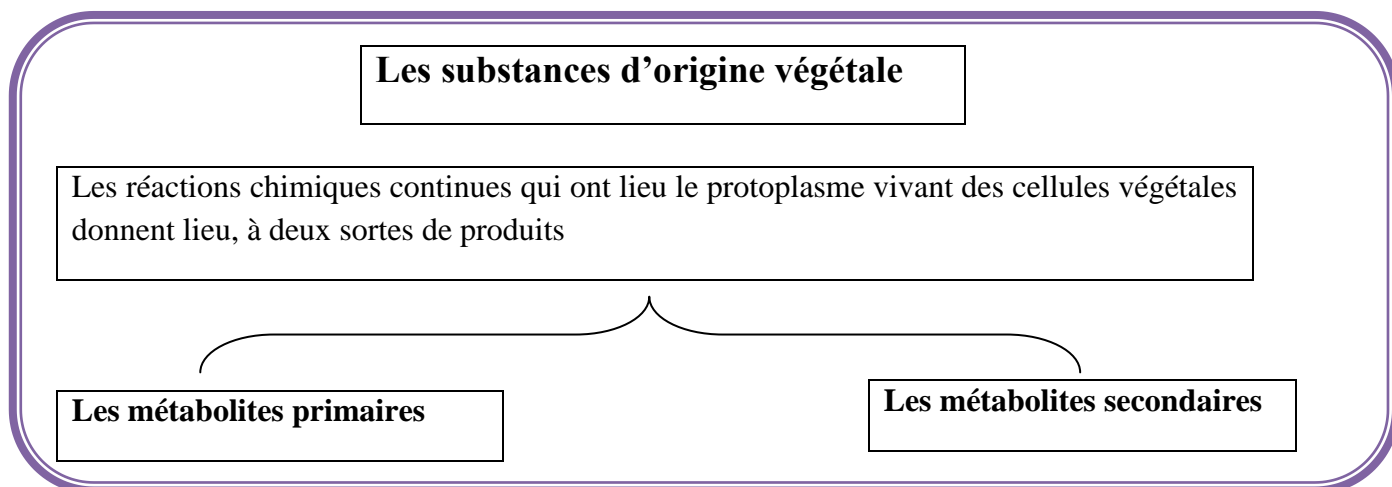
Parmi les composés phytochimiques du fruit de l'orange des Osages, les isoflavones constituent le groupe prédominant et sont peut-être les plus étudiés. Osajin et pomiférine ont été découverts et leurs structures identifiées il y a plus d'un demi-siècle (Wolfrom, M. L. *et al.*, **1946**), et ce sont les deux isoflavones prédominantes dans le fruit de l'orange Osage (Peterson, C.; Fristad, A.; Tsao, R.; Coats, J. R. **2000**), (Delle Monache, *et al* **1994**). Osajin et pomiférine se sont avérés être antimicrobiens (Mahmoud, **1981**); Cependant, l'activité antioxydante des isoflavones dans l'orange Osage était plus intéressante.

CHAPITRE II

Chapitre II: ETUDE PHYTOCHIMIQUES DES METABOLITES SECONDAIRES

II.1.Introduction

Résumé : L'origine des substances naturel



Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires (Hartmann T., 2007).

- **Les métabolites primaires :** sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

- **Les métabolites secondaires :** sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures.

Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires.

II.1.1) Définition

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphérique indirectement essentielles à la vie des plantes. Telles que la communication intercellulaire, la défense, la régulation des cycles catalytiques (Guillaume, 2008).

Les métabolites secondaires sont présents dans toutes les plantes supérieures, et ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Dont plus de 200.000 structures ont été définies (Hartmann, 2007) et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille ou un genre de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique.

Les métabolites secondaires qui font la base des remèdes pour l'Homme :

les maladies du stress, ces métabolites ont une activité antioxydantes, tels le thé noir, le thé vert et le cacao sont riches en composé phénoliques, parmi lesquels the a flavine, le resveratrol, le gallate et epigallocatechine procyanidine (Lee *et al.*, 2005).

- Activité antimicrobienne, antivirale, antiparasitaire: depuis des périodes très anciennes ces substances naturelles ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques tels : la quinine obtenue à partir du quinquina "*Cinchona*" a été avec succès employée pour traiter le malaria, Et l'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*) est renommé aussi pour ses propriétés : anti-infectieux, antifongiques, mais aucune plante n'est aussi efficace que les médicaments antirétroviraux pour arrêter la réplication du VIH (Mohammedi, 2006).

* **En alimentation** : Les épices et les herbes aromatiques contenant des divers métabolites sont utilisées dans l'alimentation pour une bonne part responsables des plaisirs de la table, considérées comme condiments et aromates, ont été et restent très liées à leurs propriétés organoleptiques. Mais également ces métabolites trouvent leur utilisation comme suppléments diététiques (Mohammedi, 2006).

* **En cosmétique** : Des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produits d'hygiène (Mohammedi, 2006).

II-2) Classification des métabolites secondaires

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003, Haven *et al.*, 2000).

II-2-1) Les alcaloïdes

De tous les composés secondaires végétaux connus, environ 20% sont classés comme alcaloïdes (Verpoorte *et al.*, 1993; Nugroho *et al.*, 2002). Environ 20% des espèces de plantes à fleurs produisent ces alcaloïdes et chacune les accumule en fonction d'un modèle unique et prédéfini (Croteau *et al.*, 2000).

Dans leur définition originelle, les alcaloïdes sont des composés végétaux pharmacologiquement actifs contenant de l'azote. De nos jours, cette définition n'est pas suffisamment complète pour englober tous les groupes d'alcaloïdes, mais elle peut être toujours appropriée dans de nombreux cas (Croteau *et al.*, 2000).

Les structures chimiques complexes des alcaloïdes rendent l'élucidation de leur structure et les études sur leur biosynthèse très difficile. Des études établissent clairement que les alcaloïdes sont principalement formés des acides aminés tryptophane, tyrosine, phénylalanine, lysine et arginine. Ils peuvent être isolés ou liés à une autre fraction (de type stéroïde, sécoiridoïde, terpénoïde).

Il a été montré qu'une ou deux transformations seulement sont nécessaires pour convertir ces acides aminés en substrat pour le métabolisme des alcaloïdes, fortement spécifique à chaque espèce de plante. Ces transformations nécessaires pour la biosynthèse des alcaloïdes sont catalysées par des enzymes fortement stéréo, région et substrat spécifiques (Croteau *et al.*, 2000).

Selon leurs acides aminés précurseurs, les alcaloïdes sont regroupés dans plusieurs catégories telles que : les alcaloïdes terpénoïde indoliques, tropaniques, pyrrolizidiniques, acridoniques, isoquinoliniques et quinolizidiniques.

Les alcaloïdes sont considérés comme faisant partie du système de défense chimique constitutif de nombreuses plantes. Leur rôle dans la défense chimique est supporté par leur large gamme d'effets physiologiques sur les animaux et par leur activité antibiotique et répulsive contre les insectes. Par exemple, la nicotine, alcaloïde trouvé dans le tabac, a été le premier insecticide utilisé par l'homme. Un autre alcaloïde efficace contre les insectes est la caféine trouvée dans les graines et les feuilles de cacao, café et thé. L'acide jasmonique joue un rôle dans la régulation de la réponse des plantes produisant des alcaloïdes. Deux groupes d'alcaloïdes ont été souvent étudiés du fait de leur rôle de défense : les alcaloïdes pyrrolizidiniques et les alcaloïdes quinolizidiniques.

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques, formés à partir de l'acide aminé ornithine et possédant le noyau pyrrolizidine commun (Figure 7.A), sont fréquemment trouvés dans les astéracées et les borraginacées (Aniszewski, 2007). Ces alcaloïdes rendent la plupart de ces plantes toxiques pour les mammifères.

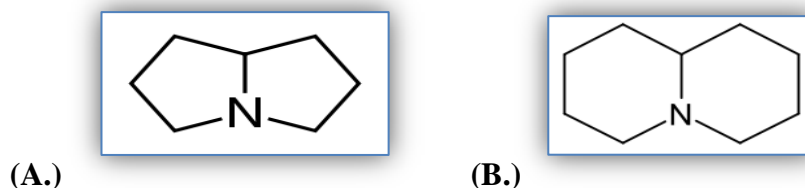


Figure 7 : Schéma du noyau commun aux alcaloïdes pyrrolizidiniques : la pyrrolizidine (A.) et du noyau commun aux alcaloïdes quinolizidiniques : la quinolizidine (B.)

Outre leur rôle dans la défense des plantes, les alcaloïdes sont utilisés en médecine. Par exemple, l'un des alcaloïdes prescrits le plus connu est un antitussif et analgésique : la codéine faisant partie du groupe des alcaloïdes isoquinoliniques (issus de la tyrosine) (Fig 8.A). Un autre alcaloïde isoquinolinique est très utilisé en médecine pour ses propriétés analgésiques : la morphine (Fig 8.B) (Croteau *et al.*, 2000; Verpoorte et Memelink, 2002).

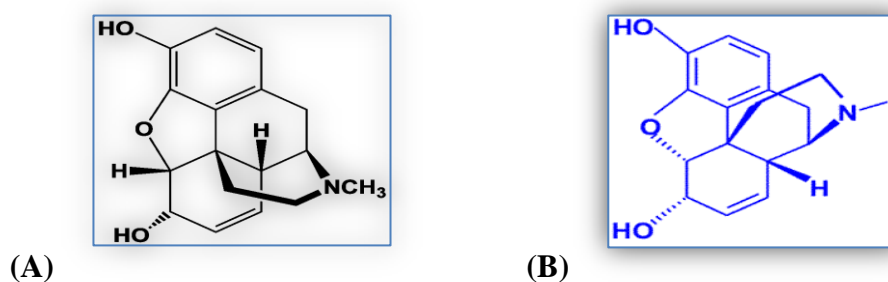


Figure 8 : Schéma de deux alcaloïdes isoquinoliniques : la codéine (A.) et la morphine (B.)

D'autre part, une des voies de biosynthèse les plus étudiées et faisant l'objet d'essai d'ingénierie génétique est celle des alcaloïdes terpénoïdes indoliques, dont environ 15 d'entre eux ont un intérêt industriel tels que les anti-tumeurs : vinblastine et vincristine (Croteau *et al.*, 2000; Verpoorte et Memelink, 2002).

La plupart des alcaloïdes sont utilisés comme médicament, mais certains peuvent être utilisés comme substance aromatique ou modèle pour les études pharmacologiques. représente un danger pour la santé humaine.

Les alcaloïdes quinolizidiniques apparaissent principalement dans les plantes. Ils sont issus de la transformation de l'acide aminé lysine et ont en commun le noyau quinolizidine (Fig 7.B) (Aniszewski, 2007). En raison de leur goût amer, les alcaloïdes de type lupinine, peuvent avoir une fonction répulsive contre l'attaque des insectes (Croteau *et al.*, 2000).

II-2-2) Les composés terpéniques (Les terpènes)

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, très diversifiés. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Extraites ces molécules sont employées comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Ils ont un caractère commun, formés d'unités isopréniques (C₅H₈). Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques (C₅H₈)_n. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux. De ce fait une classification rationnelle, basée sur ce nombre qu'ils renferment, est possible (Gonzâle. *et al.*, 1997, Mitaine-Offer, A. C. *et al.*, 2003). Tableau 1:

Tableau 1 : Classification des triterpènes

Monoterpènes	C ₁₀
Sesquiterpènes	C ₁₅
Diterpènes	C ₂₀
Sesterpènes	C ₂₅
Triterpènes et Stéroïdes	C ₃₀
Tetraterpènes	C ₄₀
Polyterpènes	(C ₁₀) _n avec n>8

II-2-3) Stéroïdes, Stérols et Terpénoïdes

Les stéroïdes, les stérols et les terpénoïdes constituent, sans doute, le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux, ils regroupent plusieurs sous familles. Les stérols jouent un rôle important dans la qualité des graisses et des huiles (Bruneton, 1993). Ils se présentent sous forme d'alcool libre (Sitostérol), ou sous forme des esters associés par le glucose (Glucoside stérols) (Bahorumet al., 1997).

Les stéroïdes et les Terpénoïdes peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2- méthyl butadiène. Chaque groupe de terpènes est issu de la condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isoprènes (chang, 2002).

II-2-4) Les saponines

Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal (Vincken et al., 2007). Le nom «saponine» est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie «savon». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante.

C'est d'ailleurs sur leur tensio-activité qu'est fondée l'utilisation multiséculaire de certaines plantes qui renferment : la saponaire (*Saponaria officinalis* L.) (Bruneton, 2009).

Comme les flavonoïdes, les alcaloïdes et les antibiotiques pour en nommer seulement certains, les saponines font partie des métabolites secondaires. Ce sont des composés qui servent de défense à la plante. De nombreuses revues rapportent que les saponines existent dans les plantes sous forme biologiquement active et sont impliquées dans la phyto protection antimicrobienne (Hostettman et Marston, 1995 ; Osbourn, 1996a,b). Les propriétés biologiques de ce métabolite secondaire ne sont pas limitées qu'à la protection des plantes, car de nombreuses espèces végétales à forte teneur en saponines sont utilisées en médecine traditionnelle. (Fujioka et al., 2003 et de. Meyer, Kim et al., 1995 ; Park et al., 2005), pour ne citer que quelques exemples.

Les saponines retiennent l'attention aussi bien pour leur exploitation industrielle en lien avec leurs propriétés pharmacologiques. Plusieurs plantes à saponines sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques, d'autres ont des applications en phytothérapie.

Les saponines trouvent également de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie cosmétique en raison de leur propriété moussante et émulsifiante. (Kobayashi et al., 2006 ; Wojciechowski, 2013). Les applications des saponines s'étendent à l'agriculture, avec utilisation pour l'assainissement des sols (Chen et al., 2008) et pesticides naturels (Chapagain et al., 2007).

II-2-5-a) Structure des saponines.

Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique.

Hostettman et Marston, 1995, attribuent aux hétérosides d'amines stéroïdiques (solasolènes et solanidanes) le rang de troisième groupe dans la famille des saponines.

Cependant d'autres auteurs distinguent ce groupe comme des alcaloïdes. Certes, ce ne sont biogénétiquement que des pseudo-alcaloïdes et, en termes de propriétés, leur comportement n'est pas sans rappeler celui des saponosides. Il n'en demeure pas moins que l'origine de leur atome d'azote les rapproche d'autres dérivés azotés du métabolisme terpénique que l'on s'accorde à considérer comme des alcaloïdes (ex. : aconitine) (Bruneton, 2009).

II-2-6) Composés phénoliques

II-2-6-a. Biochimie

Les composés phénoliques (ou polyphénols) regroupent plusieurs milliers de molécules caractérisées chez les végétaux (Albrecht *et al.*, 1999; Clé *et al.*, 2008). Ils possèdent tous un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH-) (Macheix *et al.*, 2005; Benhamou, 2009).

II-2-6-b. Structure chimique

La structure chimique des polyphénols est comparable à tous les polyphénols. Ils sont caractérisés par un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relient (Manallah, 2012).

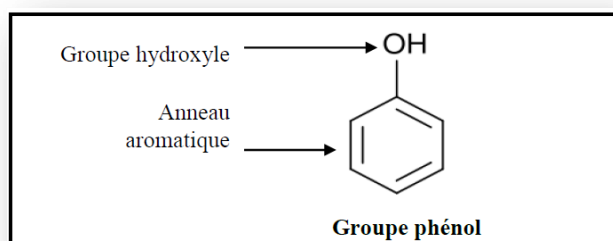


Figure 9 : La structure chimique des polyphénols

Les composés phénoliques peuvent se regrouper en plusieurs classes selon la complexité du squelette carboné, le degré de modification de ce squelette (méthylation, hydroxylation...) et les liaisons possibles avec d'autres molécules (lipides, protéines, autres métabolites)

(Tableau2).

Tableau 2: Les différents groupes de composés phénoliques. D'après (Macheix *et al.* (2005)).

Squelette carboné	Nom du groupe
C6	Phénols simples
C6 C1	Acides hydroxybenzoïques
C6-C3	Acides phénoliques
C6-C4	Naphtoquinones
C6-C2-C6	Stilbènes
C6-C3-C6	Flavonoïdes
(C6-C3)2	Lignanes
(C6-C3)n	Lignines
(C150)n	Tannins

La plupart des composés phénoliques sont issus de deux acides aminés essentiels : la phénylalanine et dans une moindre mesure la tyrosine (surtout impliquée chez les monocotylédones).

Ces acides aminés sont synthétisés à partir de la voie de l'acide shikimique. Les précurseurs sont des sucres issus du cycle des pentoses et du cycle de Calvin (Benhamou, 2009).

II-2-6-c. Biosynthèse des polyphénols

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales qui sont :

- **La voie de l'acide shikimique :**

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés (Haslam, 1994 ; Dewick, 1995).

Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. En effet, ces deux acides aminés sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique.

- **Voie de l'acétate :**

La voie de l'acétate conduit (origine de ces poly à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable, menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones (Bruneton, 1999 ; Naczki et Shahidi, 2004).

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies (du shikimate et de l'acétate) dans l'élaboration de composés d'origine mixte, comme les flavonoïdes (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

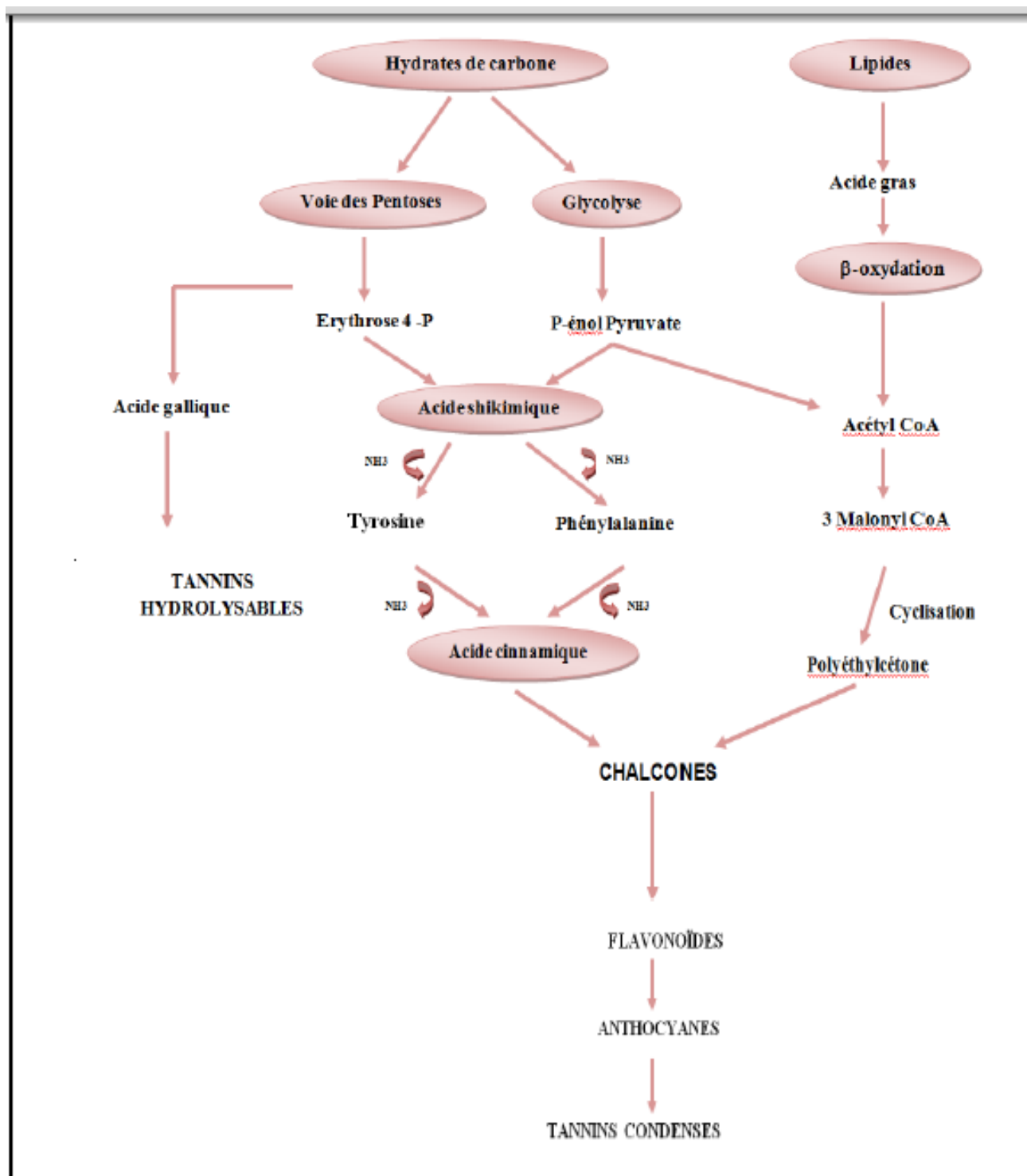


Figure 10 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (Akroum, 2011).

II-2-6-d. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées, en raison de leurs divers propriétés physiologiques, comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépato-protective, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardio protective et vasodilatatoire (Middleton *et al.*, 2000 ; Ksouri *et al.*, 2007).

Les effets bénéfiques des polyphénols intéressent particulièrement deux domaines : la phytothérapie et l'hygiène alimentaire (Leong et Shui, 2002).

II-2-6-d-1. Activité antioxydant

L'activité antioxydante des polyphénols assure une meilleure conservation des denrées alimentaires en empêchant la peroxydation lipidique. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques trouvent leur application pratique en luttant contre la production des radicaux libres néfastes pour la santé et la beauté de la peau. En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes (les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux anthocyanes, tanins et autres coumarines), chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (Hennebelle *et al.*, 2004).

C'est admis que la capacité antioxydante de plusieurs fruits est due à la présence des flavonoïdes, en fait, la plus part des constituants polyphénoliques montre un pouvoir antioxydant élevé en comparant avec les autres antioxydants connus : vitamine C, vitamine E, et β -carotène (Vinson, 1995).

La consommation des composés phénoliques se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins ou LDL). En limitant leur incrustation dans les parois des artères (Manallah, 2012).

II-2-6-d-2. Effet anti-inflammatoire

Sous l'action de la cycloxygénase et la lipoxygénase, l'acide arachidonique est métabolisé respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Une étude de Landolfi et son groupe a montré que certains polyphénols sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Les effets de la quercétine et de la myricétine sont dose-dépendants. A de fortes concentrations, ils inhibent la cycloxygénase et la lipoxygénase. Cependant, à de faibles concentrations, seule la lipoxygénase est affectée. En revanche, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cycloxygénase (Nkhili, 2009).

II-2-6-d-3. Rôle des polyphénols chez la plante

Une des fonctions majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape, fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres fonctions intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance.

Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. D'autre part, les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne (Maillard, 1996).

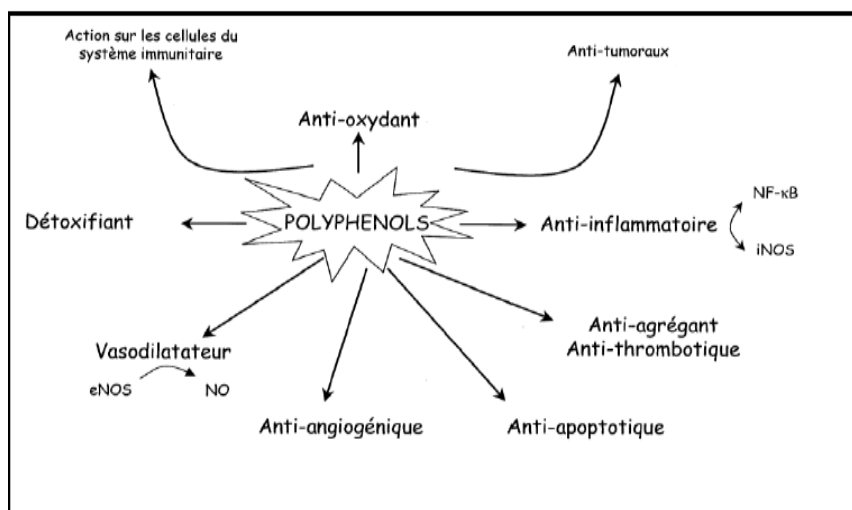


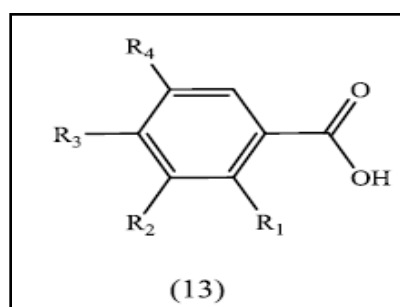
Figure 11: Effets biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

II.2.6.1. Les non flavonoïdes

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels on distingue les acides phénoliques, les Stilbènes, les Lignanes, les coumarines et les xanthones.

➤ Les acides phénoliques

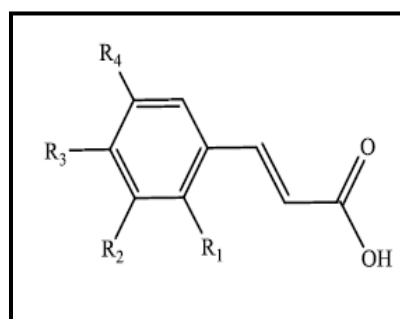
On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (fig 12) et les dérivés de l'acide cinnamique (fig 13). La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine par contre ceux d'acides hydroxycinnamiques sont très présents (Fleuriet A., et al 2005)



Composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac. benzoïque	H	H	H	H
Ac. salicylique	OH	H	H	H
Ac. p-hydroxy-benzoïque	H	H	OH	H
Ac. gallique	H	OH	OH	OH
Ac. protocatéchuique	H	OH	OH	H

Figure 12 : Dérivés de l'acide

benzoïque formule générale.



Composés	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ac. cinnamique	H	H	H	H
Ac. o-coumarique	OH	H	H	H
Ac. m-coumarique	H	OH	H	H
Ac. p-coumarique	H	H	OH	H
Ac. caféique	H	OH	OH	H

Figure 13 : Dérivés de l'acide

cinnamique formule générale

II-2-6-2) Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques très répandus dans ce genre. Ils sont présents dans presque tous les organes de la plante et jouent un rôle important dans le système de défense comme antioxydants. Ces métabolites secondaires sont connus pour leurs diverses propriétés biologiques telles que antioxydantes, anti-inflammatoire, antithrombique, antibactérienne, antihépatotoxique, antitumorale, antihypertensive, antivirale et antiallergique (Andersson *et al.*, 1996). Récemment, l'activité oestrogénique de certaines isoflavones a été mise en évidence (Harborne et Williams, 2000).

Leur synthèse débute par la formation de *p*-coumaroyl CoA catalysée par la 4-coumarate-CoA ligase (4CL) à partir de l'acide *p*-coumarique. A cette molécule de *p*-coumaroyl-CoA sont ajoutés 3 molécules de malonyl-CoA aboutissant à la formation d'une chalcone (Figure 14) catalysée par l'enzyme chalcone synthase (CHS) (Morot-Gaudry, 2012).

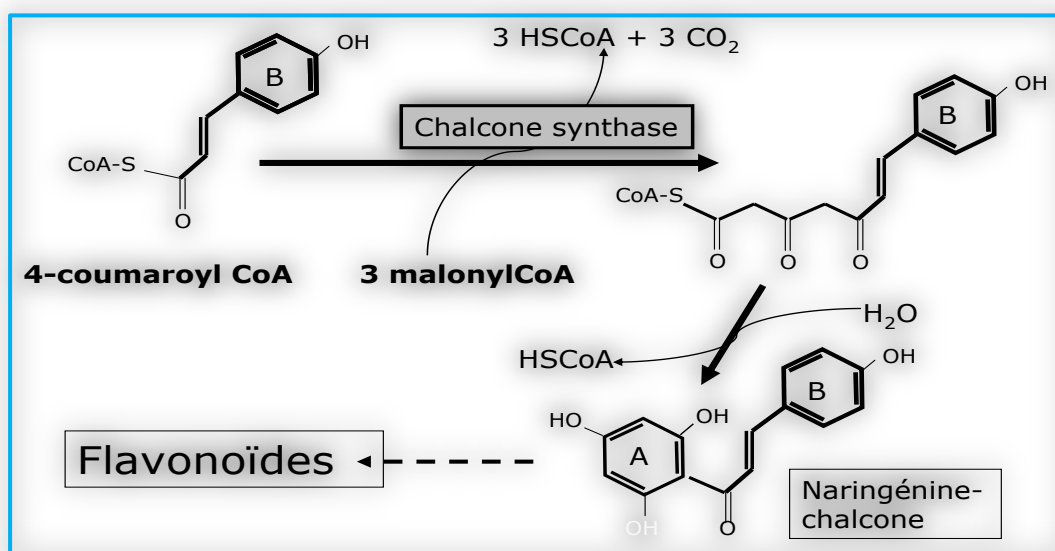


Figure 14: Molécule de chalcone, premier composé produit dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Morot-Gaudry, 2012).

II-2-6-2-1) Les flavonoïdes au sens strict

Dans ce groupe on distingue les chalcones, les aurones, les flavones, les flavanes, les flavanones, les flavanols, les flavonols et les flavanonols (Martin, S., Andriantsitohaina, R. 2002).

Chalcones et dérivés

Les chalcones sont des flavanoïdes ne comportant pas d'hétérocycle C. Ils sont prénylés le plus souvent sur le noyau A tandis que le noyau B reste peu ou pas substitué (Bahorun, T.1997). Cette prénylation peut-être cyclique du type pyrano (Maillard, M. N., 1996) ou furano (Mauro, N. M. 2006). Certaines d'entre-elles présentent une *O*-prénylation linéaire (Stöckigt J. *et al.*, 2002.) .

- **Aurones et dérivés**

Les aurones sont des isomères structuraux des flavones. Ils ont une structure proche mais différente de la plupart des autres flavonoïdes. Ces molécules dérivent de la chalcone. En effet dans les cas des aurones, la chalcone se ferme en formant un cycle à 5 atomes, alors qu'elle forme un cycle de 6 atomes pour les autres flavonoïdes (Brooth F. E. M. and Wickens G. E., 1988).

- **Flavones et flavanones**

Les flavones comme tous les flavonoïdes ont une structure C6-C3-C6 avec en C3 l'apparition d'un hétérocycle porteur d'un groupement carbonyle et d'une insaturation. Les flavanones ont une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturation au niveau de l'hétérocycle.

Les flavonols et les flavanonols correspondent aux dérivés hydroxylés des flavones et des flavanones.

Plusieurs composés sont répertoriés au niveau de ce groupe. Outre leur prénylation quasi fréquente, on rencontre de temps à autre les C-glycosyl flavonoïdes ou encore les O-glycosyl flavonoïdes.

Notons que, les flavones et les flavonols se rencontrent aussi sous forme glycosylées,

C'est le cas de la vicemine-2 (51), 5-hydroxy-6", 6"-diméthyl pyrano (2",3", 7", 8) flavone, de l'apigénine-7-O-glucoside, de la lutéoline-7-O-glucoside. La quercétine, la rutine et l'hypéroside (Brouillard R., 1993) sont presque exclusivement des flavones prénylées du type «DMP» (diméthylpyrane) ou du type « furano ».

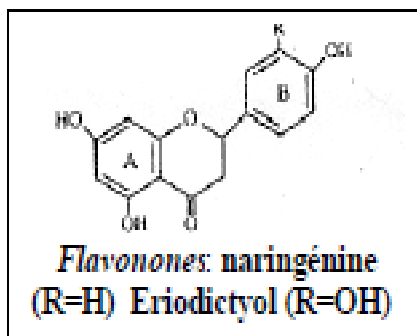


Figure 15 : Flavonones : naringénine

(R=H) Eriodictyol (R=H).

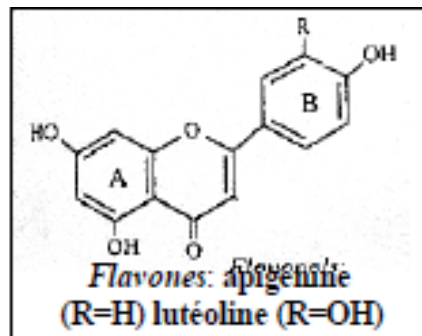


Figure 16 : Flavones : apigénine

(R=H) lutéoline (R=H).

II-2-6-2-2) Les isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes constituent une grande et très diversifiée sous classe des flavonoïdes. Ils dérivent d'une structure 1,2-diphénylpropane. Malgré leur caractérisation sporadique dans la classe des dicotylédones, ces sont des composés presque spécifiques de la famille des Fabacées. Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) au 3-phénylchromone (isoflavone) (Heard O., 1994.). Ils peuvent être classés en une douzaine de catégories structurales : 3 arylcoumarines, coumaronochromones, coumestanes, isoflavanes, isoflavènes, isoflavones, roténoïdes, ptérocarpanes. Ces catégories diffèrent entre elles, par le degré d'oxydation et l'existence ou non, d'hétérocycles supplémentaires.

II-2-6-3) Les anthocyanes

Les anthocyanes sont les pigments roses, rouges ou noirs, généralement représentées sous leur forme cation flavylum (2-phénylbenzopyrylium) rouge. Elles sont présentes sous forme de glucosides, éventuellement substitués. L'aglycone de l'anthocyane est appelé anthocyanidine. Chez les plantes, Harborne et Williams (2001) ont rapporté au moins 400 molécules différentes dérivant de 18 structures d'anthocyanidines. Leurs structures se différencient par le nombre et la position de groupes hydroxyles et méthyles sur le noyau B. Les

anthocyanidines sont le plus souvent glycosylées en position 3 et 5 avec le plus fréquemment des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) et des di- et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents (Brouillard, 1993). La glycosylation et la méthylation de ces aglycones participent à la stabilisation des anthocyanes en les protégeant de l'oxydation. Les sucres peuvent aussi être acylés par les acides cinnamique, *p*-coumarique, acétique, caféique, ferulique, sinapique et malonique, augmentant ainsi la diversité de ces molécules (Brouillard, 1993). La principale, caractéristique des anthocyanes est leur diversité de couleur allant du bleu, au rouge, mauve, rose et orange (Waterhouse, 2002 ; Kong *et al.*, 2003 ; Macheix *et al.*, 2005 ; Grotewold, 2006 ; Tanaka *et al.*, 2008).

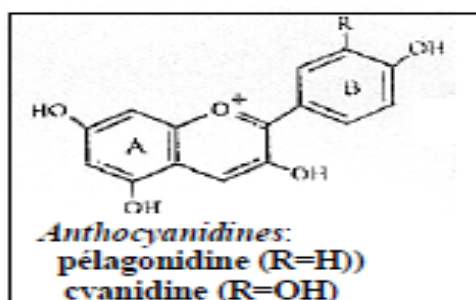


Figure 17: la formule générale de l'Anthocyanidines : pélagonidine (R=H) cyanidine (R=OH).

II-2-6-4) Les tanins

Composés aromatiques polyphénoliques, non azotés, hydrosolubles et comme les flavonoïdes, Bate-Smith et Swain ont défini les tannins comme étant des composés phénoliques solubles dans l'eau, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (Frutos *et al.*, 2004).

Chez les végétaux supérieurs on distingue deux groupes de tanins de structure différente: les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables, ou tanins condensés (Frutos *et al.*, 2004).

II-2-6-4-1) Les tanins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des esters de glucose, c'est à dire un noyau central de glucose sur lequel se fixe, au moyen d'une liaison ester, des acides (acide gallique pour le groupe des gallotanins, et acide ellagique pour le groupe des ellagitanins). Leur hydrolyse, par des acides, des bases ou certaines enzymes, libère le glucose ainsi que les acides gallique ou phénolique liés (Chung *et al.*, 1998).

II-2-6-4-2) Les tanins condensés

De structure plus complexe, les tannins condensés (proanthocyanidines) sont de loin les tanins les plus largement rencontrés dans les plantes vasculaires, des dicotylédones aux plantes plus primitives, fougères et gymnospermes. Les proanthocyanidines sont des polymères de flavan-3-oles (Catéchine) et de flavan-3,4-dioles (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux (Okamura *et al.*, 1993).

II-3) Biosynthèse de quelques composés polyphénoliques de flavonoïdes

A l'origine de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux, deux acides aminés aromatiques : la phénylalanine et la tyrosine. Par désamination, la phénylalanine donne les précurseurs immédiats des phénols : l'acide cinnamique. Ensuite vient la séquence des phénylpropanoïdes permettant la formation des principaux acides hydroxycinnamiques présents dans les végétaux sous forme d'esters ou de glucosides. Les formes métaboliquement actives des acides hydroxycinnamiques sont leurs esters avec le coenzyme A, ce qui donnera par la suite les principales classes de composés phénoliques :

- voie des acides de la série benzoïque (acide gallique) par beta-oxydation. L'acide gallique combiné à des sucres simples donnera des tanins hydrolysables.
- voie des esters chlorogéniques par estérification avec un acide alcool

- Voie des coumarines, par cyclisation interne des molécules, suivie de modifications complémentaires (glycosylation, prénylation...).
- Voie des lignines par réduction, formation des monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases.
- Voie des flavonoïdes avec un squelette moléculaire de base à double origine : 3 molécules d'acétyl CoA forme le premier cycle (A), une molécule de 4-coumaryl CoA forme le deuxième cycle (B) et l'hétérocycle (C). Cette condensation chimique va donner naissance à la chalcone.

La biosynthèse des différents groupes de flavonoïdes implique un ensemble complexe de réactions comprenant, entre autres ; des hydroxylations, des méthylations, des glycosylations, des oxydations (grandes lignes de la biosynthèse de quelques classes de flavonoïdes).

Ces réactions sont induites par des enzymes du métabolisme secondaire qui sont très peu représentées parmi les protéines des organes végétaux. Elles sont en plus facilement inhibées lors du broyage et de l'extraction, par les composés phénoliques eux-mêmes qui s'y fixent de façon irréversible. Pour étudier ces enzymes, il est donc indispensable d'utiliser des tampons d'extraction contenant des pièges à phénols et d'éviter les oxydations. Ces nombreuses contraintes rendent les études enzymatiques particulièrement difficiles. On abordera, que deux exemples d'enzyme clés.

Les Coenzymes A-Ligases permettent la mise en place des formes activées des acides hydroxycinnamiques avec le CoA. Elles jouent un rôle essentiel dans la diversification des composés phénoliques en intervenant dans la distribution des esters CoA vers différentes voies.

La chalcone synthase (CHS) intervient aussi dans une étape clé du métabolisme, qui est celle de l'entrée dans la voie des flavonoïdes.

Elle est donc à l'origine de beaucoup de molécules ayant une importance primordiale dans la vie de la plante (tels que les pigments anthocyaniques des fleurs et des fruits) ; ou dans l'utilisation agroalimentaire des plantes : tanins condensés, colorants naturels, antioxydants...la CHS est un dimère codé par une famille multi génique, dont l'expression est régulée au cours du développement de la plante par des éléments cis ou trans agissant sur le promoteur du gène.

Certaines enzymes du métabolisme phénolique ont été caractérisées chez les végétaux, et parfois même les gènes ont été clonés. Nous pouvons citer les O-méthyltransférases, les glycosyltransférases, les hydrolases qui interviennent dans la formation des tanins condensés et des différents groupes de flavonoïdes.

Les enzymes sont souvent regroupées sous forme de complexes multi-enzymatiques associés aux systèmes membranaires intracellulaires.

Notons que le métabolisme phénolique est aussi dépendant des facteurs externes.

Tout d'abord, la lumière ; agissant par l'intensité de son flux et par la nature des radiations émises. Elle agit directement sur l'induction de la synthèse de plusieurs enzymes du métabolisme phénoliques.

Les expériences ont montré que la température intervient aussi dans ce métabolisme. Un abaissement de la température associé à un traitement lumineux adéquat induit fréquemment une accumulation des anthocyanes chez de nombreux fruits. D'autre part, des perturbations du métabolisme phénolique apparaissent suite à des traitements au froid conduisant à des brunissements.

La contamination du végétal par des microorganismes pathogènes entraîne également une augmentation des teneurs en composés phénoliques correspondant à la mise en place de mécanisme de défense de la plante.

II-3-2) Biosynthèses des grandes classes des iso flavonoïdes et leurs inters conversions

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base de 15 atomes du carbone C constitués de deux cycles en C₆A et B reliés par une chaîne en C₃.

Leur biosynthèse se fait à partir d'un squelette moléculaire de base la chalcone qui a une origine biosynthétique mixte: d'une part 3 molécule d'acétyl CoA (apporté sous forme de malonyl CoA) pour le cycle A et d'autre pour une molécule de p-coumaryl CoA pour le cycle B et l'hétérocycle C. l'enzyme clé est la chalcone synthase CHS qui provoque la condensation séquentielle en formant la naringénine –chalcone (Hopkins, 2003; Herbert, 1989).

Cette chalcone de couleur jaune est métabolisé sous l'action de l'enzyme chalcone isomérase en flavanone: naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la flavanone -3-hydroxylase pour donner les flavones: apigénine, dihydroflvonol, et (2R-3R)-dihydrokaempférol respectivement. Les deux enzymes citées fonctionnent différemment; la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C₃. Le dihydroflavonol-4-reductase, se métabolise en flavonol, kaempférol ou en flavan-3, 4-diol, leucoanthocyanidols. Le pelargonidol, sous l'action de la 3-O-glycosyl-transférase se transforme en anthocyanosides: pelargonidol-3-glucoside (Marfak, 2003).

Les composés de chaque groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupement hydroxyles, méthoxyles...) sur les deux cycles aromatiques et la chaîne en C₃ intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides.

Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est dite: aglycone (Marfak, 2003).

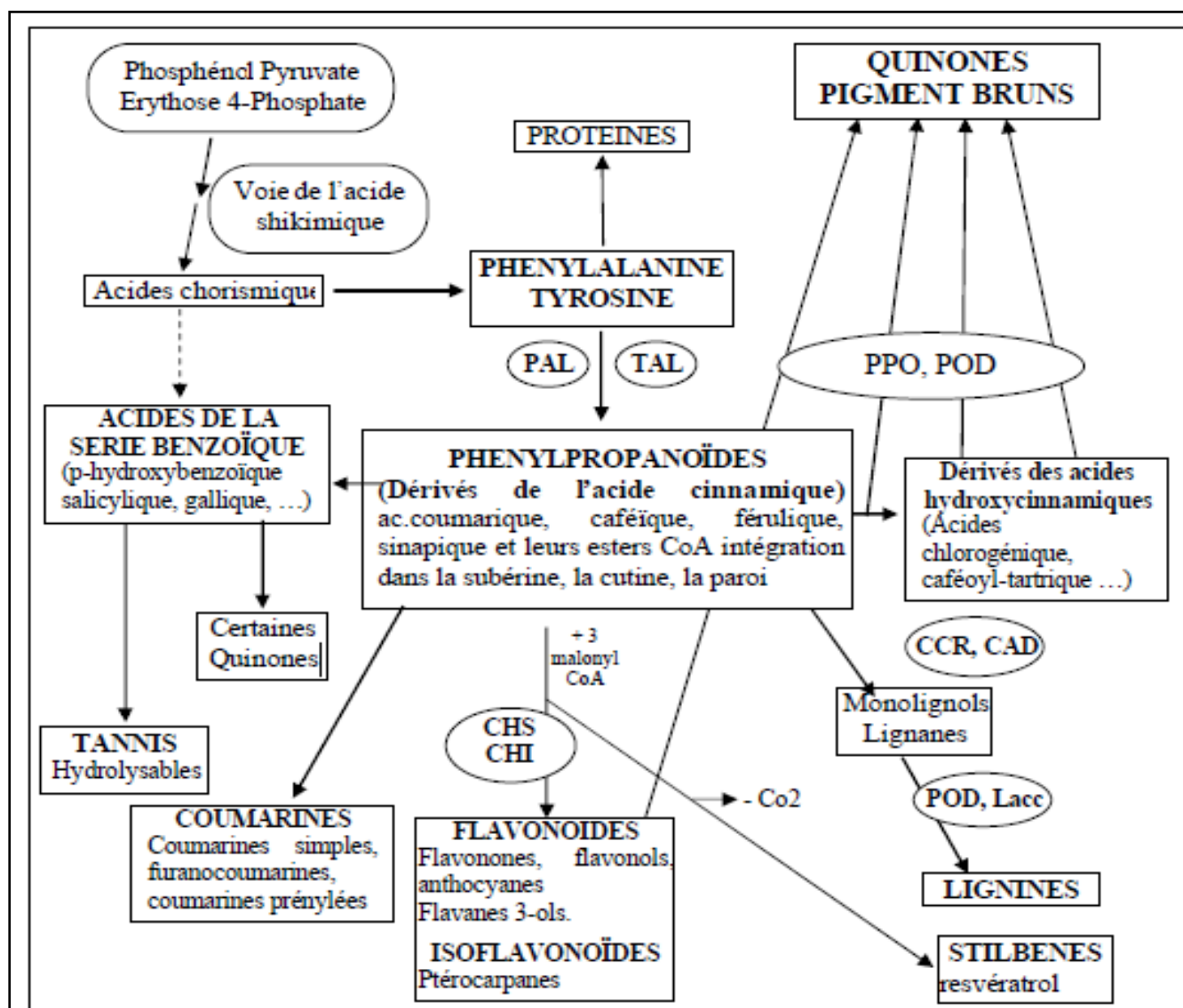


figure 18 : Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupe de composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005).

II -4) Rôles et intérêts des composés phénoliques

II -4-1) Chez les végétaux

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de la vie de la plante et dans l'utilisation que fait l'homme des végétaux.

Ils peuvent en effet intervenir dans:

La fertilité, la pigmentation, la signalisation et la protection contre des agents biotiques et abiotiques et encore la formation de polymères structuraux comme la lignine; (Guignard *et al* 1985; Maury et Legrand 2000; Brouillard *et al.*, 1997; Macheix *et al.*, 2005).

Des travaux plus anciens (Nitsch et Nitsch, 1961) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques: croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation.

Les cellules végétales répondent au stimuli environnemental en synthétisant les métabolites secondaires qui peuvent les protéger contre les agents de l'agression (Misirli *et al.*, 2001) lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. Ces réactions aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel résistant aux infections (Fleuriet et Macheix, 1990; Macheix *et al.*, 2005; Brouillard *et al.*, 1997).

Dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume et qualité nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules) et des produits qui en dérivent par transformation; (Macheix *et al.*, 2005; Dicko *et al.*, 2006).

Et selon Sarni Machando et Cheynier (2006) les polyphénols exercent un effet majeur sur les caractères organoleptiques des produits;

Dans la variation de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées ...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini; (Amiot *et al.*, 1997; Fleuriet et Macheix, 1990; Lattanzio *et al.*, 1994; Macheix *et al.*, 1990).

II -4-1) Chez les humains

D'autre part, et d'après Bensegueni (1989) les techniques modernes d'isolement de molécules et d'exploration médicales montrent que beaucoup de propriétés thérapeutiques reposent sur les produits du métabolisme secondaires, et qu'il existe une relation directe entre les propriétés physicochimiques de ces composés et leur activité biologique et/ou pharmacologique.

De nos jours, les propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires des polyphénols participent à la prévention de diverses pathologies impliquant le stress oxydant et le vieillissement cellulaire, les maladies cardiovasculaires ou dégénératives, l'ostéoporose, (Wang et Mazza, 2002; Macheix *et al.* 2005, Sarni Machando et Cheynier, 2006; Visioliet *al.*, 1999).

Ils diminuent la perméabilité des vaisseaux capillaires renforçant leur résistance, ils agissent contre les radicaux libres (Lahouel, 2004; Nissiotis et Tasioula-Margari, 2002).

II -5) Les antioxydants

II -5-1) Généralités sur les antioxydants

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres, susceptibles d'inhiber directement leurs productions, de limiter la propagation ou de détruire ces espèces radicalaires (Favier, 2003). Deux lignes de défense pour détoxifier la cellule sont connues :

- Les antioxydants endogènes :

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : le superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Avissar et al., 1989).

Chaque une des enzymes précédemment citées neutralisent sélectivement tel ou tel radical libre.

-Les antioxydants exogènes :

De nombreuses molécules issues de notre alimentation sont dotées d'un pouvoir antioxydant, parmi : les vitamines (la vitamine C, la vitamine E), certains métabolites secondaires végétales (les caroténoïdes, les polyphénols et les alcaloïdes), ...etc (Lehucher et al., 2001).

II -5-2) Mécanismes d'action des radicaux libres

IV-2-2) Mécanisme d'action

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résulte d'une structure de donneur atome d'hydrogènes ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus, leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulier et pour la transformer en chaleur (Anderson et al., 1996).

Les radicaux libres réagissent particulièrement sur les macromolécules lipidiques, protéiques, glucidiques et nucléiques. La réaction initiale stimule d'autres réactions, ce qui accroît la production de radicaux libres. Le résultat de ces perturbations est un dysfonctionnement cellulaire menant à des désordres inflammatoires, à des troubles immunologiques, à des problèmes neurologiques, à des mutations génétiques et au vieillissement (Poortmans et Boisseau, 2003).

II -5-3) Les principales sources des antioxydants (Origines des antioxydants).

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories (Tableau 3) avec :

- les enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme.
- les nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation.

Cette dernière classe d'antioxydants nous intéresse particulièrement puisque nous verrons s'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules.

Tableau 3 : Les deux types de protections antioxydantes de l'organisme : les systèmes enzymatiques et les nutriments antioxydants.

Systèmes antioxydant enzymatiques endogènes	Système antioxydants d' origine alimentaire
Superoxyde dismutase	Vitamine E
Glutathion peroxydase	Vitamine C
Catalase)	Taurine
Lipase, protéase, endonucléase (éliminent les molécules oxydées	Caroténoïdes (lycopène, lutéine...) polyphénols
Albumine, ferritine (complexent les ions divalents)	Minéraux et oligo-éléments

II -5-4) Rôles des complexes antioxydants :

Pour illustrer le rôle des antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques, nous allons détailler successivement plusieurs exemples. Ceux-ci ont été choisis car ils correspondent soit, à des situations où les animaux sont confrontés au stress oxydatif, soit, à des maladies où un stress oxydatif serait incriminé dans la pathogénie.

Il s'agit de :

- l'effort physique intense,
- la fonction immunitaire,
- le vieillissement,
- les maladies neurodégénératives : le syndrome de dysfonctionnement cognitif canin,
- les maladies oculaires : la cataracte et la dégénérescence maculaire,
- les maladies ostéo-articulaires : l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde,
- les maladies cardio-vasculaires : les cardiopathies induites expérimentalement ou non,

- le cancer,
- le diabète de type I et la formation de corps de Heinz chez le chat.

Nous nous plaçons dans le cadre d'une supplémentation apportée à un animal en bonne santé. Notre but est de savoir si l'enrichissement au quotidien de son alimentation permettrait de réduire l'occurrence des dommages oxydatifs et leur accumulation. Les antioxydants n'interviennent pas ici comme médicaments, mais comme moyen de prévenir l'apparition et le développement de lésions oxydatives pouvant déboucher ensuite sur des états pathologiques.

Dans chaque cas, nous insisterons sur l'implication du stress oxydatif dans l'apparition et l'entretien de ces phénomènes afin de justifier l'utilisation des antioxydants. Nous discuterons ensuite, de leur intérêt à partir des résultats des expériences de supplémentation réalisées.

Finalement, nous tacherons de mieux comprendre leurs mécanismes d'action afin de préciser leurs conditions d'utilisations.

II -6) Intérêt des antioxydants dans la lutte contre le stress oxydatif

La production de radicaux libres est compensée par leur élimination grâce aux capacités antioxydantes de l'organisme. Chez tout individu, il existe, en permanence un équilibre entre les dégâts causés par les molécules oxydantes et leur réparation. Si celui-ci est rompu, le stress oxydatif apparaît. Il semble donc intéressant de soutenir les défenses antioxydantes de l'organisme pour éviter cette rupture. Les défenses exogènes semblent les plus faciles à conforter puisqu'elles pourraient être renforcées par des apports de compléments alimentaires. Cela pourrait être très intéressant de les utiliser, par exemple, chez l'individu vieillissant. En effet, avec l'âge, les individus sont plus sensibles au stress oxydant.

Leur capacité d'absorption intestinale de molécules antioxydantes d'origine alimentaire est moins efficace. Les mécanismes de défenses endogènes de l'organisme s'essouffant avec l'âge, les espèces radicalaires se multiplient.

CHAPITRE III

III). Inflammation

Généralité :

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation. Une régulation défectueuse peut engendrer des dommages irréversibles. Une réponse insuffisante conduit à une immunodéficience pouvant entraîner une infection secondaire ou même un cancer. Exacerbée, au contraire, elle augmente la morbidité et la mortalité dans des pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou encore le diabète. Mal contrôlée, l'inflammation peut s'étendre au reste de l'organisme via la circulation sanguine. Elle peut alors conduire à des dommages tissulaires irréversibles locaux ou généralisés, parfois à un choc septique entraînant dans les cas les plus graves le décès (Nathan, 2002; Barton, 2008). Deux stades de l'inflammation existent, l'inflammation aiguë et chronique.

III).1.L'inflammation aiguë

Il s'agit de la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (Charles et al., 2010). Les étapes de la réponse inflammatoire aiguë sont toujours les mêmes quelque soient le stimulus inflammatoire et le tissu enflammé. Des modifications vasculaires, telles que l'augmentation de la perméabilité de la paroi vasculaire apparaissent au niveau du tissu enflammé.

Cette augmentation de la perméabilité permet au liquide plasmatique de s'échapper vers le milieu extravasculaire, phénomène connu sous le terme d'exsudation plasmatique. Ces modifications vasculaires permettent le recrutement des leucocytes dans le milieu extravasculaire qui se déplacent en suite vers le site inflammatoire. Ces leucocytes détruisent et éliminent les stimuli nocifs qui s'y présentent, laissant place à la réparation du tissu endommagé (Rankin, 2004).

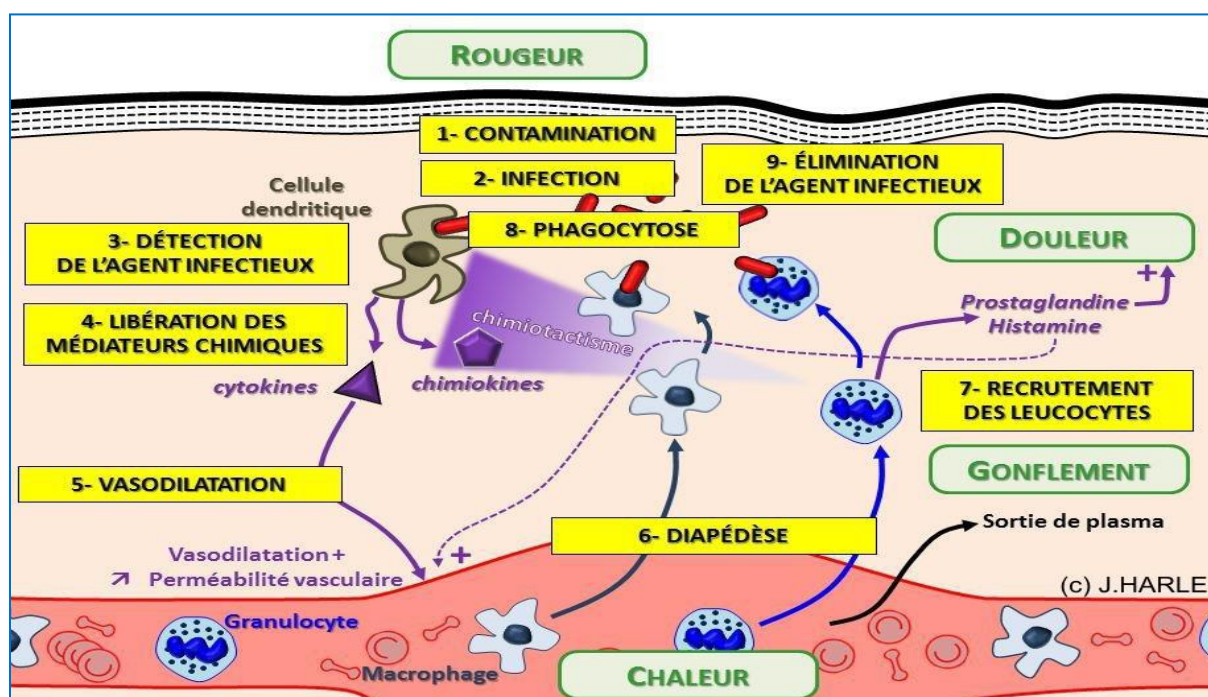


Figure19 : schéma des symptômes d'une réaction inflammatoire aiguë. (Rankin, 2004).

L'inflammation aiguë se constitue en trois phases :

III).1.1.Phase vasculaire

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes. Elle est due à l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine, l'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux.

Cette constriction n'est pas innocente sur les plaquettes présentes dans la circulation, laquelle est perturbée. Ces plaquettes vont alors s'activer. Très vite à cette vasoconstriction, va faire suite une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui explique l'extravasation des cellules sanguines (diapédèse) (Fig 20) .Elle se traduit cliniquement par les quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aiguë: rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur. Elle comporte trois phénomènes: une congestion active, un œdème inflammatoire (l'exsudat), une diapédèse leucocytaire (Rousselet et al, 2005).

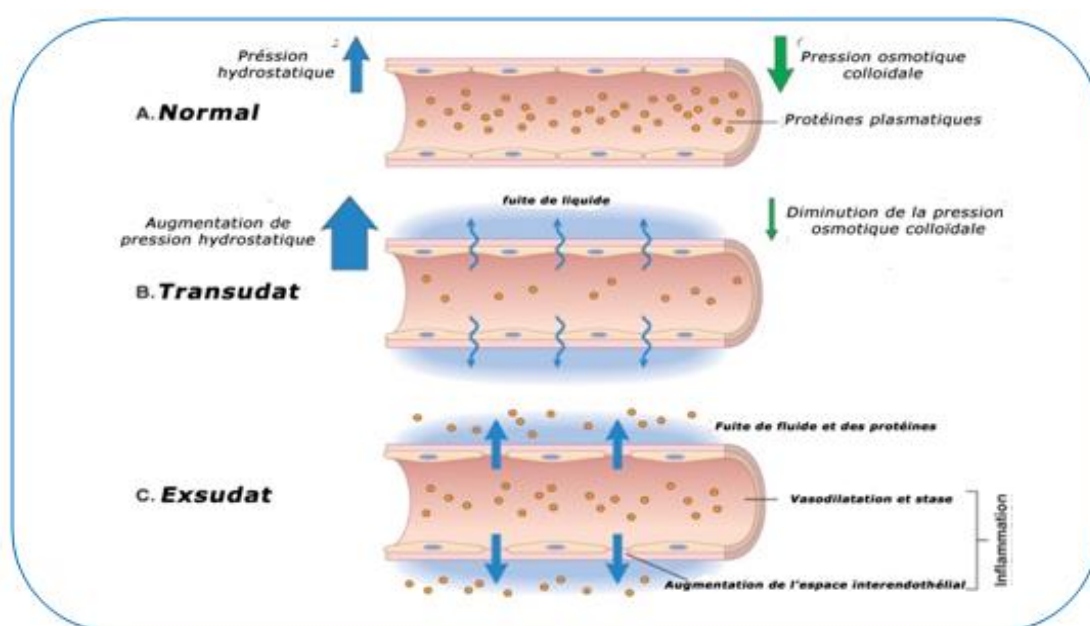


Figure 20: Formation du transsudat et d'exsudat (Kumar *et al.* 2007).

III).1.2.Phase cellulaire (recrutement des leucocytes)

Les phénomènes vasculo-exsudatifs initiaux permettent l'arrivée dans le foyer inflammatoire des leucocytes. Les premiers sur place (environ 6 heures) sont les polynucléaires.

Le plus souvent, les polynucléaires sont progressivement remplacés sur le site inflammatoire par les cellules monocytes. Parmi celles-ci, les macrophages ont pour fonction d'assurer la détertion grâce à leur capacité de phagocytose. Il s'y associe des lymphocytes et des plasmocytes qui participent à la réponse immune spécifique de l'antigène (Nathan, 2002).

L'afflux des cellules, fait que celles-ci vont d'abord se marginaliser sur le site de l'agression en environ 30 minutes. C'est à ce moment qu'on pourra constater « in situ » la présence de polynucléaires neutrophiles, les quelles sont plaqués le long des cellules endothéliales de l'endroit concerné. Ces cellules vont traverser la paroi, grâce à de nombreux facteurs attractants comme l'IL8, C5a et LTB4 (Fig 21). Ces cellules vont en effet ingérer les éléments lésés. Cette fonction n'est pas simple. Elle repose sur la dégranulation des composants internes de la cellule. Ceci conduit à la sécrétion des protéases (élastase et collagénase), et la libération des radicaux libres.

Les PMNs vont contribuer à l'éradication des corps étrangers (s'il y a lieu) ou des tissus lésés (en cas de traumatisme par exemple). Dans ce type de situation, la réaction va s'arrêter mais ceci n'est pas toujours le cas et les macrophages dont le pouvoir phagocytaire est important, vont intervenir. Ceci constitue le passage de la réaction inflammatoire proprement dite à la réaction immunitaire et la mise en place des processus inhérents (Charles et al., 2010).

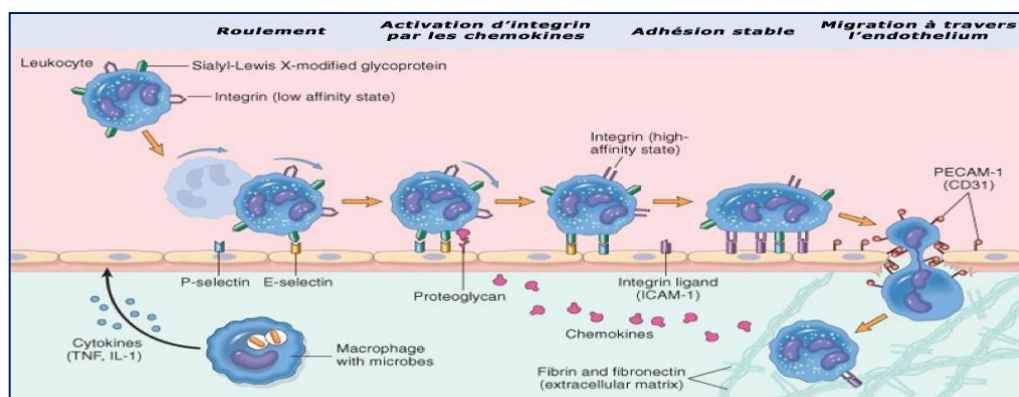


Figure 21 : Processus de migration des neutrophiles à travers les vaisseaux sanguins(Kumar et al., 2007).

II).1.3.Phase de résolution

La phase de résolution, dite de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les PMNs, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps en la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes, ces cellules pouvant produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène de type I et III) ou de leur lame basale (collagène de type IV et V, laminine). Si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction du tissu atteint, d'autres cellules vont intervenir pour réparer le nouveau tissu. Les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Weill et al. 2003).

III).2.L'inflammation chronique :

Morphologiquement, l'inflammation chronique est définie par la présence de lymphocytes, macrophages, et plasmocytes dans les tissus. Dans de nombreux cas, la réponse inflammatoire chronique peut persister pendant de longues périodes (plusieurs mois ou années). Elle est considérée comme être causée par l'engagement persistant des réponses de l'immunité innée et acquise, comme dans la polyarthrite rhumatoïde, rejet de l'allogreffe chronique, dans la béryllose, et dans l'inflammation granulomateuse.

Il est prouvé que les macrophages dans ces lésions produisent une série de médiateurs pro-inflammatoires qui activent les fibroblastes pour fixer le collagène et activer les autres macrophages et lymphocytes pour libérer des médiateurs responsables des réponses inflammatoires.

L'inflammation chronique est 5 initialement déclenchée par des réponses vasculaires qui impliquent l'apparition de molécules d'adhésion sur la surface des cellules endothéliales qui vont spécifiquement entraîner l'adhésion des lymphocytes et des monocytes, et permettent leur transmigration dans le compartiment extravasculaire (Charles et al., 2010). Tout comme dans la réponse inflammatoire aiguë, les lymphocytes et les monocytes, subissent un processus d'activation qui favorisent l'adhérence et la transmigration de ces cellules dans le compartiment extravasculaire. En tout type de réponse inflammatoire, les différences entre les types de molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales détermineront le type de leucocytes qui migrent (Nourshargh et al. 2006; Charles et al. 2010).

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé (Rankine, 2004). Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années. Elle peut même se prolonger tout au long de la vie de l'individu (Fauve et Hevin, 1998). A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentatives de réparation sont également présents (Weill et al., 2003).

Les cellules mononuclées et particulièrement les macrophages constituent l'essentiel de l'infiltrat cellulaire vers le site inflammatoire (Fauve et Hevin, 1998 ; Weill et al., 2003).

La présence de lymphocytes dans l'infiltrat est habituelle. Tandis que la présence des polynucléaires éosinophiles est caractéristique des inflammations chroniques allergiques et parasitaires (Dombrowicz et Capron, 2007).

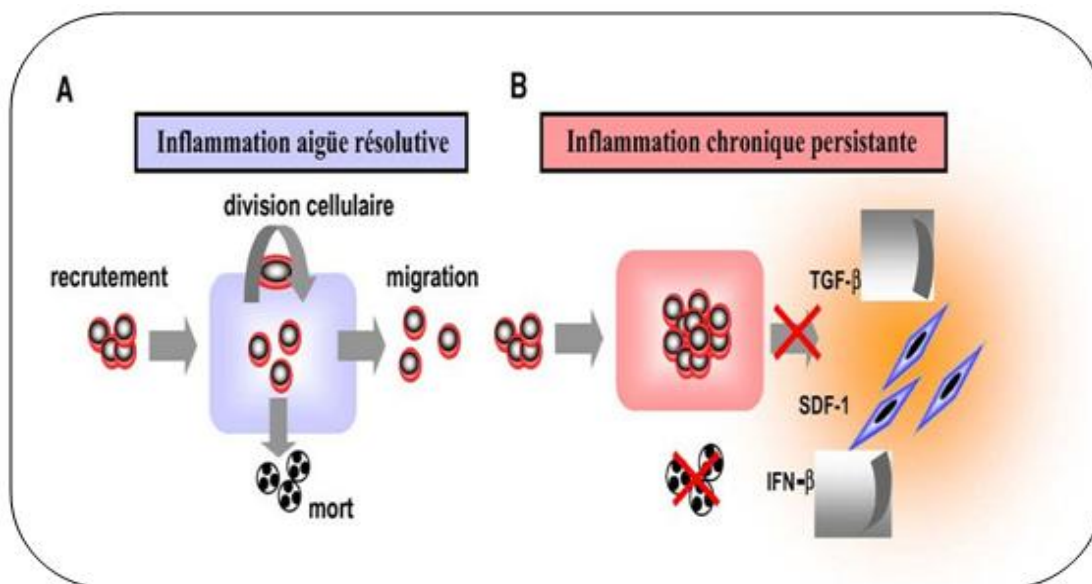


Figure 22 : L'homéostasie tissulaire dans le cas de l'inflammation aigüe (A) et l'inflammation chronique (B) (Angela *et al.* 2004).

III.3. Cellules impliquées dans la réaction inflammatoire

Les différentes cellules impliquées dans une réaction inflammatoire sont :

3.1. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) :

Les polynucléaires neutrophiles sont les principaux agents cellulaires impliqués dans le mécanisme inflammatoire qui a pour but de recruter rapidement les leucocytes sur le lieu d'une lésion ou d'une infection (Wagner, 2005). Elles sont également impliquées dans la réparation tissulaire (Eming *et al.*, 2007).

3.2. Les mastocytes :

Ils sont des cellules résidentes des tissus conjonctifs. De plus, ils jouent un rôle très important dans le déclenchement de la réaction inflammatoire (Weill *et al.* 2003).

Ils se caractérisent par la présence dans leur cytoplasme de très nombreuses granulations contenant des médiateurs inflammatoires comme la sérotonine, l'histamine, l'héparine et des cytokines (Williams et Galli, 2000). Ils sont aussi impliqués dans la réparation tissulaire (Eming *et al*, 2007).

3.3. Les monocytes macrophages circulants et macrophages tissulaires :

Ils constituent le système des phagocytes mononucléés. De nombreuses situations engendrent l'activation des macrophages rencontre avec un micro-organisme, avec une particule inerte, avec un produit de dégradation tissulaire ou liaison avec un ligand naturel pour un de leurs récepteurs : anticorps, thrombine, fibrine, facteurs de croissance, cytokines (Rankine, 2004).

3.4. Les plaquettes sanguines :

Elles sont indispensables à l'hémostase primaire. Elles contribuent au processus inflammatoire par la libération de nombreux médiateurs comme le fibrinogène, le plasminogène, des protéases plasmatiques ainsi que de la sérotonine (Steinhubl, 2007).

3.5. Les Polynucléaire basophiles :

Elles sont les plus rares des polynucléaires (moins de 1 % des cellules inflammatoires). Elles présentent également un cytoplasme qui contient de très nombreuses granulations riches en médiateurs pro-inflammatoires. Les basophiles sont des cellules phagocytaires qui interviennent principalement dans les réactions allergiques (Rankin, 2004).

3.6. Les polynucléaires éosinophiles :

Elles représentent de 1 à 6% des cellules inflammatoires. Elles possèdent aussi des propriétés phagocytaires (Rankin, 2004). Leur fonction principale est de s'attaquer aux parasites via le contenu de leurs granules.

Elles interviennent aussi dans la modulation et la propagation de la réponse immunitaire adaptative en activant directement les lymphocytes T (Hogan *et al*, 2008).

3.7. Les fibroblastes:

Les fibroblastes sont des cellules ubiquitaires et principales du tissu conjonctif ; elles interviennent dans la production de la matrice extracellulaire qui offre une résistance mécanique aux cellules. Ils produisent au cours de la réaction inflammatoire des enzymes de destruction de la matrice : collagénases, gélatinase, stromélysine, cathepsines, sérine protéase...etc. Ils participent aussi aux phénomènes de cicatrisation par la production de différents constituants de la matrice : collagènes, protéoglycanes, fibronectine, élastine (Botting *et Botting*, 2000).

3.8. Les lymphocytes :

Il existe deux types de lymphocytes impliqués dans l'inflammation: les lymphocytes T qui se différencient dans le thymus et les lymphocytes B acquièrent leur maturation dans la moelle osseuse. Ils interviennent principalement dans les mécanismes de l'immunité mais ils participent à la réaction inflammatoire par la production de différentes cytokines (Adrie *et Pinsky*, 2000).

3.9. Les cellules de l'endothélium des vaisseaux de petit et moyen calibre:

Elles jouent un rôle important au cours de l'inflammation (Wagner *et Roth*, 2000). L'état de jonction des cellules entre elles et avec la matrice extra-cellulaire contrôle le passage des liquides et des macromolécules de l'espace intra-vasculaire vers les tissus interstitiels. Cet état de jonction fait intervenir de nombreuses protéines trans-membranaires ou intra-cellulaires tels que connexines, cadhérines, protéines du cytosquelette, intégrines de surface (Janeway *et al*, 2001).

Les cellules endothéliales sont capables de participer aux phénomènes de réparation post inflammatoire par la production de protéines matricielles et de différentes protéases (Aggarwal et Shishodia, 2006).

III.4.Les médiateurs de la réaction inflammatoire

La réponse inflammatoire provoque la libération de divers médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs affectent le développement et la résolution de l'inflammation en agissant sur les différentes cellules impliquées dans la réaction inflammatoire (Rankin, 2004). Le déclenchement et la poursuite de l'inflammation, sa diffusion à partir du foyer inflammatoire font appel à des facteurs synthétisés localement ou qui sont présents à l'état de précurseur inactif dans la circulation sanguine. Le tableau 1 résume l'origine et les effets des plus importants médiateurs de l'inflammation.

Tableau 4 : Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires. (Rankin, 2004; Male *et al*, 2007).

Origine	Types de maladie
Désordres dans les quelles le rôle pathogénique principal revient à l'inflammation.	Artériosclérose Arthrose Asthme Polyarthrite rhumatoïde Eczéma Maladie de Crohn (MC) Goutte Thyroidite d'Hashimoto Maladie d'Alzheimer Lupus érythémateux disséminé
Maladies d'origine infectieux dans les quelles l'inflammation contribue dans la pathologie.	Hépatite C Tuberculose Tuberculose Dysenterie bactérienne
Maladies d'origines divers dans les quelles la fibrose poste inflammatoire est la cause principale de la pathologie.	Cirrhose hépatique poste virale ou alcoolique Fibrose pulmonaire idiopathique Bilharziose

III.5.Implications pathologiques de l'inflammation

De nombreuses maladies inflammatoires sont liées à des mécanismes considérés comme dysimmunitaires, à savoir les maladies auto-immunes systémiques et localisées, les maladies auto-inflammatoires, les affections inflammatoires de mécanisme indéterminé notamment, des affections iatrogènes ou paranéoplasiques dont le mécanisme n'est pas auto-immun (Charles *et al*, 2010). Quelques exemples sont rapportés dans le tableau 5.

Tableau 5: Exemples de maladies liées à l'inflammation (Nathan, 2002)

Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes.	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine	Mastocytes et plaquettes.	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur activateur des plaquettes (PAF)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales.	Assure la vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule la broncho constriction, l'aggregation des plaquettes et la libération des médiateurs qu'elles renferment, induit la production des EOR et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages.
Kalicroïne	Présente dans le plasma	Transforme et active le système des Kinines
Plasmine	Présente dans le plasma	Clive le composant du complément C3 pour générer le C3a et le C3b
Leucotriènes : -LTC4, LTD4, LTE4	Essentiellement par les leucocytes	Augmentent la perméabilité des micro-vaisseaux.

III.6.Anti-inflammatoires

Généralité :

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui antagonisent les processus inflammatoires. A côté des analgésiques antipyrétiques tels que l'acide acétylsalicylique (Aspirine) doués, à forte dose ou à doses continues, de propriétés anti-inflammatoires (Mohr *et al*, 2001).

Les anti-inflammatoires sont répartis en deux grands groupes :

III.6.1.Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur, la fièvre et l'inflammation depuis plus de 3000 ans et ils sont toujours utilisés quotidiennement par des millions de patients à travers le monde. Ce sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique (tableau 3) mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (Bidaut-Russel, 2001).

Cependant, leur utilisation thérapeutique à long cours est souvent associée à des effets indésirables tels que les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale. Ces effets indésirables sont généralement liés à l'inhibition des isoenzymes cyclo-oxygénases (COX-1 et COX-2) par les AINS classiques. La COX-1 est constitutive et joue un rôle physiologique en maintenant l'intégrité des tissus, tandis que la COX-2 est inductible, sa synthèse est stimulée par le TNF α et l'interleukine1. L'apparition des AINS sélectifs du COX-2 appelé coxibs vient réduire les effets secondaires gastro-intestinaux, mais ils induisent un risque cardiovasculaire (Ouédraogo *et al*, 2012). (fig 23).

Tableau 6 : Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. (Wallace et Staats, 2004).

Classe structurale	Nom scientifique	Nom commercial
Salicylates	Acétyle salicylique Diflusal	Aspirine® Dolobid®
Dérivés d'acide propénoïque	Ibuprofene Fenoprofene calcium Flurbiprofen Ketoprofen	Ibuprofene® Nalfon® Ansaid® Nalfon®
Dérivés d'acide acétique	Diclofenac	Voltarene®
Indoles	Indométacine Tolmetin Sulindac	Indocine® Tolectine® Clinoril®

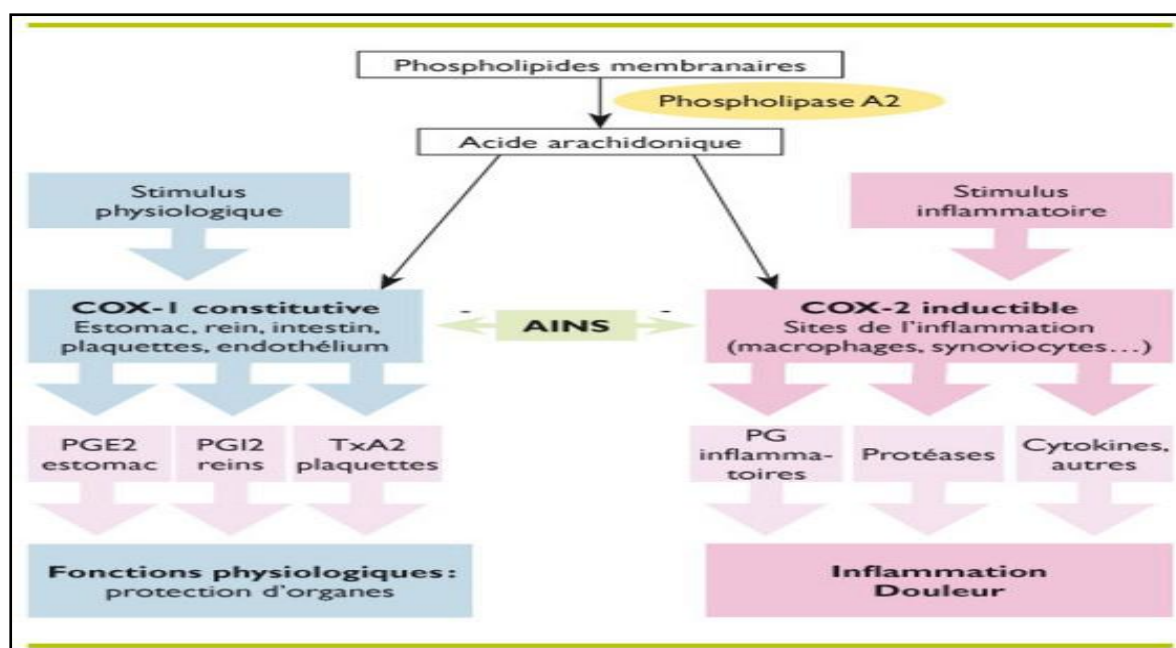


Figure 23: Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens

(Hilda *et al.* ,2010)

III.6.2.Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol (tableau 4). Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immune (Payne et Adcock., 2001).

Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie. Divers troubles peuvent être observé. Ces troubles peuvent être aiguës tel que l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'euphorie avec insomnie allant jusqu'à une psychose aiguë et l'apparition d'ulcères gastro-duodénaux. Des troubles chroniques peuvent aussi se manifesté tel que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Henzen, 2003)

Tableau 7 : Principaux glucocorticoïdes(GC) (Henzen, 2003).

Glucocorticoïde	Nom commercial
Cortisol (Hydrocortisone)	Hydrocortone®, Solu-Cortef®
Cortisone	Cortison CIBA®
Prednisone	Prednison Streuli®
Prednisolone	Spiricor®t, Ultracorten®
Methylprednisolone	Urbason®, Solu-Medrol®
Triamcinolone	Kenacort®, Ledercort®
Bétaméthasone	Celestene®, Diprostene®
Dexaméthasone	Fortecortin®, Decadron®

III.6.3.Anti-inflammatoires d'origine végétale

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes.

Tableau 8 : Exemples de plantes médicinales douées d'activités anti-inflammatoires (Barnes,1998).

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Nom commun	Utilisation
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Gingembre	arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
<i>Helleborus orientalis</i>	Ranunculaceae	Racines	Lenten-rose	Oedemes, douleurs rhumatismales
<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	Feuilles, Racines	Ortie	Rhinite allergique, eczéma goutte, douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis R.</i>	Rosaceae	Feuilles	Laurier	Fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Rhizome	Curcuma	Douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales
<i>Nerium oleander L.</i>	Apocynaceae	Fleurs	Laurier rose	Douleurs, maux de tête
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pédaliacées	Tubercule	Griffe du diable	Arthrose, lombalgie, nevralgie, maux de tête, fièvre
<i>Rhododendron ponticum L.</i>	Ericaceae	Feuilles	Rhododendron pontique	Oedèmes, états grippaux, mal de dents
<i>Juglans regia L.</i>	Juglandaceae	Feuilles, fruits	Noyer commun	Douleurs rhumatismales, fièvre, eczéma. Malaria
<i>Oenothera biennis</i>	Onagraceae	Graines	Onagre bisanuelle	Douleurs rhumatismales,

IV. Stress oxydatif

Définition :

Le déséquilibre entre la production de radicaux libres et de métabolites réactifs, que l'on appelle des oxydants ou des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et leur élimination par des mécanismes de protection, dénommés antioxydants est appelé stress oxydatif (Reuter et al. 2010). La balance oxydative définit donc l'équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les espèces antioxydantes. En médecine la balance oxydative est un concept pour maintenir l'organisme en bonne santé (Davies, 2000; Finkel and Holbrook, 2000). Son déséquilibre est sujet de nombreux problèmes comme les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Heim et al. 2002; Noguchi, 2002). Cette balance est dynamique et est maintenue dans son bon équilibre par des mécanismes enzymatiques ou par des apports extérieurs de molécules très actives (Noguchi, 2002).

IV.1.Espèces oxygénées réactives

En conditions physiologiques, le dioxygène, élément indispensable à la vie, produit au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées réactives (EOR) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces EOR, dont font partie les radicaux libres, sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir, dans l'environnement où elles sont produites, avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, glucose, ...).

Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de mort cellulaires, il est actuellement admis que les EOR sont de véritables messagers secondaires impliqués dans l'expression et la régulation des fonctions de prolifération et de mort cellulaire. De plus, ils sont des médiateurs inflammatoires impliqués dans diverses pathologies neurodégénératives ou vasculaires telles que l'athérosclérose ou l'hypertension (Dhalla NS. et al. 2000).

IV.2.sources des espèces oxygénées réactive

Les ROS sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par divers mécanismes. On parle donc de sources endogènes et de sources exogènes.

IV.2.1. Sources exogènes

Les radiations X ou gamma peuvent par différents mécanismes faire apparaître des radicaux libres en scindant la molécule d'eau en deux radicaux. Les rayonnements UV sont capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet après activation des photosensibilisants.

Une large variété de xenobiotiques (toxines, pesticides, herbicides, etc...) et médicaments (Antibiotiques, anticancéreux, etc...) peuvent contribuer à la production des ROS qui se forment comme un des produits de leur métabolisme (Valko *et al.* 2007).

IV.2.2.Sources endogènes des ROS

Dans la cellule, de nombreux systèmes enzymatiques sont capables de générer des oxydants :

(Salvayre *et al.* 2003)

- Les NAD(P) H oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent O₂

●- en utilisant NADH ou NADPH comme substrat.

- La xanthine-oxydase joue un rôle important dans la production des ROS (particulièrement O₂

●- et H₂O₂), lors de l'ischémie/reperfusion.

- Lors du métabolisme de l'acide arachidonique, ce dernier peut être oxydé soit par les cyclooxygénases, soit par les lipooxygénases (métallo-enzymes à fer), pour former entre autre des hydroperoxydes qui sont des précurseurs de leucotriènes, puissants médiateurs de l'inflammation.

De plus, dans l'organisme, l'oxygène est réduit à 95 % dans les mitochondries par voie enzymatique en molécule non toxique H₂O. Cependant, il peut subir une réduction monoélectronique et former une espèce beaucoup plus réactive comme l'anion superoxyde O₂⁻

●-. Cet anion n'est pas le radical le plus délétère, cependant il peut donner naissance comme indiquée précédemment à des espèces beaucoup plus réactives comme le radical hydroxyle

HO●. Ces ROS mitochondriales pourraient intervenir dans l'oxydation des LDL (Valko *et al*, 2007).

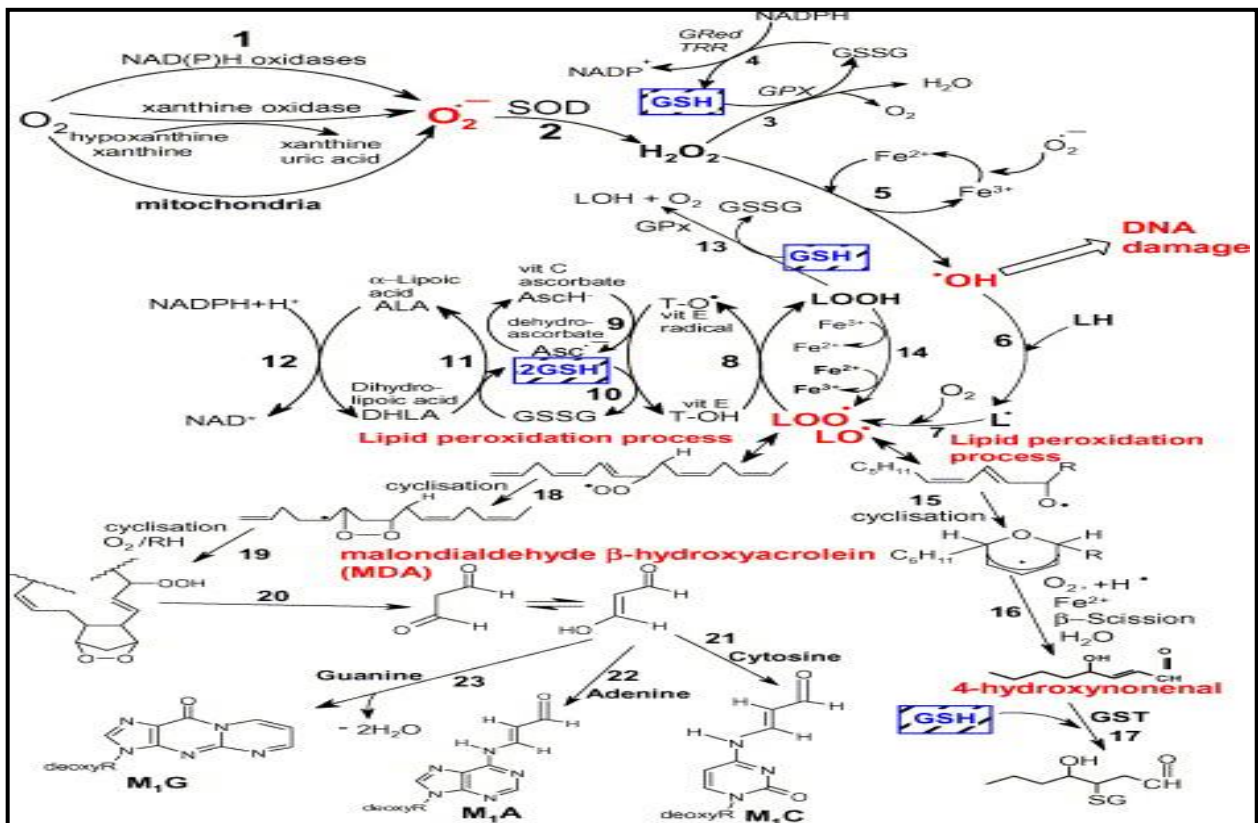


Figure 24 : Voies de formation des ROS, processus de peroxydation des lipides et le rôle de Glutathion (GSH) et autres antioxydants dans le management du stress (Valko *et al.* 2007).

IV.5.Défenses antioxydants

Un antioxydant est toute substance qui, lorsqu'elle est présente à des concentrations faibles par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde considérablement ou inhibe l'oxydation de ce substrat, qu'elle soit de nature enzymatique et non enzymatique (Halliwell et Gutteridge, 1990).

5.1. Antioxydants enzymatiques

Les organismes vivants disposent de systèmes enzymatiques de défense qui les protègent des dommages liés ROS. Ces défenses permettent de maintenir leur concentration à un taux basal.

En effet, elles possèdent une grande affinité pour les ROS, avec lesquelles elles réagissent très rapidement pour les neutraliser. Comme elles fonctionnent en complémentarité.

5.1.1. Superoxydes dismutases

Le superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier pourra être pris en charge par des enzymes à activité peroxydase. Il existe trois isoformes de SOD chez les mammifères.

Une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc, une forme mitochondriale associée au manganèse et une forme extracellulaire. Pour cette raison, cette enzyme représente une partie importante du système de défense contre les radicaux libres (Valko *et al.* 2007).

5.1.2. Catalase

La catalase est présente dans de nombreux tissus et particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. C'est un tétramère dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH. La fixation du NADPH sur la catalase augmente son efficacité et la protège contre l'inactivation (Kalpakcioglu et Senel, 2008).

Chez les mammifères, la catalase est particulièrement présente dans les peroxysomes. Elle catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en H₂O et O₂ empêchant ainsi la formation de radical hydroxyle.

La catalase permet également de détoxifier différents substrats, tels que les phénols et les alcools par un couplage avec la réduction d'hydrogène : **RH₂ + H₂O₂ → R + 2H₂O**

5.1.3. Glutathions peroxydases

La glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. Elle est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. Elle assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type LOOH en LOH.

5.1.4. Thiorédoxines

Les thiorédoxines font l'objet de nombreux travaux concernant leurs capacités antioxydantes (Valko *et al.* 2007). Chez les Mammifères, elles sont localisées dans les mitochondries, le cytosol, et les peroxysomes, elles sont associées aux noyaux et aux membranes. Grâce à leur activité peroxydase, elles neutralisent le peroxyde d'hydrogène, le peroxyde d'azote et de nombreux hydroperoxydes. Malgré une activité plus faible que les GPx ou la catalase, elles pourraient jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes, du fait de leur

quantité importante (0,1 à 0,8 % de protéines soluble cellulaire) et de leur large distribution dans la cellule (Favier, 2003).

IV.5.2. Antioxydants non enzymatiques

Cette classe regroupe des composés endogènes de faible poids moléculaire qui peuvent être soit des produit de synthèse (glutathion) ou issus du métabolisme cellulaire (acide urique) (Kohen et Nyska, 2002). Des protéines tel que la ferritine, la ceruloplasmine et l'albumine contribuent à leur tour dans la défense antioxydante secondaire en chélatant les métaux de transition permettant ainsi de prévenir la formation du radical hydroxyle via la réaction de fenton (Martinez-Cayuela, 1995).

IV.5.3. Antioxydants d'origine végétale

Plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées de propriétés antioxydantes remarquables (tableau 9). Les fruits et les légumes contiennent une grande variété d'antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes, les oligoéléments et surtout les polyphénols (Defraigne et Pincemail, 2008).

5.3.1. Vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂- (Singh *et al.* 2005).

5.3.2. Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée (Singh *et al.* 2005)

Les conséquences du stress oxydants sont:

-L'oxydation des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des modifications des bases azotées, des fragmentations de l'ADN, des ruptures de brins ou a des pontages entre des bases altérant ainsi l'expression génétique (Cooke *et al.* 2003).

- La peroxydation des lipides surtout des acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont facilement oxydables, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane cellulaire, altérant de ce fait ses fonctions d'échanges, de barrières et d'informations (Kœchlin-Ramonatxo., 2006).

-L'oxydation des protéines, Il s'ensuit une fragmentation de la protéine, une oxydation des chaînes latérales des acides aminées ou une formation de liaisons croisées entre deux protéines. Les fonctions de multiples enzymes, de récepteurs et de protéines de transport cellulaire peuvent ainsi être modifiées. L'oxydation des glucides, générant ainsi des intermédiaires réactifs. Les dommages se propagent via l'attaque des radicaux libres formes sur d'autres molécules. C'est toute la machinerie cellulaire qui peut être affectée (Davies., 2003).

Tableau 9 : Exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-oxydantes (Moon et Shibamoto, 2009).

Nom scientifique	Nom commun	Composés actifs
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Réglisse	glycyrrhizine
<i>Zingiber officinalis</i>	Gingembre	6 - gingerdiols
<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomates	rutine, acide ascorbique, acide chlorogénique, lycopène
<i>Glycine max</i>	Soja	eugénol, maltol, alcool benzylique
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	thymol, carvacrol, terpinène
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin	acide carnosique
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Poivre noir	arbutine , magnoflorine
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus	1,8-cinéole, benzaldéhyde
<i>Syzygium aromaticum</i>	Giroflier	eugénol, eugényl acétate
<i>Vitis vinifera</i>	Raisin	Composés phénoliques

Matériels

Et

Méthodes

Le présent travail a été réalisé au laboratoire des micro-organismes bénéfiques et aliment fonctionnelles Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Site et conditions d'échantillonnage :

Notre plante est disponible en Algérie et dans les régions de la wilaya de Mostaganem.

V-Matériels et Méthodes

V-1) Matériels

V-1-1) Matériels végétale

- Fruit de la *Maclura Pomifera*

V-1-2) Matériels Animal

Des rats WISTA

Matériels et Méthodes

1) préparation des extraits végétaux

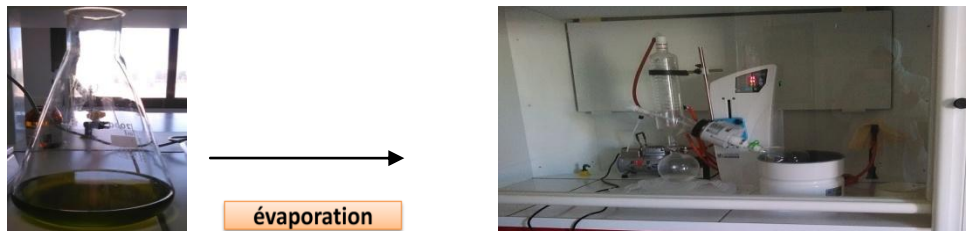
Au laboratoire, les échantillons ont été récoltés et stockés à (-20 C°) pendant (30 jours) avant d'être traité, 2 fruits (700g au total , fruit entiers non pelés) ont été découpés en cube de 1.5 à 2 cm et trempés pendant une nuit dans (700 ml) l'acétate d'éthyle pour la première extraction et dans le méthanol pour la deuxième extraction des conditions d'obscurité pour éviter l'oxydation , ou l'effet de la lumière sur notre échantillons ; la macération étant le moyen de extraction le plus simple , sa durée dépend de la propriétés structurel de notre échantillon notre fruit ainsi que de la température ambiante, Après la macération d'une durée de 14 heure , le mélange (*acétate d'éthyle* et le fruit *Maclura pomifera* mixé bien pour cassé les cellules pour dégagé et libéré leur contenu et leur substrats bioactives .à la suite le mélange mixé est filtré par l'utilisation de papier de wattman N°1 et rincé deux fois par l'acétate d'éthyle, chacun avec 150ml d'acétate d'éthyle, et filtré , le filtrat combiné a été

concentré avec un évaporateur rotatif . et la même chose et mêmes étapes pour le méthanol.

Au total 9.2g d'extrait brut.



Figure 25: Étapes de préparation d'extrait de la *Maclura Pomifera* par l'acétate d'éthyle et les mêmes s par l'utilisation du Méthanol



V-1-2) Produits chimiques

- Acétate d'éthyle ;
- Méthanol;

V-1-3) Réactifs chimiques

- Acide gallique $C_7H_6O_5H_2O$ (Merck) ;
- Folin-Ciocalteu $H_3PW_{12}O_{40}+H_3PMO_{12}O_{40}$ (Biochem);
- Carbonate de sodium $NaHCO_3$ (Biochem) ;
- Quercetine $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$ (Acros organics);

- 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl C₁₈H₁₂N₅O₆ (DPPH) (Aldrich);
- Acidechlorhydrique;
- Trichlorure d'aluminium AlCl₃(Sigma).
- Acide sulfurique ;

V) Tests phytochimiques :

V.1) Les composés polyphénoliques :

V -1.a) Les flavonoïdes :

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à tester, ajouter 1ml d'acide chlorhydrique (HCl) et 3 copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge ou jaune révèle la présence des flavonoïdes.

V -1.b) Les tanins :

1 ml d'extrait à analyser, ajouter 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ à 1 %. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre

V -1.c) Les saponines :

Test de mousse Dans un tube à essai, introduire 10ml d'extrait à tester et agité pendant quelque secondes puis laissé au repos pendant 15min. Une hauteur de mousse persistante indique la présence des saponines.

V-2-2) Étude quantitative

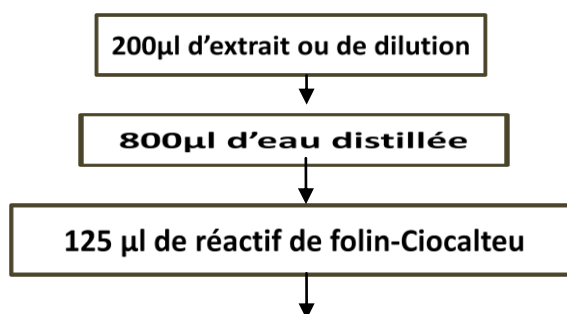
V-2-3) Analyse phytochimiques

V-2-3-1) Quantification des composés phénoliques totaux

La teneur e composés phénoliques des deux extraits (méthanolique et d'Acétate d'éthyle) obtenus à partir des fruits d'Osage a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue.

Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Les solutions des différents échantillons à doser et la gamme étalon sont préparées de la même manière et dans les mêmes conditions.

A 200µl de chaque extrait ou dilution, son ajoutés 800µl d'eau distillée puis 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu, six minutes plus tard, 1.25 ml de la solution aqueuse de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7 %, sont additionnés au milieu réactionnel puis le mélange est ajusté à 4 ml avec l'eau distillée. Après 60 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 760 nm au spectrophotomètre contre un blanc (figure 26) sans extrait. La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de la forme $y = ax + b$ réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence. Les résultats seront donc exprimés en équivalents d'acide gallique.



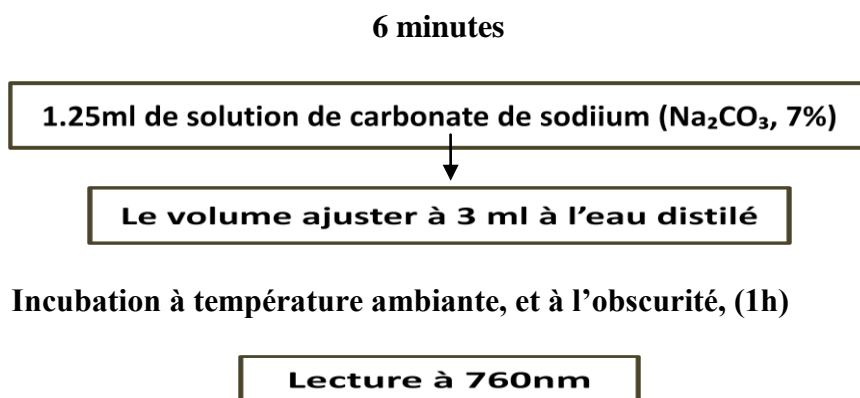


Figure 26: les étapes de dosage des polyphénols selon [SINGLETON et ROSSI \(1965\)](#).

V-2-3-2) dosage des flavonoïdes totaux par spectrophotométrie

L'évolution quantitative des flavonoïdes totaux dans les différentes fractions est réalisée selon la méthode de trichlorure d'aluminium ([BAHORUN *et al*, 1996](#)). A 1ml de chaque échantillon est ajouté 1ml de solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2% dans le méthanol. Dix minutes après le début de la réaction, l'absorbance est lue à 430 nm (figure 27). Une gamme étalon est établie séparément avec la quercétine (1-25 $\mu\text{g/ml}$) pour calculer la concentration des flavonoïdes dans chacun des deux extraits. Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par d'extrait.

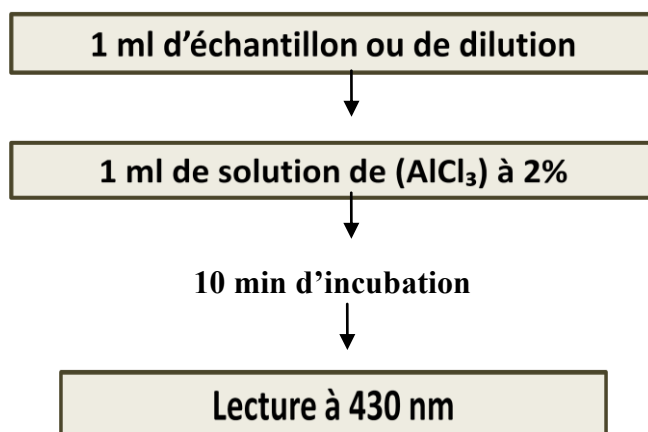


Figure 27 : les étapes de dosage des flavonoïdes totaux par la méthode publiée par [\(BAHORUN *et al*, 1996\)](#).

V-2-3-2) Les Tanins

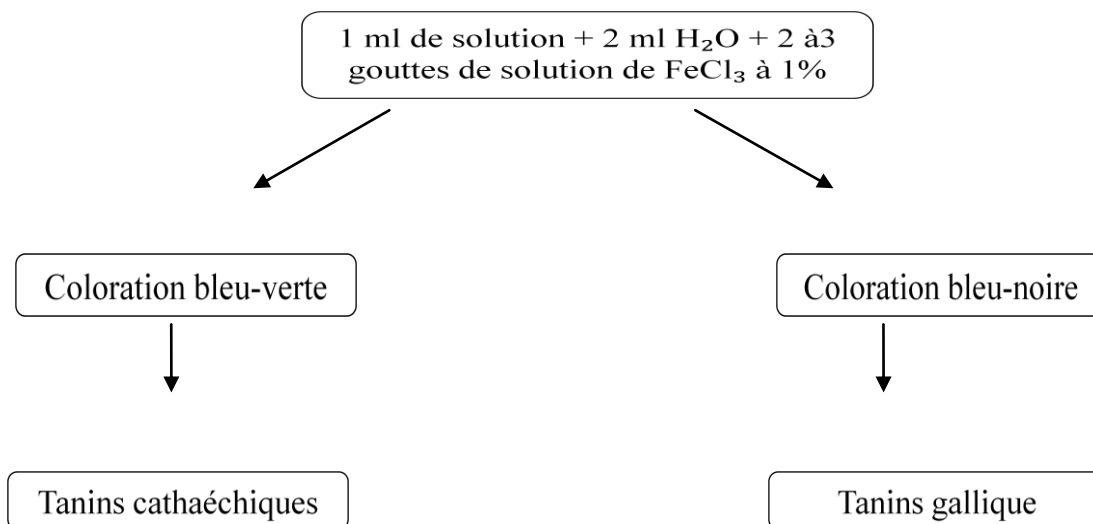


Figure 28 : Mise en évidence de la présence de tanins dans un extrait phénolique selon TREASE et EVANS, (1987).

V-2-4) Évaluation de l'activité antioxydante

La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son potentiel d'activité antioxydante (MEIR et al, 1995 ; APAK et al, 20). La réduction du Fe^{+3} est souvent employée pour étudier la capacité d'une substance à donner des électrons. Cette propriété constitue un important mécanisme de l'action antioxydante (EBRAHIMZADEH et al, 2008).

V-2-4-1) Détermination de l'activité de balayage des radicaux libre par DPPH

Pratiquement, une solution de DPPH sera préparée par solubilisation de 2.4mg de DPPH dans 100ml de méthanol. Un volume de 25 μ l des solutions de notre extrait d'Osage, et de référence, le BHT (hydroxytoluene butyle) seront ajoutés à 975 μ l de DPPH (Sanchez-Moreno, 2002).Le mélange sera laissé à l'obscurité pendant 30 minutes et décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution de DPPH sera mesuré à 517 nm contre un blanc de méthanol. Le contrôle contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui sera remplacé par un volume égal de méthanol (Brand-William et al, 1995).

Les résultats ont été exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où inhibition des radicaux libres, en pourcentage, en utilisant la formule suivant :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(AB-AA)}{AB} \times 100$$

I: Taux d'inhibition ;

AB: Absorbance du blanc ;

AA: Absorbance de l'échantillon.

V-2-4-2) Test du pouvoir réducteur sur ferrocyanure de potassium FRAP :

(Ferric reducing-antioxidant power)

Le pouvoir réducteur du fer (fe³⁺) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaiz (1986). La méthode de la réduction du fer est basé sur la réduction de fer ferrique en sel de fer par les antioxydants qui donnent la couleur bleu (Ou et al. 2001).

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0.5-3 mg/ml) est mélangé avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate 0.2 M (ph 6.6) et 2.5ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe (CN)₆ à 1 %. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min

ensuite, 2.5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 mn. Un aliquote (2.5ml) de surnageant est combinée avec 2.5ml d'eau distillée et 0.5ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ (Chlorure ferrique) à 0.1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm (yidirim et al. 2001).

Contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS).le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testé (Singleton et Rossi, 1965).

Le pourcentage de pouvoir réducteur de fer est calculé par la réaction suivant :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

A₀ : est l'absorbance de FeCl₃.

A₁ : est l'absorbance de FeCl₃ solution en présence de l'extrait (Ghaisas et al, .2008).

V-2-5) Test, *in vitro*

V-2-5-1) Test, *in vitro* de la résistance des globules rouges humains prétraités par l'extrait du fruit d'Osage

La résistance des érythrocytes prétraités par notre extrait du fruit d'Osage est évaluée selon le protocole décrit par Manna et *al.* (2002).Le sang humain utilisé dans ce test est obtenu par prélèvement veineux au pli du code de volontaires seins et non fumeurs. Le sang collecté dans un tube héparine est centrifugé à 3000tours /10 min /4C°, après élimination du plasma, le culot est lavé trois fois par tampon phosphate (Na Cl 125 Mm, phosphate de sodium 10 Mm, Ph=7.4).Pendant chaque lavage, la suspension est homogénéisée par un simple retournement du tube, le surnageant et la couche interface sont éliminés juste après la centrifugation le culot cellulaire obtenu est dilué avec le même tampon phosphate pour obtenir un hématocrite de 2%. L'attaque radicalaire est induite par l'addition du *t*-BHP à la suspension érythrocytaire préalablement incubée (15 min) avec l'extrait du fruit d'Osage. Apres deux heures d'incubation avec le t-BHP (*tert*-butyle hydroperoxyde) à 37C°, le mélange réactionnel est centrifugé à 3000/10 min/4C° et hémolyse (libération d'hémoglobine) est évaluée en mesurant l'absorbance du surnageant à 540nm.

V-2-5-2) Détermination de l'activité antimicrobienne d'extrait du fruit de la *Maclura pomifera*

Rappel sur la notion d'activité antimicrobienne

L'effet bactériostatique

C'est une activité bactérienne au cours de laquelle il ne se manifesté aucune destruction bactérienne, on remarque une inhibition de la croissance bactérienne, croissance qui reprend dès que la substance disparaît.

En limitant la croissance bactérienne. Le médicament permet aux défenses naturelle de l'organisme d'entrer en jeu sans dépassées.

L'effet bactériostatique d'un médicament est évalué par la concentration minimale inhibitrice (CMI

En µg/ml).pour une souche donnée, la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique inhibitrice pour la quelle il n'a plus des germes microbiens visible.

1- **Activité antibactérienne, méthode de diffusion en puits AWDT (méthode de Barefoot et Kaenhammer, 1983)**

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle). L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky et al., 1976).

Méthode des puits permet de détecter les inhibitions dans le milieu de culture semi solide MH des souches inhibitrices : *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *salmonella* ATCC 13311. Cette méthode consiste à couler 21 ml de Mueller-Hinton molle avec 100 µl d'une culture jeune de charge de 10⁷UFC/ml, sur une boîte de pétri. Après solidification à température ambiante dans une zone stérile, des puits sont creusés à l'aide d'un embout jaune stérile. Généralement on réalise 5 puits par boîte de 6 mm de diamètre (chaque test est réalisé en triplicat). Un volume de 50 µl

de l'extrait est mis dans chaque puits (4 puits). Un puit de 50µl de bouillon MH liquide stérile sert comme témoin négatif.

Les boîtes de Pétri sont incubées à +4°C pendant 2 à 4 heures pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (prédifusion) (Doumandji et al., 2010), et ensuite incubées à 37°C. La présence de zones d'inhibition formées autour des puits est examinée après 18 à 24h d'incubation (Hwanhlem et al., 2011).

Témoin Ampicilline

Staphylococcus aureus 40

Escherichia coli 18

Salmonella 20.

- **Détermination de la CMI**

Et la suite et pour déterminées la concentration minimal d'Inhibition de ces micro-organisme on utilisés la CMI sur plaque.

1. évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* :

1.1. Prétraitement par l'extrait

Une heure avant l'injection de la carragénine, un effectif de 42 rats pesant 180g±95g sera divisé selon les deux concentrations [800 et 400mg/ml] en deux groupes chaque groupe reçoit par voie orale les solutions expérimentales (Yesilada et al, 2006).

2. Induction de l'inflammation chez les rats

Des œdèmes au niveau des pattes de rats seront induits après injection par la carragénine.

Dans cette étude, 4 groupes de 5 rats sont formés. Les rats constituant les trois groupes des tests, une heure avant l'injection de 0.1 ml de la carragénine à 1% à la face intérieure du pat droit, les rats du premier groupe sont traités par voie orale avec 2 ml d'extrait d'acétate d'éthyle (AcEt) du fruit à concentration (80 mg/ml), et 2 ml du même extrait à concentration (40 mg/ml) pour le groupe 2, et 2 ml diclofinace pour le groupe 3 comme standard.

Les rats du groupe contrôle sont traités avec 2 ml de NaCl 0.9% par voie orale stérile et ne sont traités par aucune autre substance.

Le diamètre du gonflement du pat arrière droit est mesuré en mm.

Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Mesure de l'œdème

Le diamètre de la patte a été mesuré, à l'aide d'un micromètre digital avant et après induction de l'œdème à des intervalles d'une heure pendant six heures.

L'évolution de l'œdème de la patte a été déterminée chaque heure jusqu'à 6 heures.

Après 6 heures de la surveillance et du control de gonflement de la patte droite. Le diamètre du gonflement du pat arrière droit est mesuré en mm.

L'étude a été conçue pour évaluer l'activité anti-inflammatoire d'extrait d'Acétate d'éthyle de la *Maclura pomifera*, Les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème de la patte de rat induit par le carragénine à 1% à la dose de 25 mg/kg en administration sub-plantaire (interarticulaire).

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'un médicament le diclofénac qui est un anti-inflammatoires et à ceux du contrôle NaCl 0.9% physiologique stérile.

Résultats
et
Discussion

Extraction

L'extraction a été effectuée selon la méthode de [Rong Tsao et al., \(2012\)](#)

La préparation des extraits à partir des fruits de *Maclura Pomifera* a été effectuée par des solvants à polarité croissante il s'agit du méthanol, acétate d'éthyle.

Cette extraction a permis d'obtenir deux extraits bruts: L'extrait méthanolique (Méth), l'extrait d'acétate d'éthyle (AcEt).

Exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante fraîche, le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait d'acétate d'éthyle (13 %), et enfin l'extrait méthanolique possède le plus faible rendement avec (12.8%). Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents.

(Tab11).

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à froid), affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites ([Lee et al., 2003](#)).

Tab 11: Aspect, couleur et rendement de différents extraits.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
Méthanol	Visqueux	Verte	13%
Ethyle acetate	Pâteux	Jaune verdâtre	12.8%

I.2).Les tests phytochimiques

I.2.1) Les polyphénols totaux :

La détermination de la teneur en phénols totaux du notre extraits est estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue.



Figure 29 : la coloration bleue qui exprime la présence des polyphénols totaux.

I.2.2) Les flavonoïdes :

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à tester, ajouter 1ml d'acide chlorhydrique ($AlCl_3$) à (2%). L'apparition d'une coloration orange ou (rouge ou jaune) révèle la présence des flavonoïdes.



Figure 30: la coloration rouge qui exprime la présence des flavonoïdes.

I.2.3) Tanins :

1 ml d'extrait à analyser, ajouter 0,5 ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 1 %. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.



Figure 31 : la coloration bleu-vert qui démontre la présence des Tanins,

Les tests phytochimiques réalisés sur les différents modes de préparations nous ont permis de mettre en évidence la présence de quelque métabolite secondaire présent dans notre plante étudiée par des réactions qualitatives de caractérisation (précipitation, coloration par des réactifs spécifiques,). Les résultats sont résumés dans le tableau 10.

Tableau 12 : Résultats des tests phytochimique sur les deux extraits (AcEt, Méth) de la *Maclura Pomifera* selon différentes modes de préparations.

Composées phénoliques	Résultats	Réactions chimiques
Flavonoïdes	(+) Positif	Coloration rouge
Polyphénols	(+) Positif	Coloration Bleu-noir
Tanins	(+) Positif	Coloration verdâtre
Sucres	(+) Positif	Sans couleur

II).La détermination de la teneur en phénols totaux

La détermination de la teneur en phénols totaux dans les deux extraits de la *Maclura Pomifera* est estimée par la méthode de Folin- Ciocalteu qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Les teneurs ont été rapportées en mg équivalent d'acide gallique par g de matière sèche du matériel végétal.

Les résultats montrent que la teneur moyenne en phénols totaux de l'extrait acétate d'éthyle est de (87.02±0.39 mg/g MS) alors que celle de l'extrait méthanolique est de (13.4±0.5 mg/g) (Tableau). Les résultats de la courbe d'étalonnage d'acide gallique sont représentés dans la Figure 32.

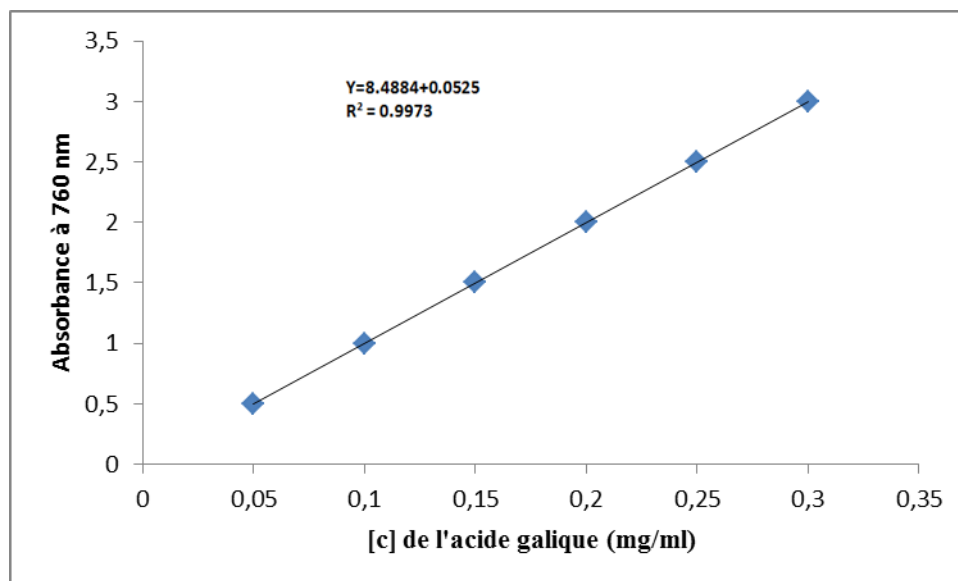


Figure 32 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les valeurs des phénols totaux dans les deux extraits sont plus élevées que les teneurs trouvées par (Ergin et al, 2012).

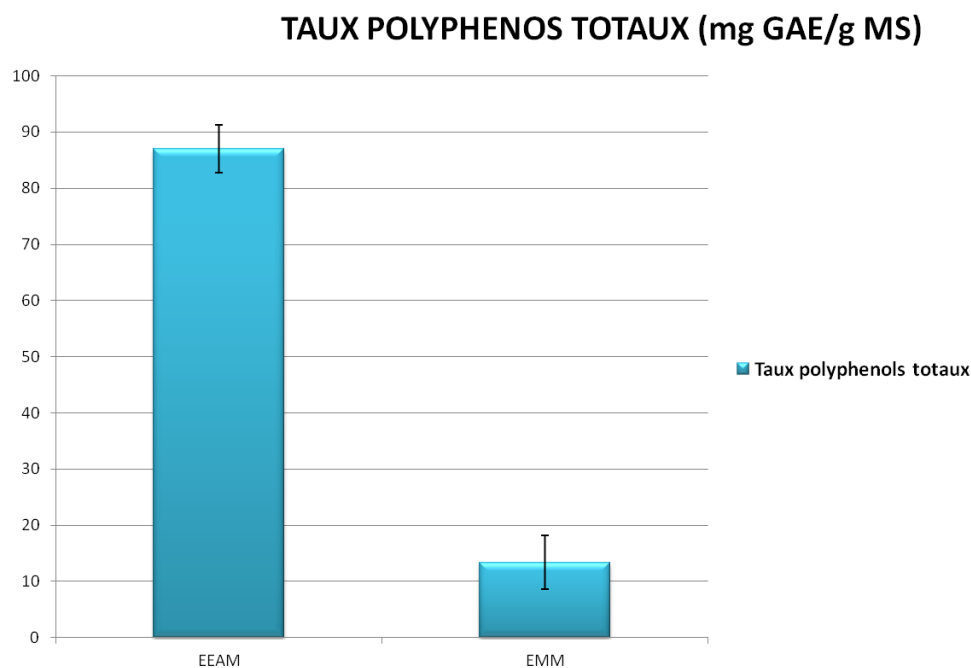


Figure 33 :Taux des polyphenols totaux (mg EQ AG/g MS).

Les résultats obtenus indiquent que l'acétate d'éthyle était plus efficace dans l'extraction des polyphénols.

I.2.2) Teneurs en flavonoïdes totaux :

La teneur en flavonoïdes déterminée par la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) pour chaque extrait a été rapportée en mg équivalent de quercétine par g de matière sèche. Les résultats de la courbe d'étalonnage de la quercétine sont représentés dans la Figure.

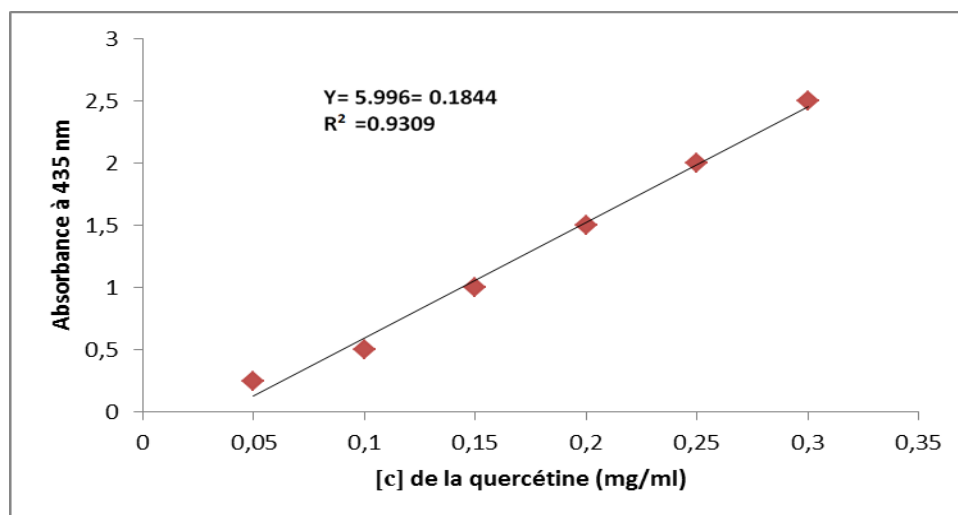


Figure 34 : la courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les résultats de dosage des flavonoïdes révèlent pour les deux extraits méthanolique et acétate d'éthyle respectivement les valeurs suivants (3.6 ± 0.39 mg/g par MS et 22.16 ± 0.4 mg/g par MS). A partir de ces données, on peut déduire que les flavonoïdes représentent la fraction majoritaire par rapport aux phénols totaux dans l'extrait acétate d'éthyle par contre pour l'extrait méthanolique la fraction flavonoïdes est beaucoup moins faible par rapport aux phénols totaux.

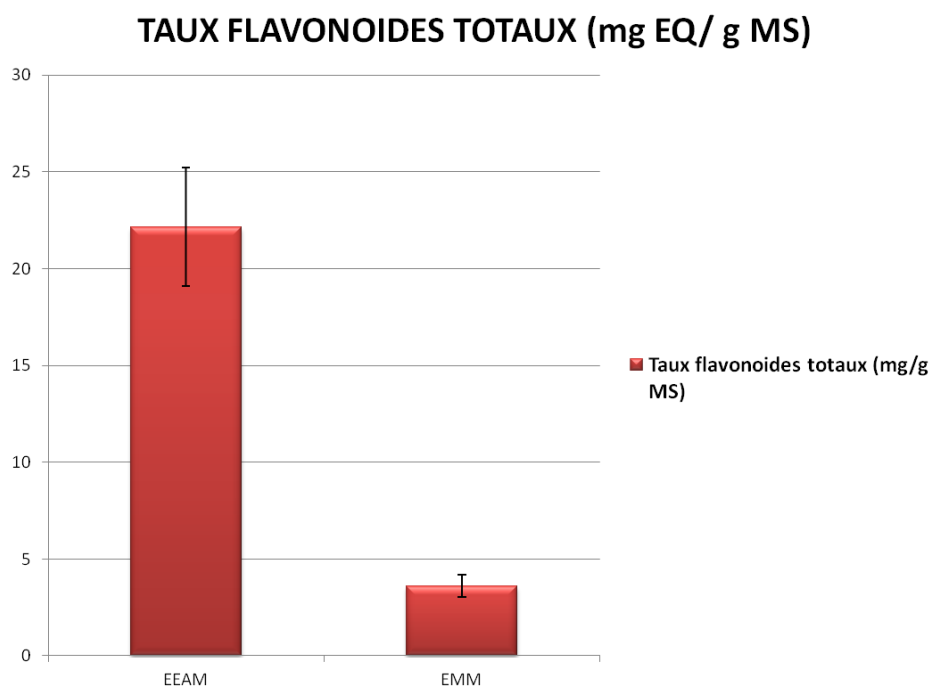


Figure 35 : Taux des flavonoïdes totaux (mg EQ quer/ g MS)

Les résultats obtenus indiquent que l'acétate d'éthyle était plus efficace dans l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes.

II) Tests antioxydants

II.1) Test anti-radicalaire (Test DPPH)

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (Bortolomeazzi et al., 2007).

L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration des différents extraits utilisés et du témoin acide ascorbique (antioxydant de référence) (12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 µg/ml).

L'activité antioxydante de notre extrait (AcEt) est exprimée en CI₅₀, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Abdulmajed et al., 2005; Ahmad et al., 2012; Ranga et al., 2009), il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH. (Couleur).

II.1.a) Pourcentage d'inhibition :

Pourcentage d'inhibition du DPPH (I%) est calculé de la manière suivante [24] :

$$I\% = \frac{(\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon}) \times 100}{\text{Abs blanc}}$$

$$I\% = \frac{DO_{\text{blanc}} - DO_{\text{extrait}}}{DO_{\text{blanc}}} \times 100$$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

– IC₅₀ : Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante

Tous les essais ont été effectués en trois répétitions.

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont représentés dans la (fig 36). Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la vitamine C ou pour l'extrait éthyle acétate (AcEt). Le pouvoir antioxydant de l'extrait testé montre que le pourcentage d'inhibition est supérieur à 50% à une concentration de l'ordre de 1,25 mg/ml.

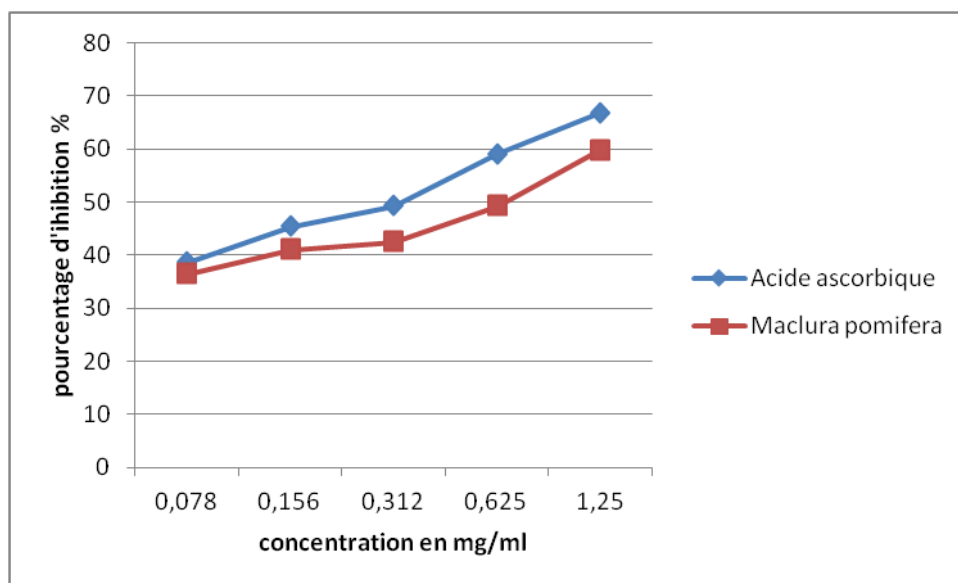


Figure 36 : pourcentage d'inhibition de l'extrait éthyle acétate de *Maclura pomifera* et l'acide ascorbique.

- **Pourcentage d'inhibition :**

La figure ci-dessous montre les résultats de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de concentration des composés testés. Ils montrent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'acide ascorbique ou pour l'extrait de *Maclura pomifera*. On observe que le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique est supérieur à celui de notre extrait pour toutes les concentrations.

Ces résultats montrent que l'extrait d'éthyle acétate possède une activité antioxydante mais elle est moins efficace que celle de l'acide ascorbique. Cette activité est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de notre extrait. En présence d'un radical libre DPPH·, l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH-H, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène (villano et al 2007).

Cette Activité est peut être due a l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins qui réduisent et décolorent le DPPH et qui possèdent une forte activité antioxydante. Ce n'est pas uniquement ces composés qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou

antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Sidi Boulenouar et ziane 2003). Cela est en accord avec les travaux menés sur l'extrait de la *Maclura Pomifera*, espèce riche en composés phénoliques qui sont responsables de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydante et antimicrobienne (Ćetković, 2007). Dagmar et al., 2004.

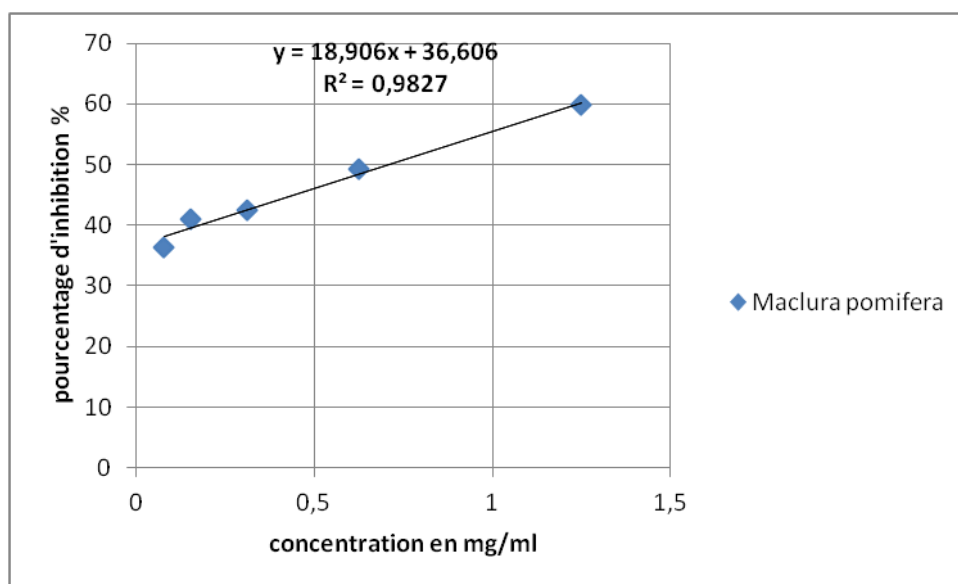


Figure 37 : IC₅₀ de l'extrait éthyle acétate de *Maclura pomifera*.

Détermination d'IC₅₀ : L'IC₅₀ est inversement proportionnel à la capacité antioxydante d'un composé, parce qu'il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. Les valeurs d'IC₅₀ de notre extrait.

Les valeurs d'IC₅₀ pour l'acide ascorbique et de l'extrait d'éthyle acétate de *Maclura pomifera* sont indiquées dans la Figure. L'extrait d'éthyle acétate de *Maclura pomifera* rend le radical libre stable (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) au diphenyl-picrylhydrazine jaune-coloré avec un IC₅₀ de 0.63 mg/ml montrant une activité importante cela est . D'après ces résultats on prouve que l'acide ascorbique reste l'antioxydant le plus efficace avec un IC₅₀ de 0.32 mg/ml par rapport notre extrait étudiée. les résultats obtenus dans le test DPPH sont inférieure a ce qui a été observé dans d'autre travaux(hamed et hussein 2005)

II.2) Test de la réduction du fer FRAP :

L'activité antioxydante de l'extrait éthyle acétate a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (Benzie et Strain 1996). Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (Li et al ; 2008). La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe³⁺/ complexe ferricyanide à la forme ferreux.

Par conséquent, Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm (chung et al ; 2002). En d'autre terme, le système FeCl₃/K₃Fe(CN)₆ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semiquantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction rédox (Amarowicz et al; 2004).

Le pouvoir réducteur de l'extraits testé est dose dépendante (concentration dépendante). A la concentration de 2,5mg/ml, le pouvoir réducteur de l'extrait éthyle acetate est nettement inférieur à celui de l'acide ascorbique (fig 38), cela correspond aux travaux menés par (RONG TSAO et al 2003) sur l'extrait éthyle acétate de *Maclura pomifera*. Le pouvoir réducteur de l'espèce *Maclura pomifera* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhuraju et Becker, 2007). Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Jeong et al; 2004. Kumaran et Karunakaran, 2007).

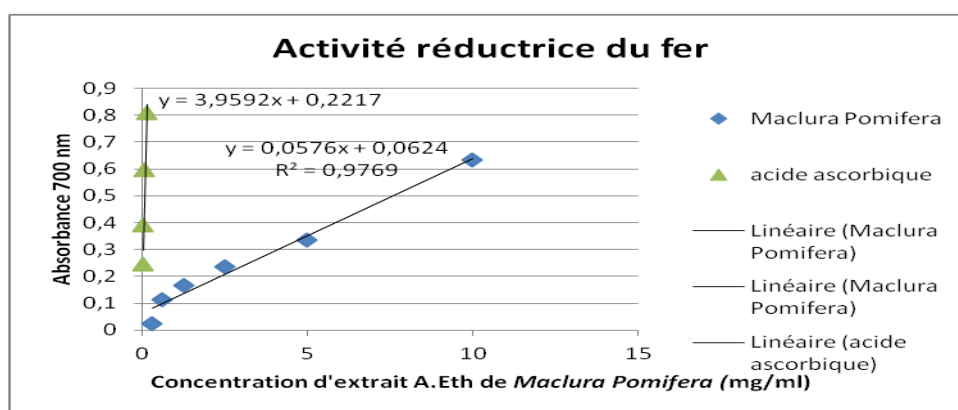


Figure 38 : Pouvoir réducteur de l'extrait éthyle acétate de *Maclura pomifera* et de l'acide ascorbique.

D'après le profil de la figure présentée ci-dessus, il est évident que le standards exerce une activité antioxydante mais avec une différence très hautement significative ($p \leq 0,0001$).

L'activité antioxydante du standard à des faibles concentrations est toujours plus supérieure par rapport à l'extrait testé qui se présentent à des concentrations plus importantes.

III)- Test, *in vitro* de la résistance des globules rouges humains prétraités par l'extrait du fruit d'Osage :

Le taux d'inhibition de différentes concentrations est calculé en pourcentage (%) après 2 heures d'incubation, selon la formule suivant

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{A (\text{extrait à 120min}) - A (\text{témoin négatif à 120 min})}{A (\text{témoin négatif à 120 min})}$$

Les tests d'hémolyse sont répétés 3 fois dans le but de réaliser une analyse statistique (Moyenne, écart type).

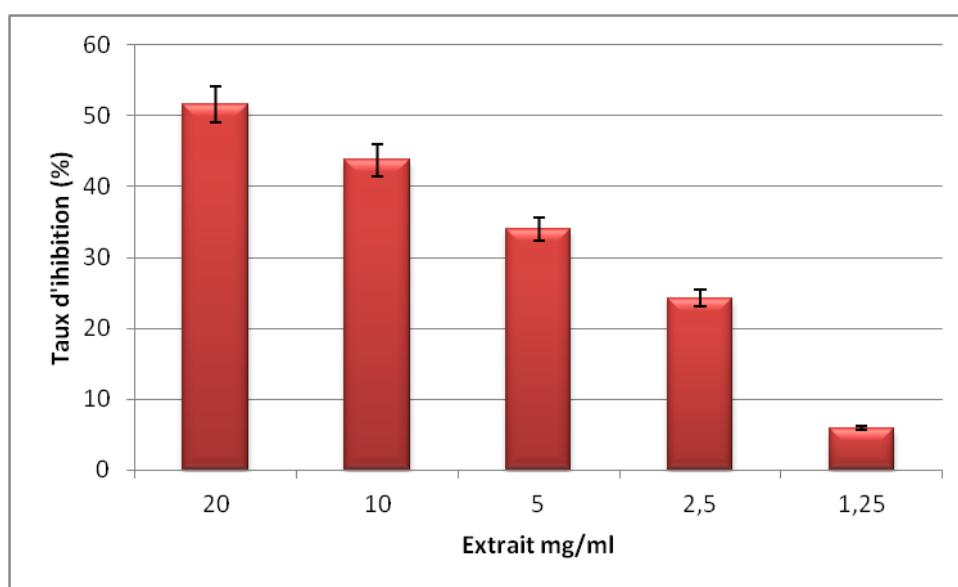


Figure 39 : taux d'inhibition d'hémolyse (%) des différentes concentrations d'extrait brut d'éthyle acétate de *Maclura pomifera* après 120 min d'incubation.

La figure, présente les taux d'inhibition d'hémolyse, par pourcentage (%) après 120 minutes dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations de l'extrait brut d'éthyle acétate de *Maclura pomifera*.

Nous constatons que la fuite d'hémoglobine intracellulaire dépend de la concentration finale de l'extrait testé.

Concernant l'étude biologique, nous avons souligné un taux d'inhibition d'hémolyse faible d'ordre de 5,92% après 2 heure d'incubation des érythrocytes isolées en présence d'une concentration de 1,42mg/ml d'extrait brut d'éthyle acétate de *Maclura pomifera*.

Par contre, nous avons constaté un taux d'inhibition d'hémolyse élevée d'ordre de 51.6 % en présence de 20 mg/ml d'extrait testé.

On peut considérer ce taux (51.6%) est faible par rapport a une concentration de 20 mg/ml, d'autre plante citons *Marrubium vulgare*, *Haloxylon scoparium pomel*, présentent des taux d'hémolyse 6%, 7% respectivement à une concentration de 20mg/ml (Moussaoui et Harkati ,2013).

La cytotoxicité d'extrait brut d'éthyle acétate de *Maclura pomifera* à une concentration très élevé sur les globules rouge est probablement due à la richesse de cette plantes des flavonoïdes et des tanins et en saponosides, ces derniers sont connus depuis très longtemps pour leur propriété tensioactive (solution moussante dans l'eau) ou encore leur capacité à lyser les globules rouges, sont des métabolites secondaires de nature amphiphile. Cette propriété lytique a conduit à la mise en place de tests hémolytiques permettant la détection de saponines dans les drogues ou les extraits de plantes (Sparg *et al.*, 2004). De même, elle est actuellement utilisée dans les laboratoires d'analyses hématologiques afin de détruire les globules rouges du sang et effectuer les numérations leucocytaires (Chwalek, 2004). Effectivement, l'étude phytochimique a mis en évidence la présence de saponosides dans l'extrait brut d'éthyle acétate de *Maclura Pomifera*, Le mécanisme hémolytique des saponosides est dû à la formation d'un complexe avec le cholestérol membranaire formant des structures assimilables à des pores ou des puits, altérant ainsi la perméabilité membranaire et conduisant à la destruction du globule rouge (Sparg *et al.*, 2004).

En somme, ces constatations de l'effet hémolytique n'excluent pas la présence d'autres composés doués d'activité antioxydante dans un système cellulaire permettant de protéger les érythrocytes contre l'hémolyse oxydative. Cependant, pour mettre en évidence l'activité de ces composés, il serait nécessaire d'éviter le contact direct de l'extrait avec les globules rouges. L'étude *in vivo* avec une administration *per os* de l'extrait offrira probablement cette possibilité.

L'activité antibactérienne

Pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction.

Ces activités sont aussi en dépendance de la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives.

Les résultats obtenus ont révélés une activité antibactérienne variées contre les bactéries testés.

IV.1.1. Activité antibactérienne

Les souches étudiées sont

Shigella ; E.coli ; Pseudo ; Listeria ; Selmonella ; B.Cereus ; E.hirae ;M.luteus ; S.aureus ; Proteus mirabilis.

Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibition (mm) et CMI obtenus avec les différentes souches. (Exprimé en diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne).

les souches	Diamètre de la zone d'inhibition de la croissance en (mm)	CMI [mg/ml]
1) <i>Shigella ;</i>	22.2 ±0.1	100
2) <i>E.coli ;</i>	14.1±0.1	200
3) <i>Pseudo ;</i>	19.2±0.2	200
4) <i>Listeria ;</i>	13.2±0.2	200
5) <i>Selmonella ;</i>	9.1±0.1	200
6) <i>B.Cereus ;</i>	25.1±0.2	400
7) <i>E.hirae ;</i>	17.1±0.1	200
8) <i>M.luteus ;</i>	14.2±0.1	200
9) <i>S.aureus ;</i>	20.1±0.1	400
10) <i>Proteus mirabilis.</i>	9.1±0.2	800

Les résultats de l'évaluation antimicrobienne de notre extrait sont repris ci-dessus (Tableaux 11). Dans ce tableau sont inclus d'une part les valeurs en (mm) zones ou diamètres d'inhibitions, représentant la zone du halo formé par les microorganismes détruites par

l'activité antimicrobienne (tableaux 11) et d'autre part les valeurs de différentes concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Les figures 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, donnent une illustration de la capacité antimicrobienne de notre extrait a différentes concentrations vis-à-vis de tous les germes testés.

D'après les résultats illustrés dans Le tableaux 11, l'effet antibactérien varie d'une souche à une autre et dépend aussi de la concentration de l'échantillon testé.

- A la concentration 200mg/ml d'extrait d'Orange des Osage a 10µl par puit on observe un effet significatif sur les six souches suivantes : (*Pseudo* ; *E.hirae* ; *M.luteus* ; *E.coli* ; *Listeria* ; *Selmonella*) ; Les zones d'inhibition obtenues avec les souches pathogènes varient de (9; 17 mm).
- En suite a la concentration 400 mg/ml d'extrait d'acétate d'éthyle (AcEt) a 10µl par puit on enregistre aussi un effet positif où on observe clairement des zones d'inhibitions de la croissance des deux souches. (*B.cereus*=25mm et *S.aureus*=20 mm).
- La seule souche qui n'était pas fortement sensible avec une zone d'inhibition de l'ordre de 9 mm pour une concentration de 800 mg/ml, était la souche *Proteuse Mirabilis*. Ou on remarque que c'est la plus faible zone d'inhibition enregistrée.
- ([Azizian-Shermeh et al., 2017](#)) ont étudié l'activité antimicrobienne contre *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. niger*, *C. albican*. Les zones d'inhibitions vis-à-vis de toutes les souches testées étaient en respectivement de l'ordre de (17.0 ± 0.2 , 17.1 ± 0.1 , 14.2 ± 0.1 , 13.2 ± 0.2 , 18.1 ± 0.2 , 17.2 ± 0.1 mm).

Dans une autre recherche menée par [Fatnassi et al. \(2011\)](#) sur L'huile essentielle de l'écorce de l'Oranger des Osages (fruit d'Osage orange), l'activité antimicrobienne a été étudié contre quelques bactéries pathogènes L'huile a montré un potentiel moyen de l'effet anti-bactérien contre *Bacillus subtilis*, *Staphylosccus aureus*, *Enterobacter faecalis* et *Echerchia coli*.

Les tableaux qui représentent le diamètre de la zone d'inhibition avec la CMI en mg/ml

Tableau 14 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de *Shégélla* (fig1)

Nom	<i>Shégélla</i>
-----	-----------------

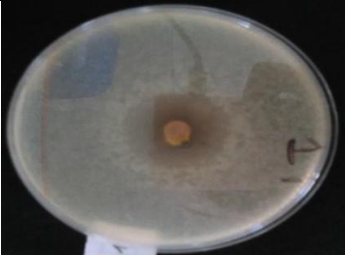
Image de la zone d'inhibition	
Diamètre en mm	23
CMI en mg/ml	100

Tableau 15 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de *E.coli* (fig 2)

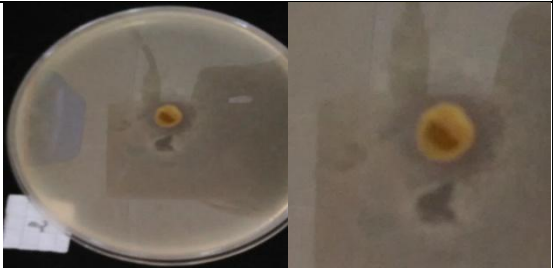
Nom	<i>E.coli</i>
Image de la zone d'inhibition	
Diamètre en mm	14
CMI en mg/ml	200

Tableau 16: le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de *Pseudo*

Nom	<i>Pseudo</i>
-----	---------------

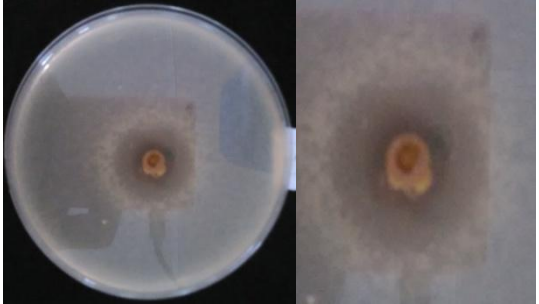
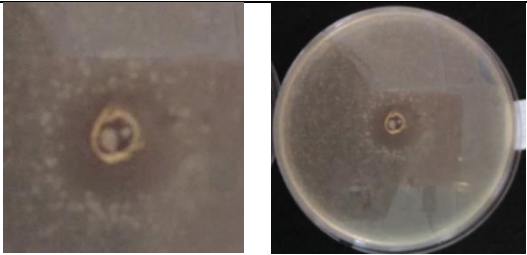
Image de la zone d'inhibition	
Diamètre	20
CMI en mg/ml	200

Tableau 17 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de *Listeria*.

Nom	<i>Listeria</i>
Image de la zone d'inhibition	
Diamètre	13
CMI en mg/ml	200

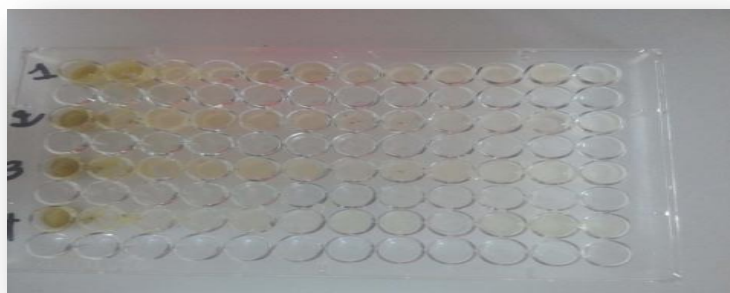


Figure b : représente le teste de la CMI sur plaque

Tableau 18 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de *Salmonella*.

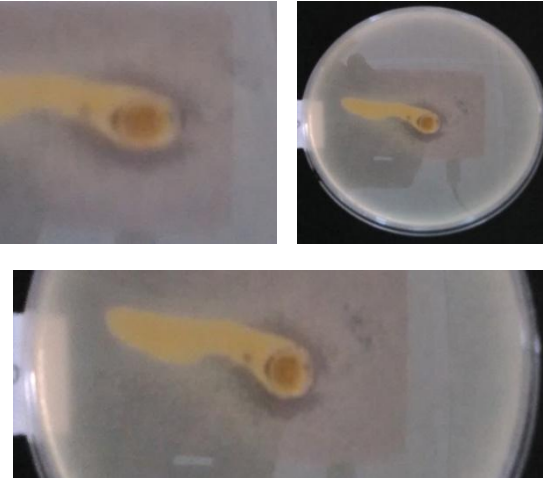
Nom	<i>Salmonella</i>
Image de la zone d'inhibition	
Diamètre	9
CMI en mg/ml	200

Tableau 19 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de *B.cereus*.

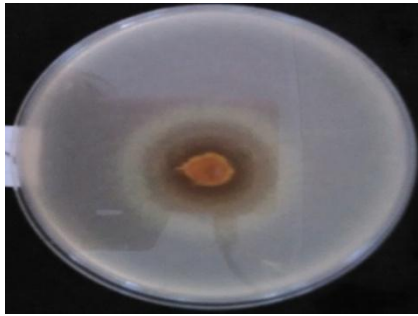
Nom	<i>B.cereus</i>
Image de la zone d'inhibition	
Diamètre	25
CMI en mg/ml	400

Tableau 20 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de *E. herae*.

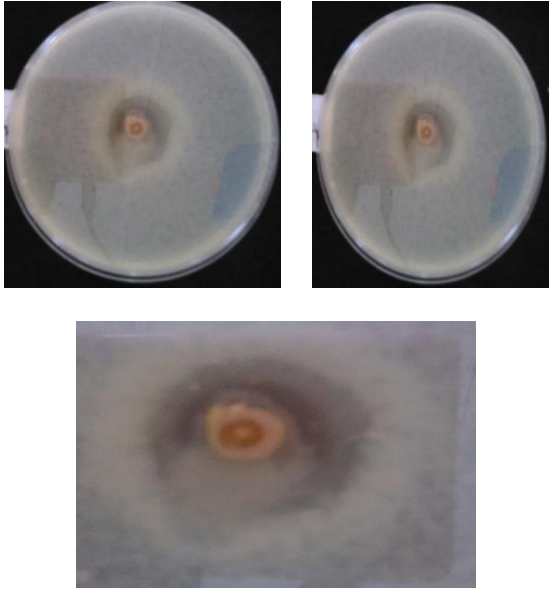
Nom	<i>E. herae</i>
Image de la zone d'inhibition	
Diamètre	17
CMI en mg/ml	200

Tableau 21 : le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de *M.luteus*.

Nom	<i>M.luteus</i>
-----	-----------------

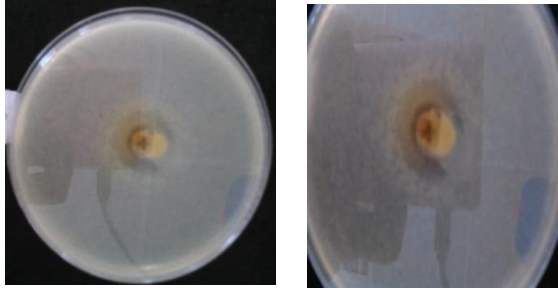
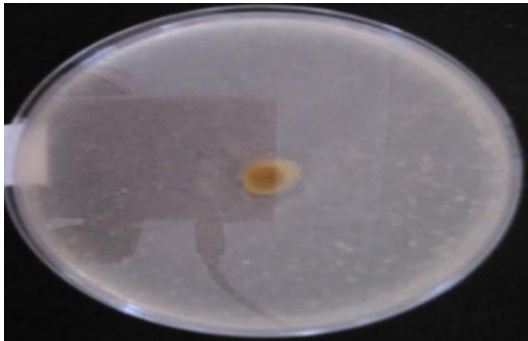
Image de la zone d'inhibition	
Diamètre	14
CMI en mg/ml	200

Tableau 22: le diamètre de la zone d'inhibition et le CMI de *S.aureus*.

Nom	<i>S.aureus</i>
Image de la zone d'inhibition	
Diamètre	20
CMI en mg/ml	400

Test de toxicité:

. Principe :

Le test de toxicité aigüe de l'extrait a été réalisé selon la méthode décrite par l'Organisation de la coopération Economique et Développement (OECD) (Ejebe *et al.*, 2010). Ce test consiste à administrer les doses expérimentales aux animaux et observés pour toute manifestation de toxicité, augmentation dans l'activité, salivation, convulsion coma et mort. Ces observation sont faites régulièrement jusqu'à 24 heures (Paschapur *et al.*, 2009).

Résultats test de toxicité

L'administration orale de l'extrait phénolique de *Maclura pomifera* aux doses de 150 et 300 mg/Kg aux rats n'a induit aucun signe de toxicité aigue au cours des 24 heures d'observation (de comportement des animaux, mort, coma...).

L'activité anti-inflammatoire

.1. Le pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG):

.1.1. Groupes témoins

L'administration de la carragénine entraîne une augmentation significative du pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des rats témoins à partir de la première heure de l'expérimentation.

De plus, une augmentation significative du volume de la patte des rats est observée à la première heure comparée à toutes les heures de l'expérimentation $p < 0,05$ (65.21%; 34.78%; 30.43%; 13.04% et 0 %) à la deuxième, troisième, quatrième, cinquième et sixième heure, respectivement.

A partir de la troisième heure, le pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des rats témoins commence à se réduire progressivement.

Après six heures d'expérimentation le pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des rats témoins est significativement diminué comparé à celui de la première, deuxième et 3ème heure ($p < 0.001$). (Figure 40)

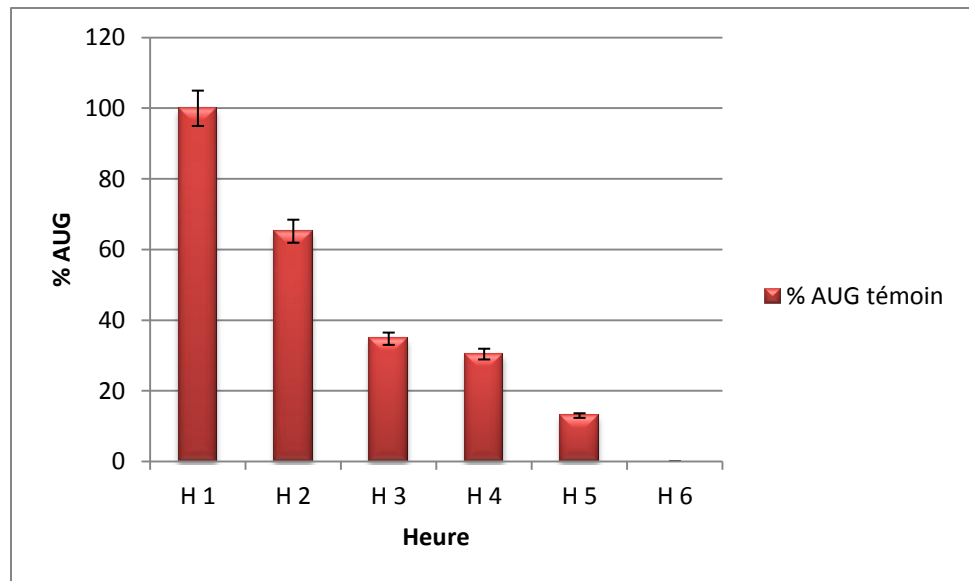


Figure 40 : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des rats témoins pendant 6 h.

1.2. Groupes standards

Pour le groupe standard, les résultats obtenus montrent que l'administration de l'anti-inflammatoire du Diclofénac à (100 mg/kg) provoque une diminution du volume de la patte des rats pendant les six heures de l'expérimentation. En effet, cette réduction significative est observée à partir de la deuxième heure et continue jusqu'à la fin de l'expérimentation. A la (quatrième heure), le pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des rats standards est nettement moins important que celui de la 1ère heure. (Figure 41)

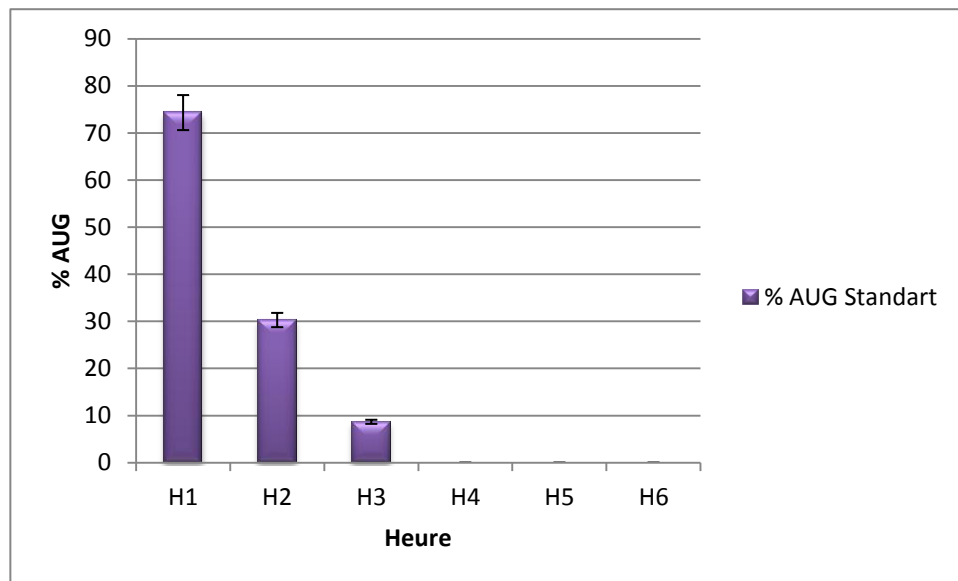


Figure 41 : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des rats standard pendant 6 h.

3.1.3.1 Groupe traité par l'extrait *Maclura pomifera* (40mg /ml):

Le traitement par l'extrait phénolique de *Maclura pomifera* (40 mg/ml) induit une diminution significative de volume de la patte des rats à partir de la deuxième, et jusqu'à la cinquième heure de l'expérimentation ($p < 0,01$). De plus, à la quatrième heure le pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des rats traitées par l'extrait phénolique de *Maclura pomifera* (40 mg/ml) montrent des valeurs significativement réduites comparées aux valeurs de la deuxième et troisième heure, respectivement ($p < 0,01$).

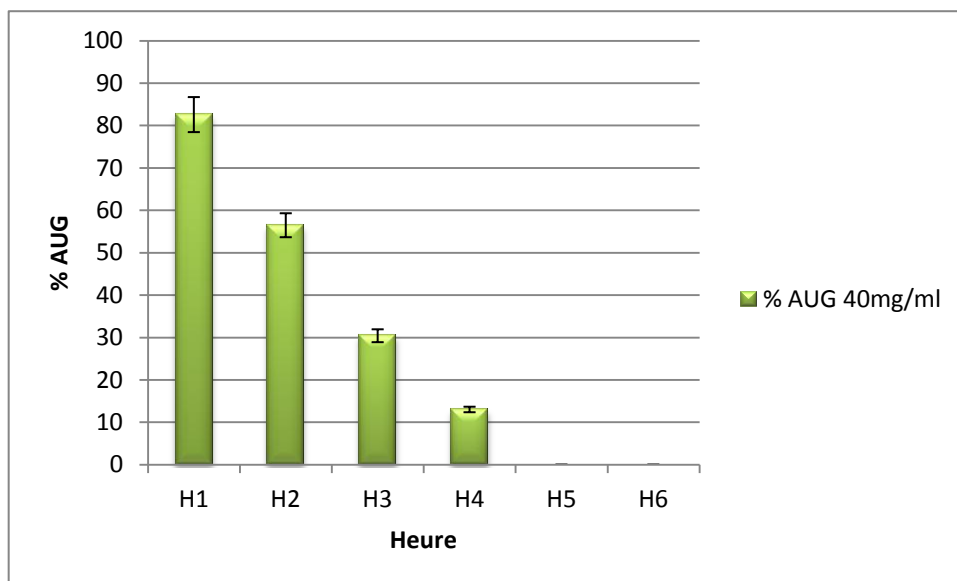


Figure 42 : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des rats G1 (40mg/ ml) pendant 6 h.

3.3. Groupe traité par l'extrait phénolique de *Maclura pomifera* (80mg /ml):

Dés la deuxième heure du traitement par l'extrait phénolique de *Maclura pomifera* à la dose (80 mg/ml) le pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des rats traitées commence à se réduire progressivement, cette réduction atteint une valeur importante que celle notée à la première heure de l'expérimentation. De plus, à la deuxième heure le traitement par l'extrait phénolique de *Maclura pomifera* à la dose 80 mg/ml induit une réduction de moitié du pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des rats traitées comparé à celui de la première heure, 77.39% (H1) et 21.73% (H3).

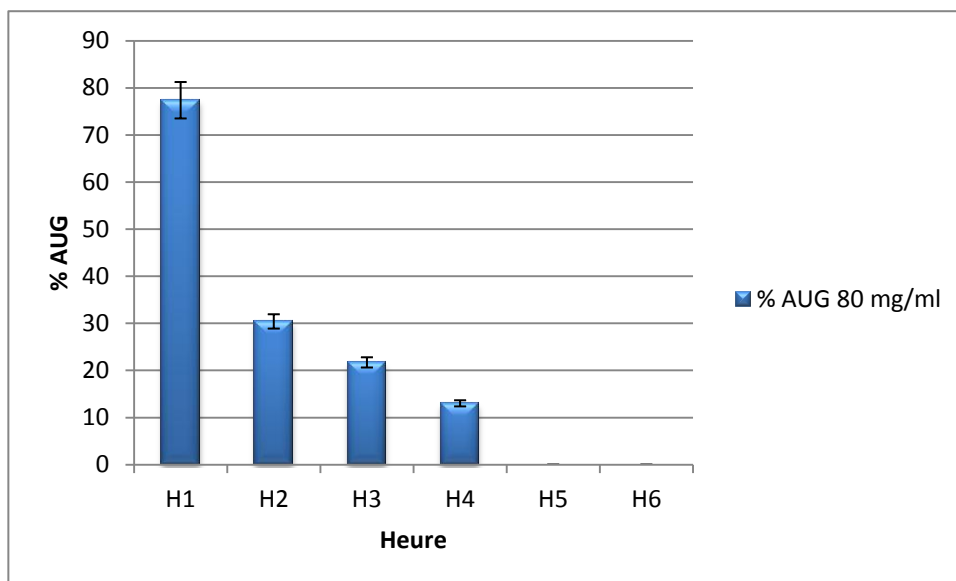


Figure 43 : Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte (%AUG) des rats G2 (80mg/ ml) pendant 6 h.

Nos résultats montrent que l'administration orale de l'extrait aux doses de 80 et 40 mg/ml, respectivement, aux rats n'exercent aucun effet toxique pendant les 24 heures d'observation, ceci indique que les deux doses ne sont pas toxiques.

L'objectif de notre étude était de déterminer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait Ac Et de *Maclura pomifera* aux doses différentes sur l'œdème inflammatoire aigu de la patte droite postérieure des rats induit par la carragénine selon la méthode de (Winter et al., 1962).

Au cours du suivi des rats témoins et des rats traitées pendant les six heures après l'injection de la carragénine nous avons noté une augmentation du volume de la patte des rats de tous les lots. Cependant, l'augmentation du volume de la patte chez le groupe témoin a été plus importante que les groupes traités. Ce qui prouve bien que la carragénine a induit une réaction inflammatoire engendrant un œdème.

En effet, l'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques qui sont responsables du processus inflammatoire.

Cette réponse inflammatoire est biphasique dont la phase initiale, qui dure environ une heure, est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine, la bradykinine est libérée au cours de

la deuxième phase (1,5–3 heures), et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure. Ces médiateurs augmentent la perméabilité des capillaires de la région. En conséquence, l'exsudat s'échappe de la circulation sanguine vers l'espace interstitiel. Cet exsudat est la cause de l'œdème localisé, qui, à son tour, comprime les terminaisons nerveuses et détermine ainsi une sensation de douleur (Rousselet et al., 2005).

Par ailleurs, l'administration du diclofénac à la dose de 100 mg/kg par voie orale prévient de façon significative l'augmentation du volume de la patte des rats. Elle est de (74.34%; 31.30%; 8.69%) à la 1ère, 2^{ème} et 3ème h respectivement après l'administration de la carragénine. Ces résultats sont significativement différents de ceux du contrôle physiologique.

Pour l'évaluation du test anti-inflammatoire nous avons utilisé le test d'inhibition de l'œdème de la patte droite postérieure de rats à la carragénine. Par ce principe l'extrait d'Ac Et de *Maclura pomifera* s'est révélé plus actif (100%) plus précisément à la cinquième heure avec la dose de 80 mg/ml. Ces résultats concordent avec plusieurs recherches qui montrent que l'activité anti-inflammatoire de l'extrait peut s'expliquer en partie par la présence dans le fruit *Maclura pomifera* des composés polyphénoliques comme les tanins et les flavonoïdes (Bruneton, 1993).

De plus, certaines études semblent indiquer que les flavonoïdes contenues dans les extraits de plantes, possèdent des propriétés anti inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (González-Gallego et al, 2007).

Nos résultats montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Maclura pomifera* à la dose de 80 mg/ml réduit de façon significative l'œdème induit par la carragénine à partir de la 1ère h (77.39%±) jusqu'à la 5ème h (0%). L'inhibition de l'œdème par l'extrait à la dose de 80 mg/ml est comparable, à celle du Diclofénac. Probablement la richesse de notre extrait en constituants phénoliques et flavonoïdes capables de empêcherait la formation des prostaglandines qui provoquent l'inflammation.

Parallèlement , nos résultats montrent que Le pourcentage d'augmentation du volume de la patte des rats traitées par l'extrait phénolique de *Maclura pomifera* à la dose de 40 mg/ml est plus importante à la deuxième heure (56.50 %) par rapport à l'extrait aqueux à la dose de 80

mg/ml (30.43%), cependant cet extrait réduit significativement le volume de la patte des rats traitées comparées au rats témoin à la 3ème , 4ème,5ème, et 6ème heure de l'expérimentation.

Conclusion

Conclusion

Dans le présent travail, différents aspects de *Maclura pomifera* ont été étudiés: quelques propriétés phytochimique, activités antioxydantes, antimicrobiennes et anti inflammatoire d'extrait brut.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes: le test FRAP et la méthode de réduction de radical libre DPPH. Les résultats montrent que l'extraits phénolique a une activité antioxydante vis-à-vis le radical ET FARP DPPH, et un effet pas très important vis-à-vis

Le test FRAP.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur dix souches bactériennes, selon la méthode des puits, Les résultats indiquent que l'extrait possède une activité antimicrobienne sur toutes les souches testées.

In vivo, l'extrait d'acétate éthyle des fruits montrent une activité anti-inflammatoire. En effet, les résultats montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Maclura pomifera* réduit de façon significative l'œdème induit par la carragénine, alors que l'extrait à un effet anti-inflammatoire moins important pour le test *in vitro* de la résistance des globules rouges humains prétraités par l'extrait du fruit d'Osage.

Sur le plan des perspectives, Nous considérons que les observations faites *in vitro et in vivo* ne constituent qu'une première étape de recherche pour l'évaluation des propriétés biologiques des substances bioactives de *Maclura Pomifera*, les observations préliminaires faites sur les propriétés anti inflammatoire nous incitent à projeter d'autres études *in vitro*. Ces effets doivent être explorés autan plus par d'autres protocoles *in vivo*.

- **Jean-Claude MOIRON**(Janvier 2016) *MACLURA pomifera*.pdf.
- JEFFREY L. SMITH AND JANICE V. PERINO,. Osage Orange (*Maclura pomifera*),History and Economic Uses *Economic Botany*, 35(I), 1981, pp. 24-41)
- **Delle Monache et al.**, 1994) **Delle Monache, G., R. Scurria, A. Vitali, B. Botta, B. Monacelli, G. Pasqua, C. Palocci, and E. Cernia.** 1994. Two isoflavones and a flavone from the fruits of *Maclura pomifera*. *Phytochemistry* 37: 893 pg 898..
- **Peterson et Brockemeyer**, 1953, **Jones et Soderberg**, 1979, **Mahmoud**, 1981, **Voynova et al.** 1991, **Maier et al.**, 1995, **Bunyapraphatsara et al.**, 2000, **Hay et al.**, 2004).
- **Wagner et Harris**, 1952; **Ulevitch et al.**, 1974; **Gearien et Klein**, 1975; **Gerber**, 1986; et al., 1991, 1995, **Lee et al.**, 1998, **Marek et al.**, 2003).
- **Tsao et al.**, 2003, **Vesela et al.**, 2004) **Tsao, R., Yang, R., Young, J.C.**, 2003. Antioxidant isoflavones in osage orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Journal of Agriculture & Food Chemistry* 51, 6445–6451.
- **Vesela, D.,Kubinova, R., Muselik, J., Zemlicka, M., Suchy,V.**, 2004. Antioxidative and EROD activities of osajin and pomiferin. *Fitoterapia* 75, 209–211.
- **Cioffi, G., Morales-Escobar, L., Braca, A., De Tommasi, N.**, 2003. Antioxidant chalcone glycosides and flavanones from *Maclura* (*Chlorophora*) *tinctoria*. *Journal of Natural Products* 66, 1061–1064.
- **Mahmoud, Z.F.**, 1981. Antimicrobial compounds from *Maclura pomifera* fruit. *Planta Medica* 42, 299–301.,
- **Walter et al.**, 1938, **Wolfrom et Mahan** 1942.
- **Walter, E. D., M. L. Wolfrom, and W. M. Hess.** 1938. A yellow pigment from the osage orange. *J. Am. Chem. Soc.* 60: 574pg577.
- **Wolfrom, M. L., and J. Mahan.** 1942. Osage orange pigments, IX: Improved separation; establishment of the isopropylidene group. *J. Am. Chem. Soc.* 64: 308pg311.
- **Copyright Boomkwekerij Gebr. Van den Berk B.V.** 2017.
- **James D. Burton**(January 1971), OSAGE-ORANGE .*Madura pomifera* Raf. Schneid,pg3.

- (JEFFREY L. *et al.*,(1981), *Osage Orange (Maclura pomifera):History and Economic Uses, Economic Botany*, 35(I), 1981, pp. 24-41 Vines, 1960)
- (JEFFREY L. *et al.*,(1981), *Osage Orange (Maclura pomifera):History and Economic Uses, Economic Botany*, 35(I), 1981, pp. 24-41
- **Smith, J. L.; Perino, J. V.** Osage Orange (*Maclura pomifera*): History and economic uses. *Econ. Bot.* **1981**, 35, 24-41.),
- **Botta, B.; Delle Monache, G.** *Maclura pomifera* (Osage orange): In vitro culture and the formation of flavonoids and other secondary metabolites. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 33, Medicinal and Aromatic Plants VIII*; Bajaj, Y. P. S., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1995; pp 276- 295.),
- **Peattie, D. C.** *A Natural History of Western Trees*; **Houghton Mifflin: Boston, MA**, 1953.
- **Smith, J. L.; Perino, J. V.** Osage Orange (*Maclura pomifera*): History and economic uses. *Econ. Bot.* **1981**, 35, 24-41. (18) Mahmoud, Z. F. Antimicrobial components from *Maclura pomifera* fruit. *Planta Med.* **1981**, 42, 299-301.
- **Peterson, C.; Fristad, A.; Tsao, R.; Coats, J. R.** Osajin and pomiferin, two isoflavones purified from Osage orange fruits, tested for repellency to the maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* **2000**, 29, 1133-1137.
- **Wolfrom, M. L.; Harris, W. D.; Johnson, G. F.; Mahan, J. E.; Moffet, S. M.; Wildi, B.** Osage orange pigments. X. Complete structures of osajin and pomiferin. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68, 406-418.),
- **Peterson, C.; Fristad, A.; Tsao, R.; Coats, J. R.** *Osajin and pomiferin, two isoflavones purified from Osage orange fruits,, tested for repellency to the maize weevil (Coleoptera: Curculionidae). Environ. Entomol.* **2000**, 29, 1133-1137.
- **Delle Monache, G.; Scurria, R.; Vitali, A.; Botta, B.; Monacelli, B.; Pasqua, G.; Palocci, C.; Cernia, E.** Two isoflavones and a flavone from the fruits of *Maclura pomifera*. *Phytochemistry* **1994**, 37, 893-898..
- **Peattie, D. C.** *A Natural History of Western Trees*; **Houghton Mifflin: Boston, MA**, 1953.

Référence du chap 2

- **Brooth F. E. M. and Wickens G. E.**, 1988. Non-timber uses of selected arid zone trees and shrubs in Africa, Rome, F.A.O, *conservation Guide* n 19, 176p.
- **Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J.**, 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
- **Hartmann T.**, 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831 - 2846.
- **Diallo D. (2000)**. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them : *Glinus oppositifolius (Aizoaceae), Diospyros* Thèse de doctorat, Lausanne, 148-176.
- **Epifano F., Genovese S., Menghini L., Curini M.**, 2007. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68:939 - 953.
- **Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M. 2007.** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*; 68: 939-953.
- **Brzozowska J., Hanower P.**, 1976. Recherches sur les composés phénoliques des végétaux et leur rapport avec un déficit hydrique chez des cotonniers. *Annales de l'université d'Abijan, série C (Science)*, tome XII: 65 - 80.
- **Mohammedi, Z. (2006)**. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. mémoire magister. Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen.
- **Krief, S. (2003)**. Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle.
- **Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Schripsema, J., 1993.** "Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects". *Journal of Natural Products*. 56(2): 186-207.
- **Verpoorte, R., Memelink, J., 2002.** "Engineering secondary metabolite production in plants". *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 181-187.
- **Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G., 2000.** Natural products (Secondary metabolites), in:

- **Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R.** (Eds), Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Nutrition, Rockville, 1250-1318.
- **Aniszewski, T., 2007.** Alkaloids - Secrets of life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Elsevier, Oxford.
- **González, A.G., Rodriguez Pérez, E. M., Padrôn, C. H. and Bermejo, J.,(1997),** Phytochemical Investigation of Canary Island lichens. Virtual activity, and Pharmacology. : 49-60.
- **Mitaine-Offer, A. C., Tapondjou, L. A., Djoukeng, J. D., Bouda, H. and Lacaille-Dubois, M. A., (2003),** *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**: 227-228.
- **Bruneton.,1993.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 2ème édition. Lavoisier Technique & Documentation. Paris,
- **Gómez - Caravaca A. M, Gómez - Romero M, Arráez - Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A., 2006.** Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis* 41: 1220
- **Manach C., Scalbert A., Morand C., Jiménez L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727 - 747.
- **Manach C., Scalbert A., Morand C., Jiménez L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727 - 747.
- **Albrecht, H., Yoder, J. I., Phillips, D. A., 1999.** "Flavonoids Promote Haustoria Formation in the Root Parasite *Triphysaria versicolor*". *Plant Physiology*. 119(2): 585-592.
- **Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.
- **Benhamou, N., 2009.** La résistance chez les plantes : Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Lavoisier, Paris.
- **Albrecht, H., Yoder, J. I., Phillips, D. A., 1999.** "Flavonoids Promote Haustoria Formation in the Root Parasite *Triphysaria versicolor*". *Plant Physiology*. 119(2): 585-592.
- **Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne.

- [23]-**Manallah, A. (2012)**. Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif,
- **Haslam E. (1994)**. Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. Nat. Prod.
- **Bruneton, J. (1999)**. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- **Bruneton, J. (1999)**. Tannins. In: *Pharmacognosie, phytochimie, Plantes Cannas* A. www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/pos_effects.html - 6k.
- **Nacz, M., Shahidi, F. (2004)**. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*.
- **Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002)**. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*.
- **Akroum, S. (2011)**. Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine.
- **Middleton et al., (2000) ; Ksouri et al., (2007)**. (Activite-antioxydante composes-phenoliques pdf).
- **Leong et Shui, (2002)**. (Activite-antioxydante composes-phenoliques pdf).
- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F. (2004)**. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*.
- **Vinson, J.A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M., Jang, J., Agric, J. (1995)**. *Food Chem.*; 43(11), 2800- 2802.
- **Manallah, A. (2012)**. Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.
- **Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A. (2005)**. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology*, **16** : 1–8.
- **Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Moltedo, O., Leone, A., Zappia, V. (1997)**. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *Journal of Nutrition*, **127** :286-292.
- **Ghosh, D., Scheepens, A. (2009)**.Vascular action of polyphenols. *Molecular Nutrition & Food Research*, **53** : 322 – 331.

- **Bahorun, T.**(1997). Substances Naturelles actives.La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiass*,p83-94.
- **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman,D., Segura-Carretero, A.,Fernandez-Gutierrez, A.**(2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**: 1220-1234.
- **Babar,A. M.,Hahn, E.J., Paek, K.Y.** (2007). Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*, **12**: 607-621.
- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M.,Abdelly,C.**(2008).Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L.organs, and their biological activities.*Comptes Rendus Biologies*, **331**: 372-379.
- **Hodgson, J. M.,Croft, K.D.** (2010).Tea flavonoids and cardiovascular health.*Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 495–502.
- **Nkhili, Ez-zohra.** (2004). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Diplôme de Doctorat, Spécialité: Sciences des Aliments. Université Cadi Ayyad. Marrakech Université D'avignon Et Des Pays De Vaucluse Ecole Doctorale 306 – SPSA, Montpellier. 378p.
- **Maillard, M. N.,** (1996). Thèse Doct., E.N.S.IA., Paris. 148p.
- **Mauro, N. M.** (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p13, 16-28.
- **Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J.,** 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
- **Guignard J.L.,** 1996. Abrégé de biochimie végétale, Ed. *Masson*, Paris, 160 p.
- **Stöckigt J., Sheludko Y.,Unger M.,Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D.,** 2002. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A* 967: 85-113.

- **De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T., 2006.** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: 31 - 63.
- **Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. and Sripal R.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 2001; 33: 2-16.
- **Walle ,2004.** Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 2004; 36: 829-837.
- **Heard O., 1994.** Contribution à l'étude du *Desmodium Adscendens*: chimie et pharmacologie". Thèse de pharmacie, Université de Tours, France.
- <http://www.foa.org> (2003). The Woda abe"s Ecological Analysis of the Plant
- World/ (Arbres fruitiers sauvages et protégés en prefecture Logone Oriental, S. Tchad,
- Roger Blench. Overseas Development Institutes à Londres) (consulté le 16. 10. 2009).
- Oyeleke, S. B., Dauda, B. E. N., Boye, O. A., 2008. Antibacterial activity of *Ficus capensis*. *African Journal of Biotechnology* 7: 1414 - 1417.
- **Ahmadu A. A., Zezi A. U., Yaro A. H., 2007.** Anti-diarrhméal activity of the leaf extracts of *Daniellia oliveri* hutch and dalz [Fabaceae] and *Ficus sycomorus* miq [moraceae]. *African Journal of Traditional, Complimentary and Alternative Medicines* 4: 524 - 528.
- **Lansky E. P., Paavilainen H. M, Pawlus A. D, Newman R.A., 2008.** *Ficus spp.* [fig]: Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 195 - 213.
- Brooth F. E. M. and Wickens G. E., 1988. Non-timber uses of selected arid zone trees and shrubs in Africa, Rome, F.A.O, *conservation Guide* n 19, 176p.
- **Alexandre D. Y, 2002.** Initiation à l'agroforesterie en zone sahélienne. *Ed. Karthala*, p 154.
- **Bah S., Jäger, A. K., Adersen, A., Diallo, D., Paulsen,B. S., 2007.**

Antiplasmodial and GABAA–benzodiazepine receptor binding activities of five plants used in traditional medicine in Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 110: 451 - 457.

- **Mahmood N., Moore P. S., Tomasi N. D., Simone F. D., Colman S., Hay A. J.** <http://database.prota.org/recherche.htm> [consulté le 12 .10. 2009].
- **Harborne JB, Williams CA** (2001) Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports* 18: 310-333
- **Brouillard R** (1993) *The Flavonoids, Advances in research since 1986*. Ed J. B. Harborne. Chapman and Hall, London.
- **Waterhouse AL** (2002) Determination of total phenolics. In: Wrolstad, E.R.E., Editor, 2002. *Current protocols in food analytical chemistry*, Wiley, New York, pp. I1.1.1–I1.1.8.
- **Kong JM, Chia LS, Goh NK** (2003) Analysis and biological activities of anthocyanidins. *Phytochemistry* 64: 923-33.
- **Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C** (2005) Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p 4-5.
- **Grotewold E** (2006) *The Science of Flavonoids*. Springer p. 269
- **Grotewold E** (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology* 57: 761–780
- **Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A** (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* 54: 733-749.
- **Bruneton, J. (1999)**. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 3ème Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- **Bruneton, J. (1999)**. Tannins. In: *Pharmacognosie, phytochimie, Plantes* Cannas A. www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/pos_effects.html - 6k. Alkurd A., Hamed T. R., Al-Sayyed H., 2008. Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 - 274.
- **Mueller-Harvey, I. et Mc Allan, A.B. (1992)**. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.* p1, 151-217.
- **Hagerman, A.E. (2002)**. Tannin Chemistry (www.users.muohio.edu/hagermae). Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany).
- **Jean-Blain, C. (1998)**. Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev.Méd. Vét.* p149, 911 920.
- **Mueller-Harvey, I. (2001)**. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci.Technol.* p91, 3-20.

- **Feucht, W., Treutter, D. et Christ, E. (1997).** Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiol.* p17, 335-340.
- **Schofield, P., Mbugua, D.M. et Pell, A.N. (2001).** Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* p91, 21-40.
- **Dixon R, et coll. (1992).** Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis.
- **Hopkins, W.G. 2003.** Physiologie végétale. Edition Debock et lancier. Pp 276.
- **Herbert, R.B. 1989.** The Biosynthesis of secondary metabolites. 2^{ème} édition Chapman and Halle p 2, 11-115.
- **Marfak, A. 2003.** Radiolyse Gamma des Flavonoïds. Etude de leur réactivité avec les radicaux
- **Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., 2005.** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
- **Ejebe DE, Siminialayi IM, Emudainowho JOT, Ofesi U, Morka L (2010).** Analgesic and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of the leaves of *Helianthus Annus* in Wistar rats. *Asian Pac J Trop* ; 3(5): 341-347.
- **Paschapur S M, Patil M B, Kumar R, Sachin R P (2009).** Evaluation of aqueous extract of leaves of *Ocimum kilimandscharicum* on wound healing activity in albino wistar rats. *Int. J. Pharm. Tech. Res*, 1(3), 544-550.
- **Winter CA, Risley EA, Nuss GW.** Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111: 544–547.
- **Rousselet M C, Vignaud, J M, Hofman P, Chatelet F P (2005).** Inflammation et pathologie inflammatoire AFECAP, 1-57.

- **Bruneton J (1995).** Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. *Lavoisier Publishing*, Paris 367-370.
- **Ćetković G.S., Čanadanović-Brunet J., Djilas S.M., Tumbas V.T., Markov S.L., et Cetković D.D. (2007)** Antioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial Activities of *Satureja Montana* L. subsp. *Kitaibelii* Extracts. *International Journal of Molecular Sciences*. 8(10), 1013-1027.
- **K. Sidi Boulenouar & A. Ziane.** Etude phytochimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. de la région de Tlemcen. Mémoire de DES en Biochimie. Université Abou Baker Belkaid, Tlemcen, (2003) 54 p.
- **D. Villano , M.S. Fernandez-Pachon, M.L. Moya, A.M. Troncoso & M.C. Garcia-Parrilla.** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* .71 (2007): 230–235.
-
- **Benzie I.F.F. et Strain J.J. (1996)** The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70– 76.
- **Li H-B. , Wong C-C., et Cheng K-W., Feng C. (2008)** Antioxidant properties in vitro and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*. 41(3), 385–390.
- **Chung Y-C., Chang C-T., Chao W-W., Lin C-F., et Chou S-T. (2002)** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 2454–2458.
-
- **Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., et Weil J.A.(2004)** Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84, 551–562.
-
- **Siddhuraju P. et Becker K. (2007)** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*. 101(1), 10-19.
-
- **Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., et Lee S.C. (2004)** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52, 3389–3393.
- **Kumaran, A. et Karunakaran, R.J.(2007)** In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 40, 344–352.
- **Dagmar Vesel’aa, Rena’ta Kub’nova’a, Jan Musel’ikb,*, Milan Z’emlic’kab, Va’clav Suchy’a (2004)** Antioxidative and EROD activities of osajin and Pomiferin / *Fitoterapia* 75 209–211
- **Said F. Hamed1 and Ahmed A. Hussein (2005)** Effect of *Maclura pomifera* total acetonc extract, pomiferin and osajin on the autooxidation of purified sunflower triacylglycerols *Grasas y Aceites* Vol. 56. Fasc. 1, 21-24
- **RONG TSAO RAYMOND YANG, AND J. CHRISTOPHER YOUNG (2003)**Antioxidant Isoflavones in Osage Orange, *Maclura pomifera* *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6445-6451
-

- **Yesilada, E., K'upeli, E.,** 2002. *Berberis crataegina* DC. root exhibits potent anti-inflammatory, analgesic and febrifuge effects in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 237–248.
- **Mansour S., Djebli N., Eroglu E.** (2014) In vivo antiinflammatory activity and chemical composition of *Hypericum scabroides*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7645 (14)60283-2.
-
- **Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J. (2004)** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. **94**: 219-243.
- **Chwalek, M. (2004)** Hémisynthèse de saponosides à hédragenine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Reims Champagne-Ardennes. France.
- **Moussaoui S ., Harkati Z ., (2013)** :Contribution à l'étude phytochimique et l'effet hémolytique de trois plantes antidiabétiques : *Eucalyptus globulus*, *Haloxylon scaparium pomel*, *Marrbium vulgare* ;Mémoire présenté pour obtenir le diplôme de Master en biologie ,Option :Biochimie ;Université Abou Bekr Belkaid.
-
-

Résumé:

La présente étude porte sur la détermination l'activité anti-oxydante, antimicrobienne et l'évaluation de la propriété anti-inflammatoire d'extraits phénoliques de *Maclura Pomifera*. L'activité anti-oxydante a été évaluée avec les tests suivant : DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), et FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power).

La quantification par spectrophotométrie des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes totaux par la méthode d'AlCl₃ a donné des valeurs plus élevées avec l'Extrait Acétate d'Ethyle par rapport à l'extrait méthanolique.

Les importantes activités antioxydantes étaient significativement corrélées avec la teneur totale en composés phénoliques.

L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode des puits en milieu gélosé contre différentes souches pathogènes, les résultats obtenus ont révélés une activité antibactérienne variées d'une souche à une autre et dépend aussi de la concentration de l'échantillon testé.

Nous avons procédé à l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par le test, *in vitro* de la résistance des globules rouges humains prétraités par l'extrait du fruit d'Osage, et par le test *in vivo* d'inhibition de l'oedème de la patte droite postérieure de rats à la carragénine.

Nous considérons que les observations faites *in vitro et in vivo* ne constituent qu'une première étape de recherche pour l'évaluation des propriétés biologiques des substances bioactives de *Maclura Pomifera*.

Mots-clés: *Maclura Pomifera* –Activité antioxydante – Extraits phénoliques – activité antiinflammatoire – activité antimicrobienne.

Summary:

The present study investigates the determination of anti-oxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties of phenolic extracts of *Maclura Pomifera*. The antioxidant activity was evaluated with the following tests: DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), and FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power).

Spectrophotometric quantification of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method and total flavonoids by the AlCl₃ method gave higher values with the Ethyl Acetate Extract compared with the methanolic extract.

The important antioxidant activities were significantly correlated with the total content of phenolic compounds.

The antimicrobial activity was evaluated by the method of agar wells against different pathogenic strains, the results obtained revealed a varied antibacterial activity from one strain to another and also depends on the concentration of the tested sample.

We evaluated the anti-inflammatory activity by testing, in vitro, the resistance of human red blood cells pretreated with the Osage fruit extract, and by the invivo inhibition test for edema from the right hind paw of rats to carrageenan.

We consider that the observations made in vitro and invivo are only a first stage of research for the evaluation of the biological properties of the bioactive substances of *Maclura Pomifera*.

Key words: *Maclura Pomifera* - Antioxidant activity - Phenolic extracts - anti-inflammatory activity - antimicrobial activity.