

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE -EL HADJ LAKHDER -BATNA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

En Biologie

Option : Biochimie Appliquée

Présenté par
BOUZID Wafa

THEME

**Etude de l'Activité Biologique des Extraits
du Fruit de *Crataegus monogyna* Jacq.**

Devant le jury :

Mme HAMBABA Leila	M.C, Université de Batna	Présidente
Mr YAHIA Mouloud	M.C, Université de Batna	Rapporteur
Mr LAROUÏ Salah	M.C, Université de Batna	Examineur
Mme ZAAMA Djamila	M.C, Université de Constantine	Examinatrice
Mr YAHIA Abdelwahab	M.C, Université d'Oum El Bouaghi	Examineur

Année Universitaire : 2008/2009

Remerciements

Je remercie tout d'abord ALLAH tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur, Mr YAHIA Mouloud, Maitre de Conférences à l'université de Batna pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, je le remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et pour les efforts qu'il avait consentis durant la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais remercier Mr YAHIA Abdelwahab, Maitre de Conférences à l'université d'Oum El Bouagui, Mme ZAAMA Djamila, Maitre de Conférences à l'université de Constantine, Mr LAROUI Salah, Maitre de Conférences à l'université de Batna, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de leurs nombreuses autres obligations.

Un remerciement chaleureux à Mme HAMBABA Leila, responsable de la post graduation (Biochimie Appliquée) au département de Biologie université de Batna. Je ne saurais jamais la remercier assez pour son aide, sa disponibilité, son soutien sans faille et sa sympathie.

Je présente mes remerciements à Mr ABDEDDAIM Mohamed, chargé de cours à l'université de Batna, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir suivi et encourager à ne pas baisser les bras dans les moments difficiles.

*J'*aimerais également exprimer ma gratitude à Mr ABERKANE Mohamed Cherif, Maitre de Conférences à l'université de Batna et à Mr AYACHI Amar, chargé de cours à l'université de Batna, pour leurs précieuses aides, je les remercie également pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire et de m'avoir fait profiter de leurs compétences.

*M*erci pour tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre dans mon travail : Mr BELKACEMI M, Mr BELKACEMI S, Mr BOUSSELSLA H, Mr MERADI S, je les remercie du fond du cœur.

*J*e remercie tendrement ma famille, ma belle famille et mes proches amies qui m'ont toujours soutenues et encouragée même dans les périodes les plus difficiles, merci pour votre soutien inépuisable.

Liste des abréviations

AAR :	Activité antioxydante relative.
ADN :	Acide desoxyribonucleique.
ANOVA :	Analysis of variance.
APR :	Pouvoir antiradicalaire.
ARN :	Acide ribonucléique.
BHT :	Hydroxy toluene butylé.
CCM:	Chromatographie sur couches minces.
CLHP :	Chromatographie liquide à haute performance.
DL ₅₀ :	Dose létale à 50%.
DPPH :	Diphenyl picryl- hydrazyle.
EAG :	Equivalent d'acide gallique.
EAq :	Extrait aqueux du <i>Crataegus monogyna</i> .
EC :	Equivalent de catéchine.
EC ₅₀ :	Concentration effective à 50%.
EDm :	Extrait dichloromethane de <i>Crataegus monogyna</i> .
EEp :	Extrait etheropetrolique de <i>Crataegus monogyna</i> .
EMe :	Extrait methanolique de <i>Crataegus monogyna</i> .
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène.
EQ :	Equivalent de quercetine.
GPx :	Glutathion peroxydase.
GSH :	Glutathion.
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogene.
IC ₅₀ :	Concentration inhibitrice à 50%.
LDL :	Low Density Lipoprotein.
RL:	Radical libre.
RLs:	Radicaux libres.
Rf :	Rapport frontal.
S.aureus :	<i>Staphylococcus aureus</i> .

SD : Standard deviation.
SOD : Superoxyde dismutase.
UV : Ultra Violet.

Sommaire

Introduction

Etude bibliographique

Chapitre I

Données Générales sur l'*Aubépine monogyne*

I.1. Etymologie.....	1
I.2. Origine.....	1
I.3. Description botanique.....	1
I.4. Exigences climatiques	2
I.5. Position dans la systématique.....	2
I.6. Aires de répartition.....	3
I.7. Chimie de la plante	3
I.7.1 Composition en métabolites primaires.....	3
I.7.2. Composition en métabolites secondaires.....	5
I.8. Données pharmacologiques.....	6
I.9. Toxicité.....	7

Chapitre II

Oxydation et Antioxydants

II.1. Définition d'un radical libre.....	9
II.2. Différents type des ERO.....	10
II.3. Stress oxydant.....	11
II.4. Les antioxydants.....	12
II.5. Mécanismes physiologiques de l'inactivation des ERO.....	12
II.5.1. Système de défense primaire.....	12
II.5.2. Système de défense secondaire.....	13

Chapitre III

Métabolites Secondaires

III.1. Généralités.....	16
III.2. Les coumarines	17
III.2.1. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des coumarines.....	18
III.2.2 Toxicité des coumarines	19
III.3. Les flavonoïdes.....	20
III.3.1. Activité biologique et intérêt pharmacologiques des flavonoïdes.....	21
III.4. Les tanins.....	24
III.4.1. Activité biologique et intérêt pharmacologiques des tanins.....	25

Etude expérimentale

Chapitre IV

Matériel et Méthodes

IV.1. Matériel végétal.....	29
IV.2. Méthodes analytiques.....	30
IV.2.1. Détermination de la teneur en eau.....	30
IV.2.2. Détermination de la teneur en cendres totales.....	30
IV.2.3. Teneur en substances extractibles par l'eau	31
IV.2.4. Teneur en Substances extractibles par l'éthanol	31
IV.2.5. Extractions.....	31
IV.2.5.1. Extraction par macération à l'eau	31
IV.2.5.2. Extraction avec les solvants organiques.....	32
IV.2.6. Réactions de caractérisation.....	33
IV.2.6.1. Recherche des alcaloïdes.....	33
IV.2.6.2. Recherche des composés phénoliques	34
IV.2.7. Analyse chromatographique	35
IV.2.7.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	35
IV.2.7.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	36
IV.2.8. Dosage spectrophotométrique.....	37

IV.2.8.1. Estimation quantitative des polyphénols totaux.....	37
IV.2.8.2. Estimation quantitative des flavonoïdes totaux.....	37
IV.2.8.3. Estimation quantitative des Tanins condensés.....	37
IV.2.9. Tests biologiques.....	38
IV.2.9.1. Evaluation, <i>in Vitro</i> , de l'activité antioxydante	38
IV.2.9.1.1. Test de blanchissement du β -carotène	38
IV.2.9.1.2. Test au DPPH.....	39
IV.2.9.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	40
IV.3. Analyses statistiques.....	41

Chapitre V

Résultats et Discussion

V.1. Détermination de la teneur en eau, en cendres totales et en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol.....	43
V.2. Extractions.....	44
V.3. Réactions de caractérisation.....	45
V.4. Analyse chromatographique.....	46
V.4.1. Chromatographie sur couches minces (CCM).....	46
V.4.2 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	49
V.5. Dosage spectrophotométrique.....	53
V.5.1. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés.....	53
V.6. Tests biologiques.....	56
V.6.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	56
V.6.1.1. Test de blanchissement du β carotène.....	56
V.6.1.2. Test au DPPH.....	59
V.6.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	62

Conclusion et Perspectives

Références Bibliographiques

Liste des tableaux

01	Constituants chimiques de la partie comestible du <i>Crataegus monogyna</i>	3
02	Composition chimique de la partie charnue du <i>Crataegus monogyna</i>	4
03	Propriétés chimiques de l'aubépine « <i>Crataegus spp</i> ».....	5
04	Teneur en eau, en cendres totales et en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol.....	43
05	Masse, rendement et couleur des extraits obtenus.....	44
06	Les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés.....	45
07	Résultats des réactions en tubes sur les extraits préparés.....	45
08	Rapports frontaux(Rf) des spots issus de la séparation des extraits EEp et EDm dans le système hexane/ether diéthylique(1 :1)	46
09	Rapport frontaux(Rf) des extraits EMe et EAq dans le système BAW (60 :15 :35).....	48
10	Rapports frontaux des temoins dans le système BAW (60 :15 :35).....	48
11	Temps de rétention des témoins.....	50
12	Temps de rétention des pics issus des extraits.....	50
13	Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins dans les extraits de <i>Crataegus monogyna</i>	55
14	Activité antiradicalaire des extraits de <i>Crataegus monogyna</i>	59
15	Résultats de l'antibiogramme (diametres des zones d'inhibition de croissance bactérienne mm).....	63
16	Activité antimicrobienne de l'EEp (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).....	64
17	Activité antimicrobienne de l'EDm (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).....	65
18	Activité antimicrobienne de l'EMe (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).....	66
19	Activité antimicrobienne de l'EAq (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).....	67
20	Activité antimicrobienne des extraits flavoniques (diamètres des zones	

Liste des figures

01	Fruit, fleurs et feuilles de <i>Crataegus monogyna</i> Jacq.....	2
02	Réaction de détoxification du radical-anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène.....	13
03	Squelette de base des coumarines.....	17
04	Définition des différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane.....	21
05	Structure des tanins condensés.....	25
06	Représentation des différentes parties de <i>Crataegus monogyna</i>	29
07	Schéma d'extraction par macération à l'eau.....	32
08	Schéma d'extraction par épuisement successif par les solvants organiques....	33
09	Chromatographie sur couche mince des extraits EEp et EDm.....	47
10	Chromatographie sur couche mince des extraits EMe et EAq.....	49
11	Chromatogramme de la quercétine.....	51
12	Chromatogramme de la Rutine.....	51
13	Chromatogramme de la Catéchine.....	51
14	Profil chromatographique de l'EAq.....	52
15	Profil chromatographique de l'EMe.....	52
16	Profil chromatographique l'EDm.....	52
17	Profil chromatographique de l'EEp.....	53
18	Droite d'étalonnages de l'acide gallique.....	54
19	Droite d'étalonnages de la quercétine.....	54
20	Droite d'étalonnages de la catéchine.....	54
21	Cinétique de blanchissement du β carotène à 490nm en absence et en présence des extraits de <i>Crataegus monogyna</i> et du BHT.....	58
22	Activité antioxydante relative des extraits et du BHT dans le système β carotène/acide linoléique.....	59
23	Activité antiradicalaire des extraits de <i>Crataegus monogyna</i>	61
24	Activité antiradicalaire de l'antioxydant de référence (BHT).....	62
25	Photos montrant l'effet d'EEp et EDm sur la souche <i>Staphylococcus aureus</i>	69

Introduction

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances actives, Elles représentent une source de revenu non négligeable pour de nombreuses populations, possédant bien des vertus thérapeutiques démontrées par l'expérience.

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde. L'Algérie possède une richesse floristique considérable, ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts et constituent un axe de recherche scientifique et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles (Aberkane, 2006).

L'aubépine monogyne (*Crataegus monogyna* Jacq), un fruit très apprécié par la population algérienne et notamment les enfants, est une plante médicinale couramment utilisée en phytothérapie pour ses propriétés sédatives, vasculoprotectrice et antioxydantes (Bahorun, 1997).

Les substances naturelles issues de ce fruit ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation et en cosmétologie, parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure des métabolites secondaires qui sont surtout illustrés en thérapeutique (Bahorun, 1997).

La présente étude a porté sur la recherche de constituants chimiques et sur l'évaluation *in vitro* de l'activité biologique des extraits organiques et de l'extrait aqueux, préparés à partir de la partie comestible de *Crataegus monogyna*. Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Analyse quantitative et qualitative du contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins des différents extraits de *Crataegus monogyna*.
- Evaluation de l'effet anti-lipoperoxydant des extraits en utilisant le système acide linoléique- β carotène.
- Evaluation du pouvoir piégeur des différents extraits vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH).
- Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits par la méthode de diffusion en milieu solide.

Notre travail sera reparti en deux parties, initié par une revue bibliographique où nous apportons des données générales sur l'espèce étudiée, des généralités sur l'oxydation et les antioxydants et en fin des généralités sur trois métabolites secondaires (Coumarines, flavonoïdes et tanins). La seconde partie rapporte les méthodes analytiques utilisées et les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Etude Bibliographique

Chapitre 1

Données Générales sur l'Aubépine monogyne

I.1. Etymologie

Crataegus monogyna Jacq., du grec *Krataigos* (fort, résistant) et *monogyna* (souligne la particularité de sa fleur à n'avoir qu'un seul pistil) (Aymonin, 1993 ; Mazzocchi et *al.*, 1999) ; couramment appelé Aubépine monogyne est une plante de la famille des *Rosacées*. Cette famille est constituée de 100 genres dont 200 espèces de *Crataegus* (Crete, 1965 ; Domnez, 2004).

I.2. Origine

Originnaire de toute l'Europe jusqu'en Afghanistan, l'aubépine monogyne est la plante la plus commune de toutes les espèces de haie, idéale à cet égard en raison de ses rameaux denses et épineux et de sa résistance (Mitchetti, 1992 ; Edin et Nimmo, 1999). Elle est actuellement répandue dans toute les régions tempérées de l'hémisphère nord où elle s'installe volontiers à la lisière de boisés (Pittler et *al.*, 2003).

I.3. Description botanique

Crataegus monogyna, est un arbuste de 4 à 10 mètres de hauteur, à écorce lisse gris pâle, puis brune et écailleuse (Gire, 2000). Les feuilles d'un vert brillant ont 5 à 7 lobes aigus et écartés. Les fruits (cenelles) ovoïdes (de 8 à 10 mm), ont une chaire farineuse et douceâtre ; ils renferment une seule graine, lisse et luisante. Ils prennent une couleur rouge sombre à maturité(en Septembre). Les fleurs, très abondantes en mai, blanches, ont une odeur vive plutôt désagréable (Bruneton, 1993 ; Chevalier et Crouzet-Segarra, 2004).



Figure 1. Fruit, fleurs et feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq.
www.plant-identification.co.uk (Consulté le 12.11.2008).

I.4. Exigences climatiques

L'aubépine monogyne s'accommode à tous les terrains, mais elle préfère les sols calcaires et se satisfait des plus secs. Cette espèce préfère les emplacements ensoleillés, à terre légère qui ne

contient pas beaucoup d'argile, elle peut se développer dans les sols acides, neutres et même alcalins (Aymonin, 1993).

I.5. Position dans la systématique

Selon Messaili (1995), la classification botanique est la suivante :

- Embranchement : Spermaphytes
- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : Dialypétales
- Ordre : Rosales
- Famille : Rosacées
- Genre : *Crataegus*
- Espèce : *Crataegus oxyacantha* L.

ssp. monogyna Jacq.

I.6. Aires de répartition

Dans le monde, *Crataegus monogyna* occupe une aire très vaste comprenant toute l'Europe, l'Afrique du Nord et l'Asie occidentale jusqu'à l'Inde, et se trouve dans toute la France surtout le Midi (sud de la France) (Aymonin, 1993 ; Brosse, 2000 ; Koyuncu et *al.*, 2007). En Algérie, elle est commune dans les forêts et les maquis de l'Atlas Tallien, elle peut être confondue avec d'autres espèces (Temani, 1993, cité par Farhat, 2007).

I.7. Chimie de la plante

I.7.1 Composition en métabolites primaires

Tableau 1. Constituants chimiques de la partie comestible du *Crataegus monogyna* (Herrera, 1984).

Fraction		Teneur (g/100g de matière sèche)
Protéines		2.5
Lipides		2.3
Eléments minéraux	K	1.25
	Ca	0.44
	Mn	0.33
	Mg	0.06
	P	0.05

Tableau 2. Composition chimique de la partie charnue du fruit de *Crataegus monogyna* (Saadoudi, 2007 ; Boudraa, 2007).

Fraction		Teneur	Référence
Glucides (g/100g de matière sèche)	Sucres solubles	11.45 ± 0.33	Saadoudi, (2008)
	Sucres réducteurs	7.86 ± 0.13	
	Saccharose	3.59 ± 0.45	
	Cellulose	11.40 ± 0.91	
	Pectines	1.60 ± 0.91	
Eléments minéraux (mg/100g matière sèche)	Calcium	414.18 ±4.03	Boudraa, (2008)
	Magnésium	156.52 ±15.43	
	Sodium	31.20 ± 0.00	
	Phosphore	20.09 ± 4.03	
	Potassium	1694.80 ±31.71	
	Cuivre	0.31 ± 0.10	
	Fer	4.09 ± 0.03	
	Manganèse	1.52 ± 0.25	
	Zinc	0.32±0.01	
	Cobalt	0.17±0.02	
	Plomb	0.31±0.07	
Vitamines (mg/100g matière sèche)	Tocopherol	0.79±0.09	Boudraa, (2008)
	Carotenoides	1.37±0.00	
	Vitamine C	4.07±0.69	
	Thiamine	0.05±0.00	
	Pyroxidine	0.012	
	Biotine (µg/g)	0.031	

Le tableau ci-dessous résume les propriétés chimiques de l'aubépine « *Crataegus spp* » démontrées par l'équipe d'Ozcan (2005) en Turquie :

Tableau 3. Propriétés chimiques de l'aubépine « *Crataegus spp* » (Ozcan et *al.*, 2005)

Fraction		Teneur
Taux d'humidité %		64.26
Protéines brutes %		2.48
Huile brute %		0.87
Cellulose brute %		4.67
Cendres totales %		2.28
Cendres insolubles dans HCL. %		0.0012.
Elements minéraux (ppm)	Ca	03046.37
	K	13539.96
	Mg	01502.55
	Na	00312.18
	P	01477.88
	Fe	32.77
	Se	0.56
	Cr	1.10

I.7.2. Composition en métabolites secondaires

Dans la partie charnue de *Crataegus monogyna* ont été décelés les constituants suivants (Garcia et *al.*, 1997 ; Bruneton, 1999 ; Chang et *al.*, 2002 ; Degenring et *al.*, 2003 ; Urbonaviciute et *al.*, 2006 ; Svedstroma et *al.*, 2006).

- Acides phénoliques (1-2%);
 - ❖ acide chlorogénique ;
 - ❖ acide caféique.
- Flavonoïdes (2-3%);
 - ❖ Vitexin ;
 - ❖ Quercétine ;
 - ❖ Vitexine 2 rhamnoside.
- Tanins.

- Coumarines.
- Triterpènes et acides triterpéniques.
- Huile essentielle (trace).

I.8. Données pharmacologiques

Crataegus monogyna est une plante couramment utilisée en phytothérapie et inscrite à la pharmacopée française pour ses propriétés sédatives, vasculoprotectrices et antioxydantes (Bahorun, 1997).

Bien que traditionnellement, les fruits de l'aubépine fussent employés pour le traitement des troubles cardiaques d'origine nerveuse, les extraits actuels sont presque exclusivement préparés avec les feuilles et les fleurs de l'arbuste (Degenring et al., 2003).

Les sommités fleuries ont une action sédative sur le système nerveux et une action régulatrice sur le système cardio-vasculaire; elles corrigent les troubles du rythme cardiaque; elles sont hypotensives et antispasmodiques au niveau des muscles lisses vasculaires. Ces actions neurosedatives, cardiosedatives, vasodilatatrices et antispasmodiques peuvent être utilisées dans les insomnies, le nervosisme, l'émotivité et le surmenage (Girre, 2000 ; Veveris et al., 2004; Cuit, 2006). Les fruits sont légèrement astringents et s'emploient en gargarisme contre les maux de gorge (Beloued, 1998).

Les décoctions des feuilles et des fruits de *Crataegus aronia* sont utilisées pour traiter les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer et l'impuissance sexuelle dans la médecine arabe traditionnelle (Ljubuncic et al., 2005).

L'activité antioxydante, anti-inflammatoire, hypotensive des extraits alcooliques de l'aubépine (fruits, fleurs et feuilles) a été prouvée *in vitro* (Bahorun et al., 1996 ; Fong et Bauman, 2002 ; Maria et al., 2005). Des études réalisées *in vitro* ont démontré que les extraits à base de procyanidines de l'aubépine aident à réduire le niveau du cholestérol et à diminuer le taux des triglycérides (Chang et al., 2002 ; Zhang et al., 2006 ; Svedstroma et al., 2006).

Des expériences réalisées *in vivo* par Zhang et ses collaborateurs (2004) ont démontré que l'administration de l'extrait obtenu à partir de la partie charnue des fruits du genre *Crataegus* augmente la concentration du α Tocophérol et inhibe l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein) humains.

Les acides phénoliques de l'aubépine ; acide cratégique, acide chlorogénique, acide tartrique et l'acide triterpénique augmentent et favorisent l'écoulement du sang. L'acide citrique équilibre les niveaux de l'acidité du corps, et favorise la fonction digestive en augmentant la production de la bile (Davie, 2000).

En Europe, l'aubépine a un usage interne contre la tachycardie (Garcia et *al.*, 1997 ; Sparska et Martin, 1999). Cette plante a également des propriétés anti protozoaires (*Trichomonas vaginalis*) (Girre, 2000).

I.9. Toxicité

Selon Chang (2002), l'administration par voie orale, de l'extrait alcoolique à 10%(fruits et feuilles de l'aubépine), pourrait entraîner une toxicité aigue avec une dose létale à 50%(DL₅₀) de 18.5ml/ Kg chez les souris et 33.8 ml/kg chez les rats. La toxicité chronique n'a semble t'il jamais été étudiée (Bruneton, 1993).

Chez l'homme, de trop fortes doses provoquent des troubles cardiaques, respiratoires (dépression), des troubles digestifs bénins et de légères allergies cutanées. Une consommation excessive de fruits par de jeunes enfants pourrait produire une hypotension sévère. D'autre part, il s'agit d'une plante allergisante par son pollen (Girre, 2000).

Chapitre 2

Oxydation et Antioxydants

II.1.Définition d'un radical libre

On définit comme radical libre (RL), n'importe quelle molécule indépendante contenant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) (Christopher et *al.*, 1995). Les radicaux libres (RLs) sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir de la stabilité. Une « réaction en chaîne » débute lorsqu'un RL attaque la molécule stable la plus proche en lui « volant » son électron, et la « molécule attaquée » devient alors elle-même un RL (Martinez-Cayuela, 1995). Bien que le terme de radical libre ait souvent été assimilé à une espèce réactive ou un oxydant, il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants. De même que tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres (Anderson et *al.*, 1996 ; Fosting, 2004).

Présent dans l'air pour environ une partie sur cinq, l'oxygène est indispensable à la vie de la plupart des êtres vivants, Il possède deux électrons non appariés, Ceci explique sa grande réactivité ; cependant, la plupart des réactions oxydatives qu'il est susceptible de provoquer spontanément dans un organisme humain sont extrêmement lentes, Il est donc peu toxique par lui-même (Dacosta, 2003). Mais sous l'action des radiations ionisantes, de rayon UV, de métaux de transition « fer, cuivre...etc. » ou au cours de certaines réactions enzymatiques, des formes hautement réactives de l'oxygène apparaissent, on les désigne souvent comme espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou reactive oxygen species (ROS) selon la terminologie anglaise. Cette appellation inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (Le radical superoxyde ; hydroxyle ; l'oxyde nitrique) mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires (peroxyde d'hydrogène ; l'oxygène singulet ; l'anion hypochlorite ; le peroxydinitrite) dont la toxicité est importante (Novelli, 1997 ; Bartosikova et *al.*, 2003).

II.2. Différents type des ERO

(Le symbole • indique la présence d'un électron célibataire.)

✚ L'anion -radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) est issu de la réaction de l'oxygène avec un électron, souvent au niveau de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale ou au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus. Il semble être impliqué dans la protéolyse non enzymatique du collagène.

✚ **Le peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2)**, provient d'une réaction entre deux anions superoxyde qui met fin au processus radicalaire. IL s'agit d'un oxydant beaucoup moins puissant.

✚ **Le radical hydroxyle ($HO^\bullet$)**, est le produit de la réaction du peroxyde d'Hydrogène avec les ions métalliques comme par exemple le fer. Avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus instable et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène.

✚ **L'oxyde nitrique ($NO^\bullet$)**, produit par la NO synthétase, est un vasodilatateur physiologique et joue aussi un rôle de messenger interneuronal. Il peut avoir un rôle néfaste.

✚ **L'oxygène singulet (1O_2)** est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence musculaire liée à l'âge et de certains cancers de la peau.

✚ **L'anion hypochlorite (ClO^-)** est produit à partir du peroxyde d'hydrogène par la myéloperoxydase (MPO). Il n'est présent que lors d'infections.

✚ **Le peroxynitrite ($ONOO^-$)** est issu de la réaction entre ($O^\bullet_2$) et ($NO^\bullet$). Très néfaste pour les protéines et les gènes, il est impliqué dans l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde (Potterat, 1997 ; Dacosta, 2003, Hennebelle, 2006).

En l'absence d'agression extérieure particulière d'origine chimique ou radiative, les ERO sont produites physiologiquement à cause d'imperfection au niveau de la gestion de l'oxygène dans des processus comme la respiration mitochondrial., la phagocytose (au cours de laquelle survient une « flambée respiratoire ou choc respiratoire»), qui entraîne la production d'anion superoxyde, peroxyde et hypochlorite, toxique pour les agents infectieux mais aussi pour les cellules humaines (Catalano et al., 2005). L'activité de certaines enzymes cytoplasmique comme par exemple la xanthine oxydase conduit également à la formation des ERO (Fridovich, 1970 ; Hennebelle, 2006).



Les ERO sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, l'exposition prolongée au soleil, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'effort intense et prolongé, ainsi que le tabagisme (une bouffée de cigarette contient environ 10^{14} radicaux) (Panda et al., 1999 ; Pincemail et al., 2002 ; Fiorucci, 2006). Dans les circonstances

normales, cette surproduction est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense donc la balance antioxydant/pro-oxydant est en équilibre.

II.3. Stress oxydant

Le stress oxydant est le déséquilibre entre la génération des ERO et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs, ce déséquilibre a pour conséquences l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules (Aravodis, 2005). Les cibles biologiques les plus vulnérables à cet endommagement oxydatif sont : l'acide désoxyribonucléique (ADN) (modification des bases, cassure des brins) (Rehman et *al.*, 1999), les protéines (modification structurales et fonctionnelles) et les lipides (peroxydation lipidique) (Hu et *al.*, 2005).

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreux désordres et maladies : athérosclérose (Ko et *al.*, 1998 ; Harrison et *al.*, 2003), la cancérogenèse (Hussain et *al.* 2003 ;Klaunig et Kamendulis,2004), l'arthrite, l'asthme, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le mongolisme (Cavin, 1999), les maladies cardiovasculaires, arthrose, cataracte, le diabète, chute de cheveux et le vieillissement (Tohda et *al.*, 2004; Pastre et priymenko, 2007 ; Surveswaran et *al.*, 2007 ; Bekro et *al.*, 2008).

II.4.Les antioxydants

Toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat est appelée antioxydant. Le terme de substrat oxydable inclut toutes sortes de molécules *in vivo* (Halliwell, 1999).

L'organisme est capable, dans certaines mesures, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense développés au cours de l'évolution (Hennebelle, 2006).

II.5. Mécanismes physiologiques de l'inactivation des ERO

II.5.1. Système de défense primaire

- ❖ Les métaux susceptibles de catalyser la formation du radical hydroxyle (fer, cuivre) sont physiologiquement séquestrés et transportés grâce à des protéines comme la transferrine et l'albumine qui agissent en tant d'antioxydants primaires (Pastre et Priymenko, 2007).
- ❖ Certaines enzymes ont également un rôle de détoxification des ERO. Le superoxyde dismutase (SOD) convertit le radical anion-superoxyde en peroxyde d'hydrogène, moins toxique. Ce dernier est secondairement soit dismuté en oxygène et eau grâce à la catalase, soit transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion(GSH), catalysée par la glutathion peroxydase(GPX). Le glutathion oxydé est atoxique et peut en

outre, être réduit par la glutathion réductase, qui a pour coenzyme le NADPH (nicotineamide adenosine dinucleotide phosphate sous sa forme réduite) (Lehucher et *al.*, 2001 ; Hennebelle, 2006) (Fig2).

Au total., le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active peut être résumé dans le schéma suivant :

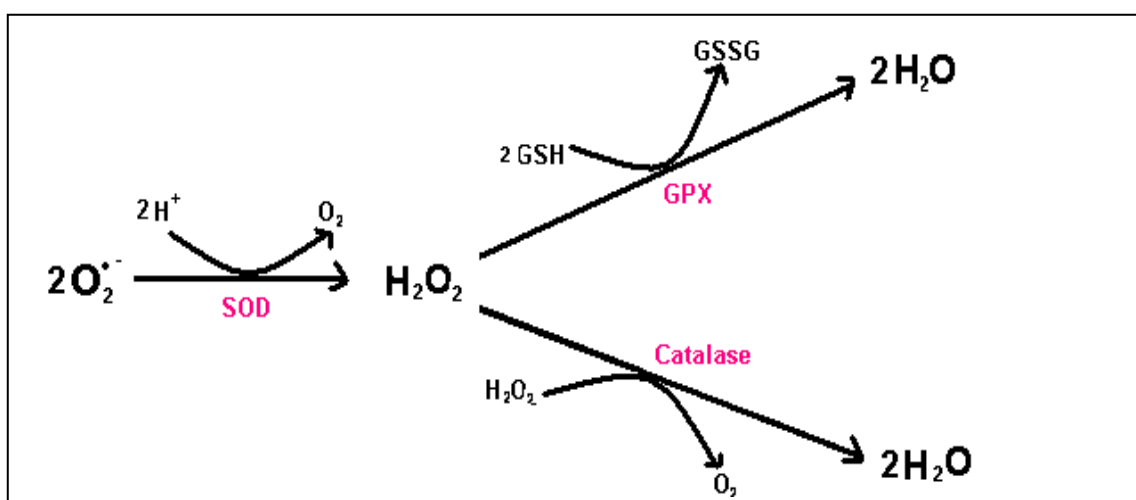


Figure 2. Réaction de détoxification du radical-anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (Hennebelle, 2006).

Les différents isoformes de SOD contiennent soit du manganèse (SOD mitochondriale), soit du cuivre et du zinc (SOD cytosolique), tandis que la GPX contient du sélénium. Ce n'est donc qu'indirectement que ces métaux possèdent une activité antioxydante (le cuivre est pro-oxydant sous forme libre) (Cuvelin et Berset, 1992 ; Surveswaran et *al.*, 2007).

Un groupe d'antioxydant constitué de plusieurs composés de faible poids moléculaire sont capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO. Le mécanisme indirect implique la chélation des métaux de transition pour empêcher la production du radical hydroxyle. Les antioxydants à action direct sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, l'empêchant ainsi d'attaquer les structures biologiques (Kohen et Nyska, 2002, Hennebelle, 2006). Ces molécules proviennent soit de sources endogène

(glutathion), soit exogènes apportés par l'alimentation (tocophérols, caroténoïdes, flavonoïdes etc....) (Dacosta, 2003 ; Kohen et Nyska, 2002).

II.5.2. Système de défense secondaire

C'est un système de protection contre les conséquences de l'oxydation des biomolécules, comme la dégradation des protéines dénaturées par le proteasome, l'intervention de ligase et endonucléases au niveau de l'ADN et, dernier rempart contre la cancérisation de la cellule, l'apoptose (Catalano et *al.*, 2005 ; Hennebelle, 2006).

Chapitre 3

Métabolites Secondaires

III.1. Généralités

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes : parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes et stéroïdes et les composés azotés dont les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (Huang et Ferraw, 1991 ; Ali et *al.*, 2001 ; Li et *al.*, 2007)

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle. (Chopra et *al.*, 1986).

Souvent acides, les polyphénols sont solubles dans une solution de carbonate de sodium. Chimiquement ils sont réactifs et peuvent participer à des liaisons hydrogènes (Louis, 2004 ; Luthria et Mukahapadhyay, 2006). Enfin ils sont sensibles à l'oxydation. Un faible nombre de ces composés (quercétine, acide caféique) sont répandus mais la plus part n'ont qu'une faible occurrence. Leur rôle physiologique est encore incertain (Singleton et *al.*, 1999 ; Louis, 2004 ; Boizot et Charpentier, 2006).

Les effets bénéfiques des polyphénols sont attribués à leurs propriétés antioxydantes et à leur capacité de capter les radicaux libres. Ces substances présentent des propriétés anticancéreuses, antimutagènes et antibactérienne non négligeables (Meyer et Yi, 1997 ; Weissburger, 1997 ; Redoyal et *al.*, 2005 ; Hatano et *al.*, 2005).

De récentes études ont montré l'effet bénéfique d'un apport de 200 mg d'extrait de thé vert, soit 100mg de polyphénol, retarde efficacement le stress oxydant ainsi que l'insulinorésistance et augmente la lipolyse (Kao et *al.*, 2002).

Parmi les composés phénoliques, dont plus de 8000 sont connus ; les coumarines, les flavonoïdes, les tanins, et d'autres classes existent en nombres considérables (Hu, 2005 ; Beta et *al.*, 2005 ; Luthria et Mukahapadhyay, 2006).

III.2. Les coumarines

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de fève tonka (*Dipterix odorota* Wild., Fabaceae) d'où fut isolée en 1982 (Bruneton, 1993). Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (Ford et *al.*, 2001). (Fig 3).

Figure 3. Squelette de base des coumarines.

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels, elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont : *Légumineuse*, *Rutacées*, *Apiécées* et *Thymeleacées*. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (Guignard, 1998 ; Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004).

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée (Hofmann, 2003). Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées comme des 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. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (Hofmann, 2003).

On peut classer les coumarines en cinq catégories : (Guignard, 1998 ; Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004)

- **Coumarines simples :**
 - Coumarine ;
 - Ombelliferone ;
- **Coumarines prenylées :**
 - Rutaculine ;
 - Osthol ;
- **Furanocoumarines :**
 - Furanocoumarines linéaires :
 - o Bergaptène ;
 - o Imperatorine ;
 - Furanocoumarines angulaires :
 - o Angelicine ;
 - o Pimpinéline.

- **Pyranocoumarines :**
 - La visnadine
- **Les coumarines peuvent également exister à l'état dimerique ou trimerique**
 - Dicoumarines(coumarines dimerique) :
 - Dicoumarol.
 - Tricoumarines :
 - Triumbellattine.

III.2.1. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des coumarines

Les coumarines sont des molécules biologiquement actives, elles manifestent diverses activités : anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antimicrobienne, antivirale et analgésique (Ochocka et al., 1995; Taguchi, 2000; Ojala et al., 2000 ; Chen et al., 2004 ; Khan et al., 2005 ; Thati et al., 2007 ; Stefanova et al., 2007).

En 1957, O'Neal et son équipe ont montré l'efficacité des coumarines pour bloquer le cancer induit chimiquement par les radiations ultraviolettes (O'Neal., 1957). Ces molécules sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxydes (Anderson et al., 1996 ; Hu et al., 2005).

Les coumarines se révèlent être des composés thérapeutiquement promoteurs dans l'amélioration du système immunitaire (action immunostimulante) : l'administration de la coumarine et de l'umbelliferone par des malades atteints de cancers ou de brucellose a raison de 100mg par jour a provoqué une augmentation des lymphocytes T Helper dans la circulation sanguine (Bruneton, 1993 ; Stefanova et al ; 2007).

Une activité antifongique significative a également été reportée pour certaines coumarines. Dans leurs études *in vitro*, Degre et son équipe ont montré que les coumarines paralysent la croissance de *Saccharomyces servisiae*. Pour l'activité antibactérienne, les coumarines sont efficaces contre les bactéries à Gram positif (Cottiglia et al., 2001 ; Laure, 2005 ; Khan et al., 2005).

Après stimulation par des rayonnements ultra-violet de grande longueur d'onde (365 nm), certaines furanocoumarines ont la propriété de stimuler fortement la synthèse de mélanine par les mélanocytes cutanées, à travers une augmentation de leur activité mitotique. Cette propriété a été exploitée par les égyptiens pour le traitement de la dépigmentation (Bruneton, 1993). Par ailleurs, des chercheurs espagnols ont évalué l'activité anti-VIH de onze composés dérivés de la 4 phényl coumarine isolés de l'espèce *Marila pluricostata* (Redoyal et al., 2005).

Il convient d'ajouter que les furanocoumarines sont impliquées dans bien d'autres mécanismes biologiques que nous ne pouvons décrire ici, mais qui constituent des pistes de recherches pour le traitement de maladies comme la sclérose en plaque et la dépression (Veselovskaya et *al.*, 2006).

III.2.2 Toxicité des coumarines

La coumarine n'est pas toxique en soi, elle peut être convertie par les champignons, en une toxine le dicoumarol qui est typiquement présent dans le foin moisi ; chez le bétail, le dicoumarol provoque des hémorragies fatales en inhibant la vitamine K qui est un facteur de coagulation du sang (Schorderet, 1992 ; Repcak et *al.*, 2001 ; Khan et *al.*, 2005).

Chez l'homme la consommation des espèces végétales qui renferment des furanocoumarines linéaires ou angulaires provoque, s'il est accompagné d'une exposition à la lumière solaire, une dermatite phototoxique d'intensité variable allant du simple érythème jusqu'à l'apparition de bulles et de vésicules au niveau des zones exposées, quelques jours après le contact, les zones touchées présentent une hyperpigmentation (Bruneton, 1999).

Les furanocoumarines linéaires peuvent être le support de cycloaddition avec les bases pyrimidiques de l'ADN ou de l'ARN, la duplication des brins est alors bloquée ainsi que la traduction des ARN. Cette propriété est souvent invoquée pour expliquer les caractères mutagènes et carcinogènes de ces molécules (Bruneton, 1999).

III.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides : les flavonosides. Ils sont très largement répandus dans le règne végétal (les fruits, les légumes, les graines ou encore les racines des plantes) (Fiorucci, 2006). Les familles les plus riches en flavonoïdes sont : *Fabacées*, *Myrtacées* et *Polygonacées* (Ghestem et *al.*, 2001). Tous les flavonoïdes (plus de 6000 structures) possèdent le même élément structural de base : le noyau flavane constitué de deux noyaux aromatique A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C (Bruneton, 1999 ; Reynaud et Lussignol, 2005) (Fig. 4).

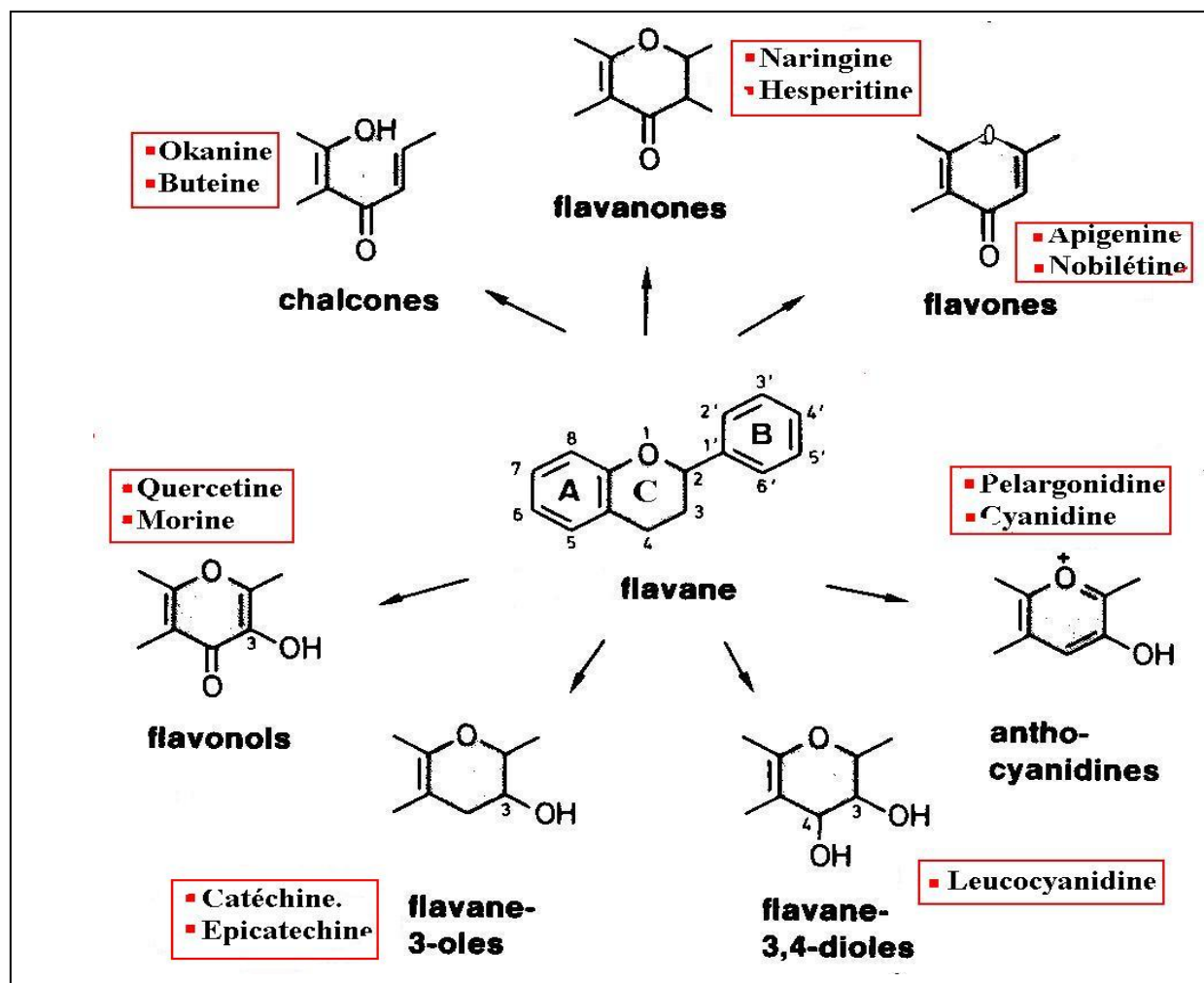


Figure 4. Définition des différents types de flavonoïdes à partir du squelette flavane.
(Dacosta, 2003 ; Louis, 2004).

III.3.1. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, antispasmodiques, antitumorales, antiagrégation plaquettaires, antiallergiques, hypocholestérolémiantes, antiinflammatoires, antihypertensives et antimicrobiennes (Das et *al.*, 1994 ; Formica et Regelson, 1995; Tijburg et *al.*, 1997 ; Groot, 1998 ; Yochum et *al.*, 1999 ; Tahrouch et *al.*, 2000 ; Kim et *al.*, 2004 ; Cushine et Lamb, 2005 ; Arses et *al.*, 2005 ; Kini et *al.*, 2008). Certains flavonoïdes (notamment du soja) ont un effet préventif sur le cancer du sein, de la prostate et l'ostéoporose (Besle et *al.*, 2004).

Des études suggèrent un rôle protecteur des flavonoïdes contre les maladies coronariennes, en empêchant le dépôt de graisses sur les parois des artères. Ces travaux ont été initiés dans les années 1990 et des lors les chercheurs ont tenté de mieux comprendre les mécanismes d'action

de ces molécules (Zabri et *al.*, 2008).

Certaines manifestations du Scorbut, guéris par l'administration de jus de citron, ne le sont pas par l'administration du seul acide ascorbique (vitamine C). Il a donc été postulé que l'acide ascorbique ne pouvait agir qu'en association avec un facteur, identifié aux flavonoïdes (Bruneton, 1993).

Plusieurs flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la 5 lipoxygénase et donc de la production des leucotriènes médiateurs de l'inflammation et des manifestations allergiques, cette propriété démontrée *in vitro* pourrait expliquer en partie les activités anti-inflammatoires et antiallergiques des flavonoïdes (Bruneton, 1993).

Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique : c'est le cas de la proline hydroxylase, cette stimulation favorise l'établissement de pontage entre les fibres de collagène, renforçant ainsi leur solidité et leur stabilité (Bruneton, 1993).

Les flavonoïdes peuvent empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques (Marfak, 2003).

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène (ERO), par chélation de métaux de transition et par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des ERO (Tahrouche et *al.*, 2000 ; Bartosikova et *al.*, 2003 ; Fiorucci, 2006).

Hansaki et ses collaborateurs (1994), dans une étude sur la maladie de la goutte, ont montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celle du radical superoxyde dans les tissus humains (Marfak, 2003).

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont aussi de bons inhibiteurs d'autres enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipoxygénase (Marfak, 2003).

Les flavonoïdes et en particulier la quercétine sont des piègeurs efficaces des radicaux hydroxyles et peroxyde particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique (Erben-Russ et *al.*, 1987), ce qui est un élément important pour la protection des membranes cellulaires et qui complète les systèmes enzymatiques de défense cellulaire (Milane, 2004)

Les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptible d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés, ils formeraient des espèces

radicalaires intermédiaires peu réactives. De plus ils pourraient agir en chélatant les métaux de transition tels que le cuivre et le fer (Milane, 2004).

Les flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein). Cependant, leur teneur dans les lipoprotéines est mal connue, à la différence d'autres antioxydants incorporés dans les lipoprotéines tels que α tocophérol et le β carotène (Milane, 2004).

D'après une enquête de Hertog et al (1993), la présence des flavonoïdes en quantité importante dans l'alimentation diminue de 68 % les risques cardiovasculaires par rapport à une alimentation qui est faiblement pourvue.

Parmi les composés les plus antioxydant on peut citer la catéchine, la quercétine, et l'apigénine mais aussi les acides phénoliques tels que les acide caféique et chlorogénique. Le thé est une source importante de flavonoïdes, sa consommation pourrait contribuer à diminuer les taux de cholestérol plasmatique (Imai et Nakachi, 1995) et participerait à la protection des lipoprotéines. Cependant, les influences nutritionnelles sont toujours très complexes et il est nécessaire de réunir le maximum de facteurs favorables pour bénéficier des effets protecteurs potentiels de l'alimentation.

Les flavonoïdes sont cependant susceptibles de se comporter comme agent pro-oxydants en effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène. Ainsi ils seraient capables de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) aboutissant à la formation de radicaux hydroxyles par réaction entre (Fe^{2+}) et H_2O_2 (Milane, 2004). En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro*.

III.4. Les tanins

En 1962, Bate-Smith et Swain donnent aux tanins la définition suivante : « 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 » (Aganga et Mosase, 2001 ; Peronny, 2005).

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes basés sur des différences structurales : les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables, ou tanins condensés (Ghestem, 2001).

- **Tanins hydrolysables**

Ce sont des esters de glucose, c'est à dire un noyau central de glucose sur lequel se fixent, au moyen d'une liaison ester, des acides : l'acide gallique pour le groupe des gallotanins, l'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 (Ghestem, 2001).

- **Tanins condensés (proanthocyanidines)**

De structure plus complexe, ils sont de loin les tanins les plus largement rencontrés dans les plantes vasculaires, des dicotylédones aux plantes plus primitives, fougères et gymnospermes.

Ce sont des polymères de flavan-3-oles (Catéchine) et de flavan-3,4-dioles (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux.

Les chaînes de polymères comptent de 2 à 20 unités environ, et il existe de nombreuses hydroxylations possibles en différents endroits de chaque monomère. Cette diversité structurale explique les variations d'activité biologique (Okamura et *al.*, 1993 ; Aganga et Mosase, 2001 ; Peronny, 2005).

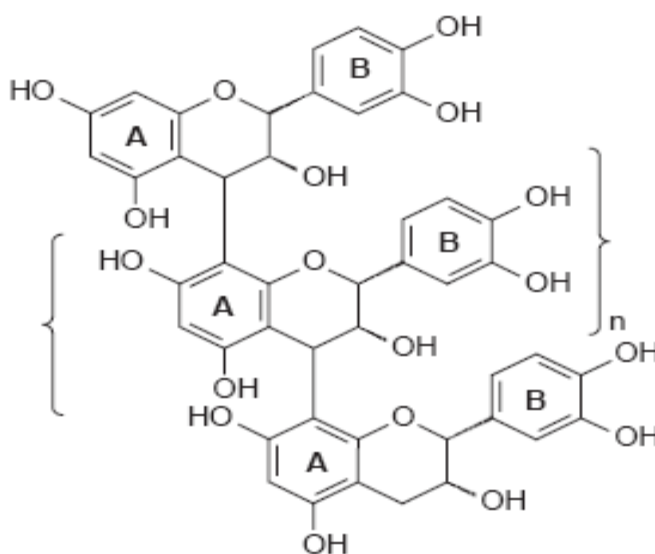


Figure 5. Structure de base des tanins condensés (Li, 2004).

III.4.1. Activité biologique et intérêt pharmacologiques des tanins

Les applications médicales des plantes à tanins découlent de leur affinité pour les protéines : ils ont un effet antidiarrhéique, et par voie externe, ils imperméabilisent les couches superficielles de la peau, sont vasoconstricteurs et limitent la perte en fluides. Ces propriétés, ajoutées par ailleurs à leur effet antiseptique, en font des molécules intéressantes pour la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures, et les rendent utilisables dans le traitement des diarrhées infectieuses (Okuda et *al.*, 1983 ; Bruneton, 1999).

Les tanins ont des grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénol. Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples (Perret, 2001 ; Peronny, 2005).

Quelques tanins ellagiques s'opposent à la mutagénicité de certains cancérigènes et à la transplantation de tumeurs expérimentales (action immunostimulante).

Des études menées en Nouvelle-Zélande ont montré que la consommation de plantes à tanins pouvait affecter la biologie de certaines espèces de parasites intestinaux en diminuant la production des œufs. De nombreuses études ont montré l'effet antimicrobien des tanins sur différentes bactéries, virus et champignons (Bakous *et al.*, 1997; Peronny, 2005).

Les tanins ont aussi des propriétés proches de celles des flavonoïdes : augmentation de la résistance capillaire, diminution de la perméabilité capillaire et stabilisation du collagène (Bruneton, 1993).

L'absorption du fer est inhibée par les tanins qui agissent comme des chélateurs naturels dans le tube digestif. La consommation de ces molécules réduit très fortement l'absorption du fer chez les rats, ce qui permet grâce à cette propriété de protéger les animaux sujets à l'hémossidrose. Grâce à leur affinité les tanins sont utilisés comme antidotes des alcaloïdes, des glycosides et des ions de métaux lourds (Peronny, 2005).

Les tanins contiennent de nombreux groupements hydroxyle (sur les noyaux phénoliques), ce qui leur permet de former des complexes insolubles avec les hydrates de carbone, des protéines et des ions métalliques. Ils se lient à la quasi-totalité des protéines solubles, donnant naissance à des polymères insolubles à pH et forces ioniques normaux. Cette réaction avec les protéines est à l'origine de nombreux effets biologiques des tanins, les enzymes complexées de cette façon montrent une réduction marquée de leurs activités (Perret, 2001 ; Peronny, 2005).

Les tanins peuvent également former des complexes avec d'autres polymères naturels comme les acides nucléiques et les polysaccharides (Peronny, 2005).

Etude Expérimentale

Chapitre 4

Matériel et Méthodes

IV.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par les fruits de *Crataegus monogyna* Jacq, collectés en automne 2007(N'gaous, wilaya de Batna). Après avoir déterminé la teneur en eau, la partie charnue est séchée à basse température afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, en minimisant les divers mécanismes de fermentation et de dégradation inhérents aux caractères organiques de ces matières premières. Le matériel végétal a été ensuite broyé.

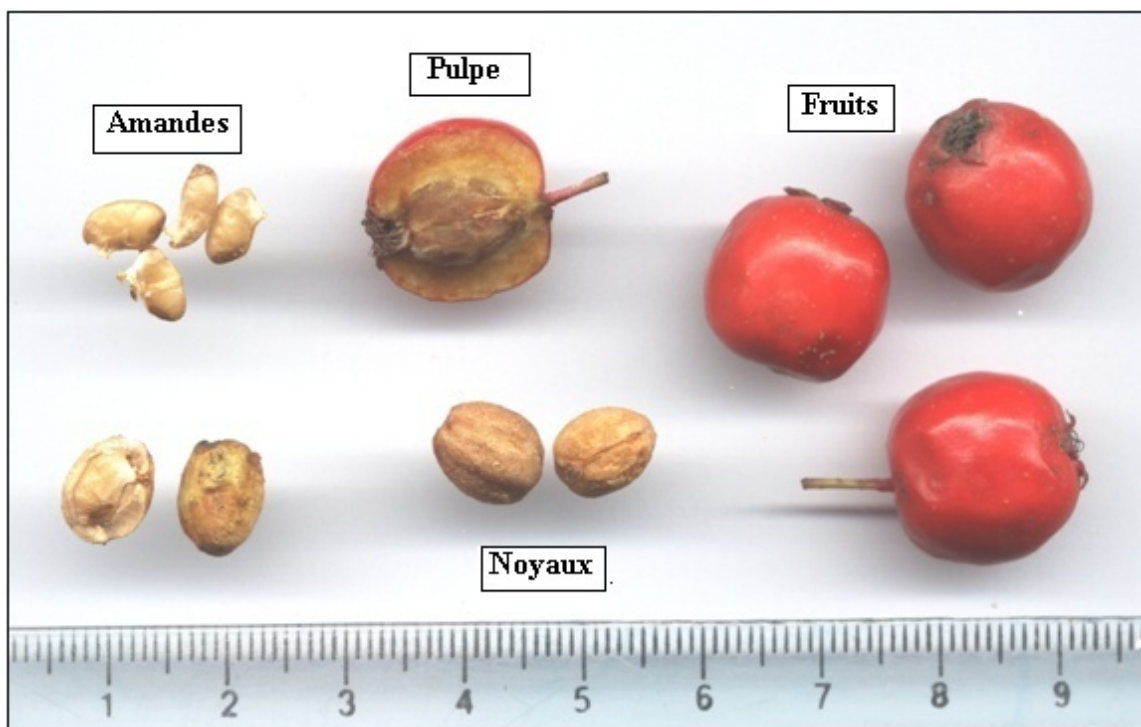


Figure 6. Représentation des différentes parties de *Crataegus monogyna* Jacq.

IV.2. Méthodes analytiques

IV.2.1. Détermination de la teneur en eau

La méthode utilisée est la dessiccation par évaporation. On procède à la dessiccation du matériel végétal à la température de $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans une étuve ventilée jusqu'à poids constant. La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation (Audigié et al., 1978).

La teneur en eau est calculée par la formule suivante :

$$H\% = \frac{M1-M2}{PE} \times 100$$

H% : Teneur en eau.

M1 : Poids de la capsule + échantillon avant dessiccation.

M2 : Poids de la capsule + échantillon après dessiccation.

PE : La prise d'essai.

Nous avons déterminé la moyenne des pourcentages d'eau de 10 essais dans les mêmes conditions. La matière sèche (MS) est obtenue comme suit :

$$(MS) \% = 100 - H\%$$

IV.2.2. Détermination des

Elle Consiste à un passage au four du matériel végétal à une température de 550°C, jusqu'à destruction totale de toute particule charbonneuse (Laurent, 1991). La teneur en matière organique est calculée par la formule suivante :

$$MO\% = \frac{M1 - M2}{PE} \times 100$$

MO% : Matière organique.

M1 : Poids de la capsule et de l'échantillon avant calcination.

M2 : Poids de la capsule et de l'échantillon après calcination.

PE : Prise d'essai.

La teneur en cendre est calculée comme suit :

$$\text{Cendres \%} = 100 - MO \%$$

Nous avons réalisé 10 essais de la même manière afin de déterminer un pourcentage moyen.

IV.2.3. Teneur en substances extractibles par l'eau (Diallo, 2005)

Nous avons fait une décoction d'un gramme de poudre (PE) avec 20 ml d'eau distillée pendant 15 mn. Après refroidissement et filtration sur papier filtre, le filtrat a été mis dans une capsule pesée et tarée au préalable(n) et évaporé à sec (n'). La teneur en substances extractibles par l'eau est évaluée par la formule :

$$SEE\% = (n - n') \times 100 \div PE.$$

IV.2.4. Teneur en substances extractibles par l'éthanol (Diallo, 2005)

Nous avons fait une macération de 24 heures à la température ambiante. Après filtration, le filtrat a été mis dans une capsule préalablement pesée et tarée (n) et évaporé à sec. Après refroidissement la capsule a ensuite été pesée (n') et la masse de résidu déduite. La teneur en substances extractibles par l'éthanol est évaluée par la formule :

$$SEEt\% = (n - n') \times 100 \div PE$$

IV.2.5. Extractions

IV.2.5.1. Extraction par macération à l'eau

50g de poudre ont été introduits dans un erlenmeyer et macérés dans 500 ml d'eau distillée, sous agitation mécanique pendant 24 heures à température ambiante (fig.7). Après filtration sur papier filtre, le filtrat a été lyophilisé (Sanogo *et al.*, 2006).

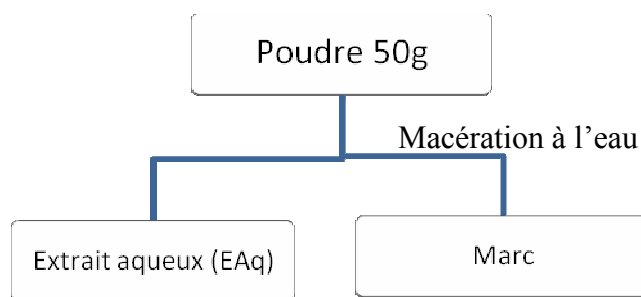


Figure 7. Schéma d'extraction par macération à l'eau.

IV.2.5.2. Extraction avec les solvants organiques

La méthode d'extraction que nous avons employé est la macération successive par trois solvants de polarité croissante (Diallo *et al.*, 2004). Il s'agit pour les deux premiers de l'éther de pétrole et le dichloromethane, pour le solvant le plus polaire nous avons utilisé le méthanol.

250 g de poudre sèche (broyée de manière à ce que la surface de contact avec les solvants soit la plus grande possible et donc les rendements d'extraction soient les meilleurs possibles sans que le temps d'extraction soit trop long) est d'abord macérée dans 2 litres d'éther de pétrole. Après 24 heures d'agitation mécanique à température ambiante, le mélange est filtré et concentré au rotavapeur à la température de 30°C. Le marc a été repris avec deux litres de dichloromethane (conformément à la technique utilisée ci-dessus) ; puis avec deux litres de méthanol (fig.8). Les extraits réalisés sont ensuite stockés à température ambiante, à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation. Les rendements de chaque extraction sont indiqués dans le chapitre des résultats.

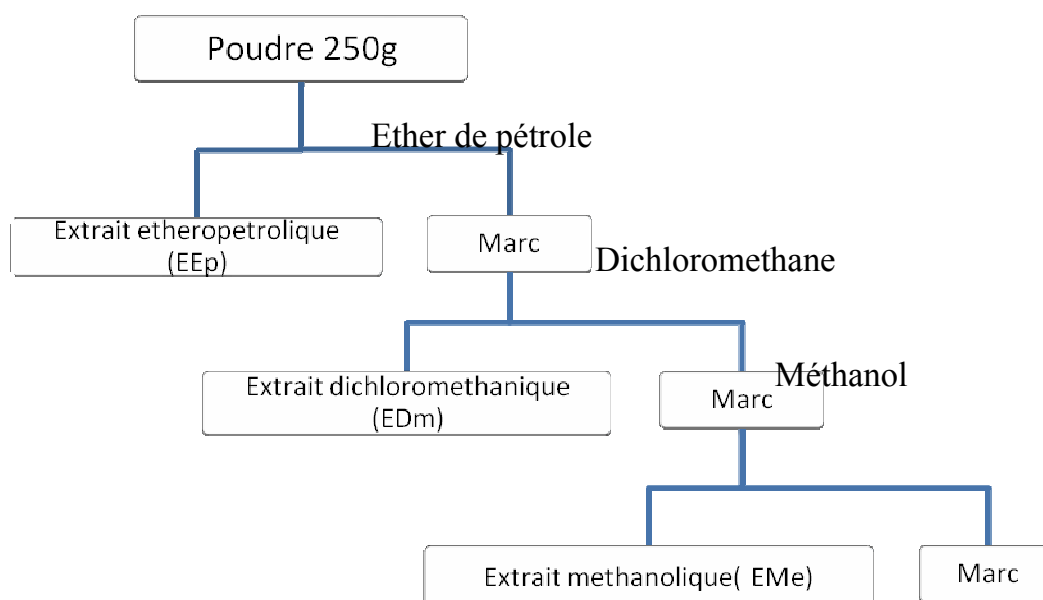


Figure 8. Schéma d'extraction par épuisement successif par les solvants organiques.

IV.2.6. Réactions de caractérisation

Les essais chimiques de caractérisation ont porté sur la recherche dans les différents extraits des principaux groupes chimiques. Ces essais permettent d'avoir des informations préliminaires sur la composition chimique, ces caractérisations ont été faites en utilisant principalement les réactions en tube, les résultats sont classés en :

- Réaction franchement positive + + + +
- Réaction positive + + +
- Réaction louche +/-
- Réaction négative 0

IV.2.6.1. Recherche des alcaloïdes

Elle est effectuée sur des réactions de précipitation avec les révélateurs généraux des alcaloïdes : le réactif de Mayer et le réactif de Dragendorff (Dohou, 2003). Dans deux tubes à essai nous avons introduit 1 ml de l'extrait ensuite, nous avons ajouté au premier, 5 gouttes de réactif de Mayer et au second, 5 gouttes de réactif de Dragendorff.

Un troisième tube servant de témoin contient 1 ml de caféine 0.02% et 5 gouttes de réactif de Dragendorff. En présence d'alcaloïdes, il ya formation d'un précipité,

- blanc-jaunâtre dans le premier tube.
- orange dans le deuxième tube.
- orange abondant dans le tube témoin.

IV.2.6.2. Recherche des composés phénoliques

IV.2.6.2.1. Flavonoïdes

Le test consiste à ajouter à 1ml d'extrait méthanolique quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré (HCL) et 0.5g de magnésium (Mg). On laisse agir 3 minutes. Une coloration orange ou rouge implique la présence des flavonoïdes (Karumi et *al.*, 2004).

IV.2.6.2.2. Tanins

1.5 g d'extrait sont placés dans 10ml de méthanol, après 15 mn d'agitation, les extraits sont filtrés et mis dans des tubes. L'ajout de trichlorure de fer(FeCl_3) 1% permet de détecter la présence ou non de tanins. La couleur vire au brun noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables) et au bleu verdâtre en présence de tanins catechiques (tanins condensés) (Dohou, 2003).

IV.2.6.2.3. Coumarines

5ml d'extrait étheré obtenu après une macération de 24 heures sont évaporés à l'air libre, puis repris avec 2 ml d'eau chaude. La solution est partagée entre deux tubes à essai. La présence de coumarines est révélée après ajout dans l'un des tubes de 0.5ml de NH_4OH à 25% et observation de la fluorescence sous une lampe UV à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté l'ammoniaque indique la présence de coumarines (Ciulei, 1982).

IV.2.7. Analyse chromatographique

IV.2.7.1. Chromatographie sur couches minces (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. La phase stationnaire est constituée d'une couche mince et uniforme de 0,25mm d'épaisseur, d'une substance séchée et finement pulvérisée, appliquée sur un support approprié ; dans notre cas, nous avons utilisé des plaques de gel de silice 60 F254 (phase normale) prêtent à l'emploi à support en aluminium, La phase mobile ou éluant (généralement un mélange binaire ou ternaire de solvant) migre à la surface de la plaque par capillarité.

La CCM n'est pas suffisante pour identifier un produit mais elle apporte des renseignements susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures, Par exemple: fluorescence, coloration, Rapport frontal (R_f) (Villars, 1971).

❖ Technique

Nous avons fait dissoudre 10 mg de l'EAQ dans 1 ml d'eau distillée par contre les extraits EEp, EDm et EMe ont été respectivement dissous dans 1ml d'éther de pétrole, 1ml de dichloromethane et 1ml de méthanol. À l'aide d'une micropipette, nous avons déposé 10µl de chaque solution et 5 µl de chaque standard (1 mg/ml dans le méthanol) sur les plaques. Ces plaques sont ensuite placées dans des cuves conventionnelles en verre, remplies à environ 0.5 cm avec une phase mobile, dans notre cas, les systèmes de solvants utilisés sont les suivants :

- Extrait EEp et EDm: hexane/ether diethylique (1 :1).
- Extrait EAQ et EMe : Butanol/acide acétique/eau (60 :15 :35) (Diallo et *al.*, 2004).

Ces compositions ne sont bien sur qu'indicatives et sont souvent adaptées aux besoins spécifiques d'une analyse.

Après développement, les plaques sont observées à l'extinction de la fluorescence à 366 nm et après révélation par des réactifs chimiques en solution (réactif à la vanilline sulfurique) afin de mettre en évidence des constituants ou classes de constituants présents dans les extraits bruts (Villars, 1971 ; Ciulei, 1982). On détermine alors, pour chaque constituant, le rapport frontal (Rf) :

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant (centre de la tache)}}{\text{Distance parcourue par l'eluant}}$$

IV.2.7.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Cette chromatographie fait intervenir deux variables dans la séparation d'un mélange, soit la phase stationnaire (la colonne), et la phase mobile (le ou les solvants). Les interactions entre notre mélange, les particules de la colonne et les solvants employés vont permettre une séparation qui pourra être optimisée en faisant varier surtout la composition de notre phase mobile. Cette dernière est poussée avec pression (pompe) sur la colonne, entraînant le mélange à séparer, et c'est cette pression qui permet de faire passer le solvant à travers de très petites particules à une vitesse raisonnable, ce qui permet d'obtenir une haute résolution. (Jean, 1992).

L'immense avantage de la CLHP par rapport à la chromatographie sur couches minces réside dans l'amélioration sensible des paramètres de seuil de détection et de résolution de séparation, ainsi que dans les possibilités d'automatisation du procédé (Ferrari, 2002).

La phase stationnaire était constituée d'une colonne gel de silice modifiée chimiquement par greffage de résidus octadécylique (C18) (Phase inversée) de 125 mm par 4.6 mm. Après essai de plusieurs systèmes de solvants, la séparation des constituants des extraits fut faite, en utilisant un mélange ternaire de solvants (phase mobile), en mode isocratique, soit eau/méthanol/acide

acétique (50 :47 :2.5,V/V/V) (Amarowicz et *al.*, 2005). Les extraits analysés sont à des concentrations de 0.5 mg/ml pour les extraits EMe et EAq, et 2 mg/ml pour les extraits EEp et EDm, pour un volume injecté de 20µl.

Après chaque injection le système analytique était rincé 30 minutes avec la phase mobile pour s'assurer de déloger les produits qui auraient pu demeurer sur la colonne. Une ligne de base exempte de pics était la condition préalable à toute injection. Pour toutes les analyses, les solvants utilisés sont de qualité CLHP, le débit est réglé à 1 ml/min, la détection a été effectuée par un détecteur UV-Visible et les longueurs d'onde de mesure fixées à 254 nm.

L'identification des produits sur les chromatogrammes a été faite par comparaison des temps de rétention avec ceux des standards.

IV.2.8. Dosage spectrophotométrique

IV.2.8.1. Estimation quantitative des polyphénols totaux

La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li et *al.*, 2007). Elle consiste à prendre un volume de 200 µl de l'extrait, un volume de 1 ml du réactif Folin-Ciocalteu (dilué dix fois) était ajouté. Après 4 mn, un volume de 800µl de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) (75mg/ml % dans l'eau distillée) a été versé sur la solution. Les tubes ont été placés à l'obscurité. Après les deux heures, les résultats étaient lus sur spectrophotomètre à 765 nm, la concentration des polyphénols totaux est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0-200µg /ml).

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg).

IV.2.8.2. Estimation quantitative des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Bahorun et *al.*, 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits ; 1ml de chaque extrait (avec dilution convenable) est ajouté à 1ml d'une solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10mn de réaction, l'absorbance est lue à 430nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercetine (0-40µg/ml).

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercetine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).

IV.2.8.3. Estimation quantitative des Tanins condensés

Le dosage des tanins condensés est réalisé selon la méthode au trichlorure de fer (FeCl_3) (Heimler et *al.*, 2006); 400µl de chaque extrait, est ajouté à 3 ml d'une solution méthanolique à 4% de vanilline, ensuite on a ajouté 1.5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Après 15 mn de

réaction, l'absorbance est lue à 550nm. La concentration des tanins condensés est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (0-300µg/ml).

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/mg).

IV.2.9. Tests biologiques

IV.2.9.1. Evaluation, *in vitro*, de l'activité antioxydante

IV.2.9.1.1. Test de blanchissement du β-carotène (Kartal et al., 2007)

- Principe

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β carotène.

- Mode opératoire

Une solution du β carotène (2 mg/1ml de chloroforme) est introduite dans un ballon contenant 25µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Le chloroforme a été complètement évaporé, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène a été ajouté au mélange précédant, l'émulsion précédente est rigoureusement agitée. Des solutions méthanoliques contenant 2mg de chaque extrait et 2 mg d'un antioxydant standard, hydroxy toluène butylé (BHT) ont été ajoutés à une série de tube contenant 350 µl de l'émulsion préparée, juste après l'addition, l'absorbance de temps zéro à 490 a été enregistré pour l'antioxydant de référence (BHT). Les extraits ont été maintenus à l'obscurité et leurs valeurs d'absorbance ont été lues à des intervalles de temps réguliers pendant 48h. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

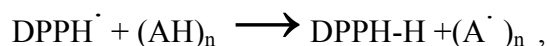
$$\text{AAR} = \text{Absorbance}_{t=48h}(\text{échantillon}) / \text{absorbance}_{t=48h}(\text{BHT}) \times 100.$$

IV.2.9.1.2. Test au DPPH (Mansouri, et al., 2005)

- Principe

Le Diphenyle picryl-hydrazyle (DPPH), un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphenyle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des

antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Sanchez-Moreno, 2002). On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où $(\text{AH})_n$ représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en Diphényle picryl hydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

▪ Mode opératoire

Un volume de 50µl de chaque extrait (reconstitué selon la concentration voulue) est incubé (30mn) avec 1.95 ml d'une solution méthanolique de DPPH (2.4mg/ 100ml de méthanol). Les absorbances à 517 nm ont été enregistrées.

Les résultats obtenus pour chaque extrait testé sont comparés à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant standard. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

Dans ce test on définit deux paramètres (Prakash et al., 2007):

- La concentration effective à 50%, $\text{EC}_{50} = \text{IC}_{50} / \text{mg de DPPH/ml}$.
- Le pouvoir antiradicalaire, $\text{APR} = 1 / \text{EC}_{50}$.

Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0 à 0.8 mg/ml, 0 à 0.9 mg/ml et 0 à 3.5 mg/ml pour l'EDm, l'EMe et l'EAq respectivement alors que celle du BHT est comprise entre 0 à 50 µg/ml.

IV.2.9.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de nos extraits la méthode de diffusion en milieu solide a été utilisée (Sacchetti et al., 2005 ; Celiktas et al., 2007).

- Préparation des extraits

L'EAq a été dissous dans de l'eau distillée tandis que l'EMe, l'EEp et l'EDm ont été dissous dans le Diméthyle Sulfoxyde (DMSO). Le screening antimicrobien a été effectué avec six concentrations pour chaque extrait ; (1g/ml, 1g/ 2ml, 1g/4 ml, 1g/10 ml, 1g/20 ml et 1g/50ml).

- Préparation des suspensions microbiennes

Les souches microbiennes utilisées sont : trois espèces bactériennes de référence (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922), quatre souches de *Salmonella* isolées à partir d'organes de volailles malades, *Salmonella typhimurium* (STB4), *Salmonella typhimurium* (ST54), *Salmonella typhimurium*,

(STC3), *Salmonella typhimurium* (ST1) et une espèce fongique (*Candida albicans*) issues à partir des prélèvements de malades (selles).

Une suspension de 24 h (37°C) (pour les souches bactérienne) et 48h (37° C) (pour la souche fongique) est préparée avec de l'eau distillée, diluée est ajustée à une concentration de 0.5 Mc Farland.

- Mise en test

Le test s'est déroulé en deux jours. Pendant le premier jour, La suspension a été coulée sur gélose Mueller Hinton (MH) pour les souches bactériennes et sur milieu Sabouraud pour l'espèce fongique, les tests ont été répétés 3 fois.

Des disques blancs de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 10µl de l'extrait préparé (reconstituée selon la concentration voulue) et placés dans des boîtes de Pétri. Chaque boîte a reçu 6 disques déposés sur un numéro d'identification apposé sur la face inférieure de la boîte. Un contrôle négatif a été fait avec des disques standards d'antibiotique. L'ensemble est incubé (24 h pour les espèces bactériennes et 48 h pour l'espèce fongique). Lors du deuxième jour, après l'incubation des zones ou des halos clair(es) sont présent(es) autour des disques si l'extrait inhibe la croissance microbienne, donc nous avons procédé à la mesure du diamètre des zones d'inhibition de croissance microbienne.

IV.3. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne $\pm$ SD.

La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test d'ANOVA univariée suivie du test de Dunnet / Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives.

Les valeurs de la concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration].

Chapitre 5

Résultats et Discussion

Ce chapitre présente tous les résultats obtenus au cours des expériences effectuées ainsi que leurs interprétations et discussions.

V.1. Détermination de la teneur en eau, en cendres totales et en substances extractibles par l'eau et par l'éthanol

Tableau 4. Teneur en eau, en cendres totales et en substances extractibles par l'eau et par L'éthanol.

Paramètres	Teneur (%)
	Moyenne $\pm$ Ecart type
Eau.	76.45 $\pm$ 0.78
Cendres totales.	7.25 $\pm$ 0.1
Substances extractibles par l'eau.	47
Substances extractibles par l'éthanol.	38

La pulpe de *Crataegus monogyna* renferme un taux d'humidité de 76.45%, une valeur proche à celle rapportée par Couplan (1998), soit 72%. C'est à ce titre que les chinois récoltent l'aubépine et le transforme en jus dont la valeur alimentaire est la même que celle du fruit (Espiard, 2002).

L'essai des cendres totales permet d'informer sur la teneur en minéraux, ces derniers n'étant pas transformés en substances volatiles à haute température, contrairement aux matières organiques. La teneur en cendres totales a été évaluée à 7.25%, elle représente la fraction minérale du fruit, cependant elle est assez élevée par rapport à celle trouvée par Herrera (1984), soit une valeur de 4.3% de matière sèche. Cette variation est probablement due à plusieurs facteurs à savoir la composition du sol, facteurs climatiques et même origine géographique.

Le taux des substances extractibles par l'eau est supérieur à celui de l'éthanol (47% *versus* 38%)

V.2. Extractions

Les extraits organiques (EEp, EDm et EMe) ont été obtenus par la méthode de macération successive par des solvants à polarité croissante, l'extrait aqueux (EAq) a été obtenu par une macération dans de l'eau distillée.

Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur et son rendement, ces éléments sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Masse, rendement et couleur des extraits obtenus.

Extraits	Masse (g)	Rendement%	Couleur
----------	-----------	------------	---------

		Par rapport au poids du broyat	
EEp	1.57	0.62	Jaunâtre
EDm	0.46	0.18	Verdâtre
EMe	100	40	Marron
EAq	15	6	Orange

Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec rendu en poudre, les résultats ont été exprimés en pourcentage (P/P).

D'après nos résultats, Le rendement le plus élevé a été obtenu avec l'EMe, soit 40% tandis que le plus faible est celui de l'EDm, soit 0.18%. Toutefois, il est difficile de comparer les résultats du rendement avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, ainsi qu'à l'origine géographique du fruit.

Tableau 6. Les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés (Ciulei, 1981 ; Newman et *al.*, 1997)

Extraits	Constituants probables
EEp	Lipides, stérols, triterpènes, caroténoïdes, huile essentielle, coumarines flavonoïdes aglycones.
EDm	Flavonoïdes aglycones, coumarines, Terpenes.
EMe	Flavonoïdes glycosylés, tanins, composés réducteurs.
EAq	Flavonoïdes glycosylés, tanins.

V.3. Réactions de caractérisation

Elles mettent en œuvre des réactions en tube soit par précipitation soit par coloration.

Tableau 7. Résultats des réactions en tubes sur les extraits préparés.

Extraits Metabolites	EEp	EDm	EMe	EAq
Flavonoïdes	+/-	+++	+++	+++
Tanins catéchiques (condensés)	0	+++	+++	+++

Tanins gallique (hydrolysables)	0	0	0	0
Alcaloïdes	0	0	0	0
Coumarines	+	0	0	0

++++ Réaction franchement positive.

+++ Réaction positive.

+/- Réaction louche.

0 Réaction négative.

Ces réactions nous ont permis de caractériser dans les extraits certaines substances chimiques. Sur l'ensemble de nos résultats, celles des flavonoïdes a été la plus franche, par contre les alcaloïdes ont été absents dans tous les extraits testés.

V.4. Analyse chromatographique

V.4.1. Chromatographie sur couches minces (CCM)

Le système hexane / éther diéthylique (1 :1) a été utilisé comme phase mobile pour les extraits EEp et EDm, alors que pour les extraits EMe et EAq nous avons utilisé le BAW : butanol- acide acétique- eau (60 :15 :35).

Tableau 8. Rapports frontaux(Rfs) des spots issus de la séparation des extraits EEp et EDm dans le système hexane/éther diéthylique (1 :1)

Extraits	Révélation			
	Vanilline sulfurique		UV 366 nm	
	Spots	Rfs	Spots	Rfs
EEp	Marron	Ligne de depot	Jaune	0.13
	Vert	0.30	Rouge	0.3
	Rose	0.35	Bleu	0.47
	Marron	0.48	fluorescent	
	Marron	0.57		
	jaune	0.93	Marron	0.93
EDm	Marron	Ligne de depot	Jaune	0.08
	Marron	0.04	Rouge	0.38
	Rose	0.08	Jaune	0.51
	Violet	0.38		
	Marron	0.51		
	Gris	0.80		
	violet	0.97		

En utilisant ce système de migration les témoins (quercetine, rutine, catéchine, esculine, acide gallique, acide ellagique) n'ont pas migré sauf la quercetine (Rf: 0.04), cette dernière est probablement présente dans l'EDm. La différence de couleur peut être expliquée par le fait qu'un composé, présent dans un mélange complexe (extrait), acquière des propriétés différentes de celles du même composé pur.

L'EEp et l'EDm contiennent 4 et 3 substances UV actives respectivement.

Le spot bleu fluorescent observé sous UV 366nm dans l'extrait EEp pourrait être des triterpènes (Wagner et Bladt, 1996). Garcia et ses collaborateurs (1997) ont pu isoler trois triterpènes ; butyrospermol, 2-4 méthyllen-2-4 dihydrolanostol, et le cycloartenol. Les spots roses observés dans l'EEp et l'EDm pourraient être des coumarines tricycliques (Giguere, 2001).

Figure 9. Chromatographie sur couche mince des extraits EEp et EDm (révélation à la vanilline sulfurique). 1, catechine ; 2, quercetine ; 3, rutine ; 4, esculine ; 5, acide gallique ; 6, acide elagique

Tableau 9. Rapports frontaux(Rfs) des extraits EMe et EAq dans le système BAW (60 :15 :35).

Extrait	Révélation			
	Vanilline sulfurique		UV 366 nm	
	Spots	Rfs	Spots	Rfs
EMe	Marron	0.12	Gris	0.53
	Marron	0.34	Gris	0.56
	Jaune	0.68	Gris	0.68
	Rouge	0.80	Gris	0.80
	Gris	0.84	Gris	0.84
EAq	Gris	0.34	Gris	0.34

Tableau 10. Rapports frontaux des témoins dans le système BAW (60 :15 :35).

Révélation

Temoins	Vanilline sulfurique		UV 366 nm	
	Spots	Rfs	Spots	Rfs
Catéchine	Rouge	0.83	Gris	0.83
Quercetine	Jaune	0.79	Gris	0.79
Rutine	Jaune	0.58	Gris	0.58
Esculine	-	-	fluorescent	0.31
Acide gallique	Bleu clair	0.86	Gris	0.86
Acide elagique	-	-	Gris	0.6

Après observation sous UV et comparaison des Rfs des spots avec ceux des témoins utilisés, on constate que les Rfs des spots issus de l'EMe et le spot unique issu de l'EAQ ne correspondent à aucun Rf des témoins.

Selon Paris et Moyse (1976), dans le system BAW, les spots dont les Rfs sont inférieurs à 0.5 pourrait être des flavonoïdes.

Figure 10. Chromatographie sur couche mince des extraits EMe et EAQ (révélation à la vanilline sulfurique). 1, catechine ; 2, quercetine ; 3, rutine ; 4, esculine ; 5, acide gallique ; 6, acide elagique.

V.4.2 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Les extraits aqueux et organiques de *Crataegus monogyna* ont été analysés par CLHP, afin de comparer leurs profils chromatographiques avec ceux des standards et d'obtenir une information sur la nature chimique des constituants.

La phase mobile utilisée pour analyser qualitativement nos extraits, est un mélange ternaire de solvant, en mode isocratique, soit eau/méthanol/acide acétique (50 :47 :2.5, v/v/v). La quercetine, la rutine et la catéchine ont été utilisé comme témoins. Les temps de rétention des pics obtenus pour les témoins et ceux des extraits sont reportés dans les tableaux 11 et 12 respectivement.

Tableau 11. Temps de rétention des témoins.

Témoins	Temps de rétention
Quercetine	1.81
Catechine	2.05
Rutine	3.45

Tableau 12. Temps de rétention des pics issus des extraits.

Extraits	N° pic	Temps de retention (Tr).
EEp	1	1.71
EDm	1	1.81
	2	2.16
	3	2.30
	4	2.91
	5	3.15
	6	5.59
	7	6.08
EMe	1	1.69
	2	2.06
	3	2.86
	4	3.15
	5	3.96
EAq	1	1.80
	2	2.10
	3	2.66
	4	2.98
	5	3.36
	6	3.74
	7	4.08
	8	4.67
	9	5.12

Les chromatogrammes des témoins quercetine, rutine et catéchine sont représentés dans les figures 11, 12 et 13 respectivement.

Les profils chromatographiques des extraits EAq, EMe, EDm et EEp sont représentés dans les figures 14, 15, 16 et 17 respectivement.

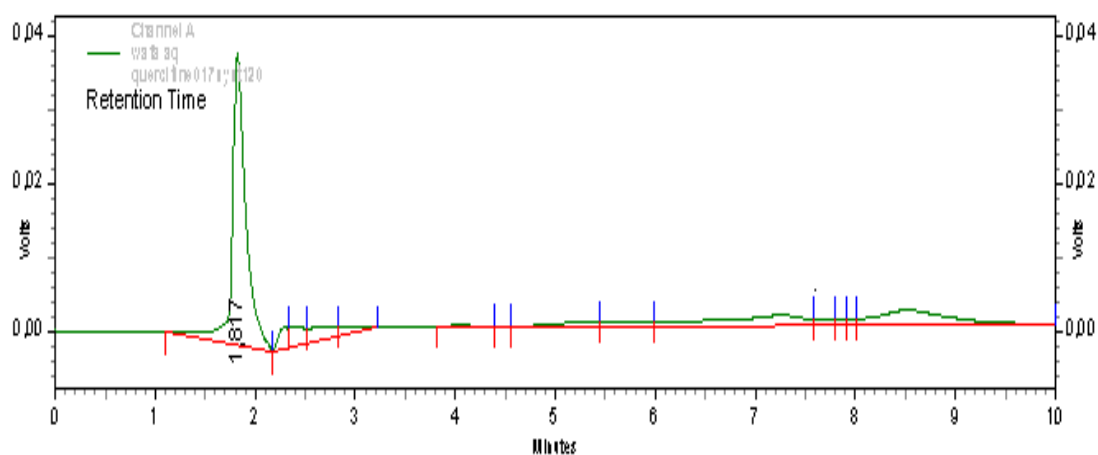


Figure 11.Chromatogramme de la quercetine.

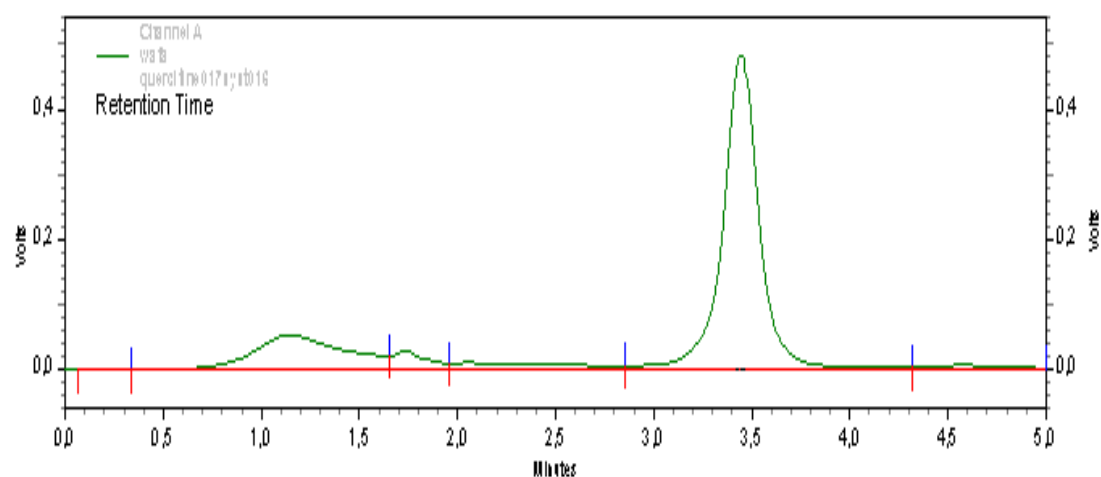


Figure 12. Chromatogramme de la rutine.

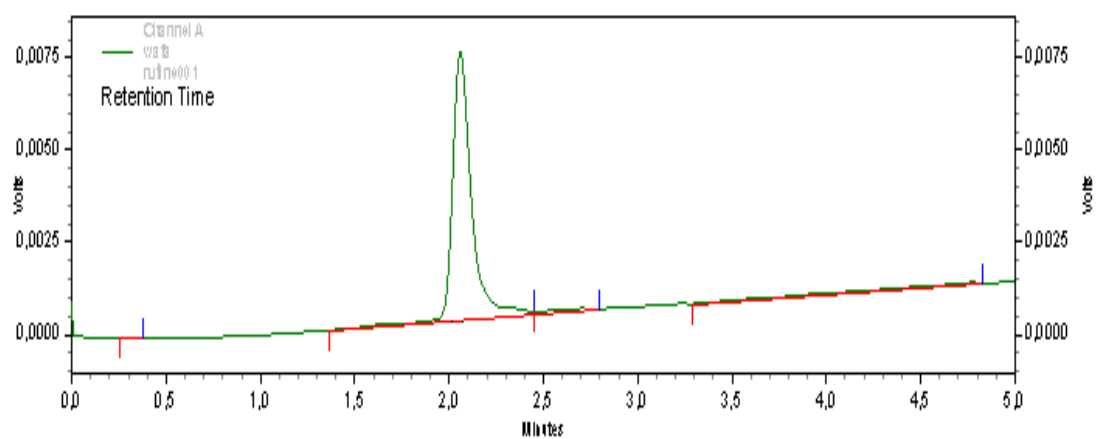


Figure 13. Chromatogramme de la Catéchine.

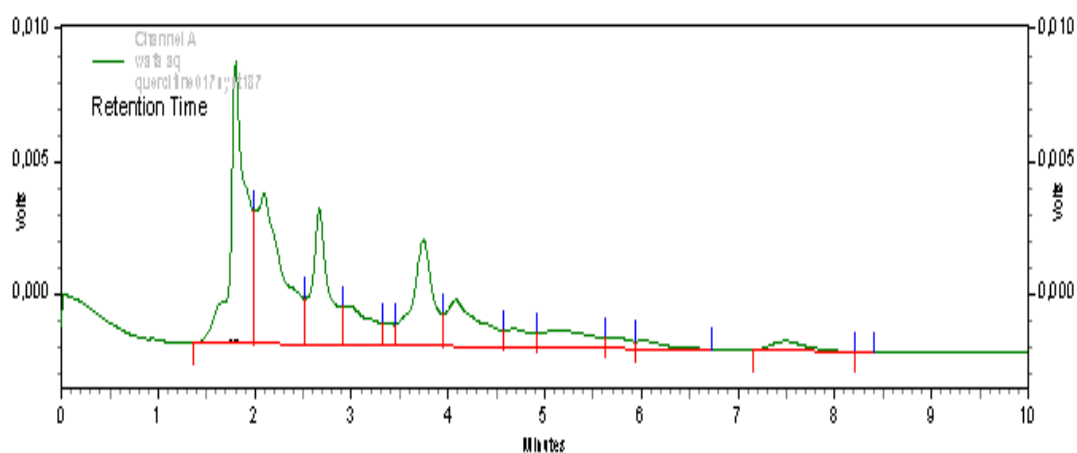


Figure 14. Profil chromatographique de l'EAQ.

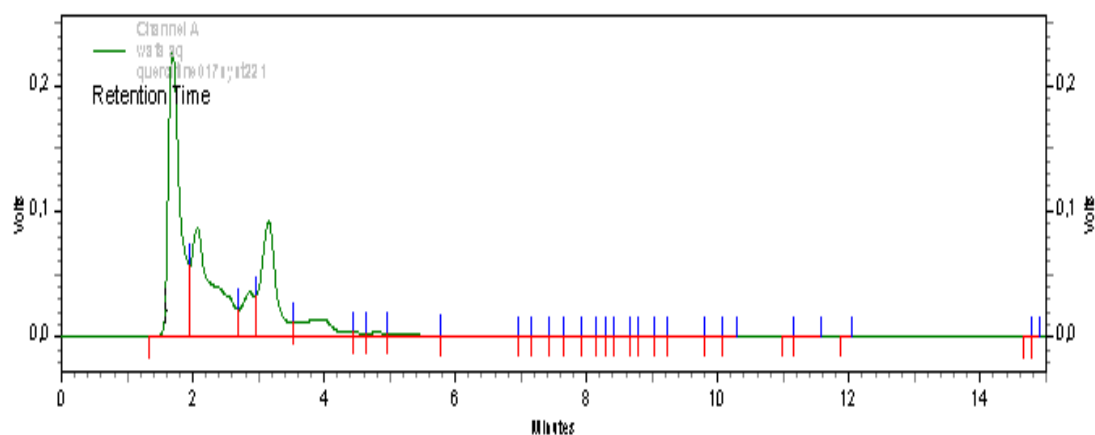
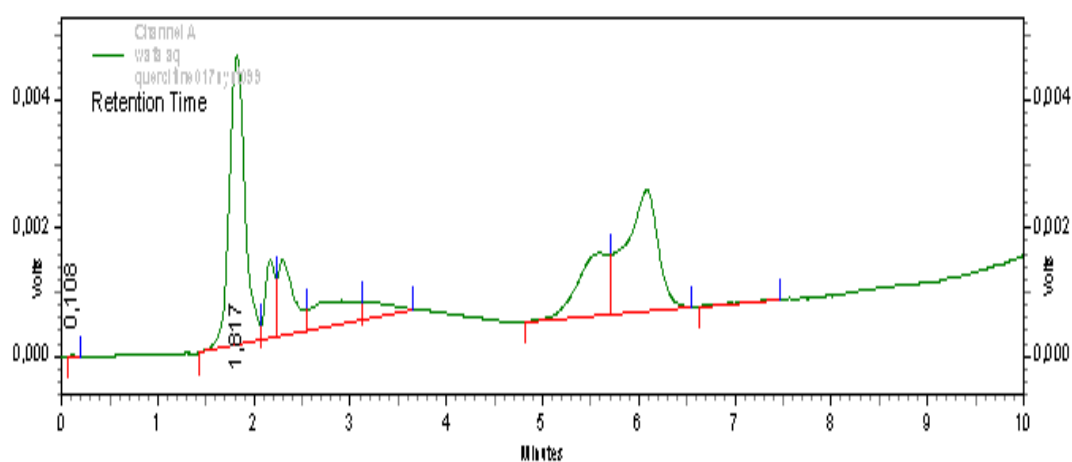


Figure 15.

Profil chromatographique de l'EMe



Figure

16. Profil chromatographique de l'EDm.

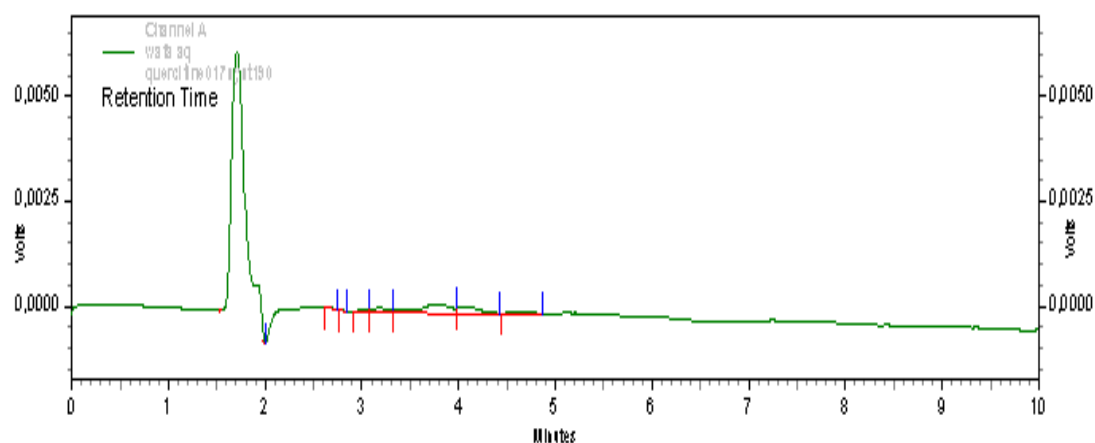


Figure 17. Profil chromatographique de l'EEp.

Après comparaison des temps de rétention des témoins avec ceux des extraits on constate que L'EDm semble contenir la quercetine (Temps de rétention : 1.81). Par contre la rutine et la catéchine ont été absentes dans tous les extraits analysés. Ce résultat est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature.

V.5. Dosage spectrophotométrique

V.5.1. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été réalisée en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (Li et al., 2007), l'acide gallique a été utilisé comme standard.

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996), la quercétine a été utilisée comme standard.

La méthode au trichlorure de fer (Heimler et al., 2006) a été utilisée pour quantifier les tanins condensés dans nos extraits, la catéchine a été utilisée comme standard.

Les résultats du dosage sont représentés dans le tableau 13, et les gammes d'étalonnages dans les figures 18, 19 et 20.

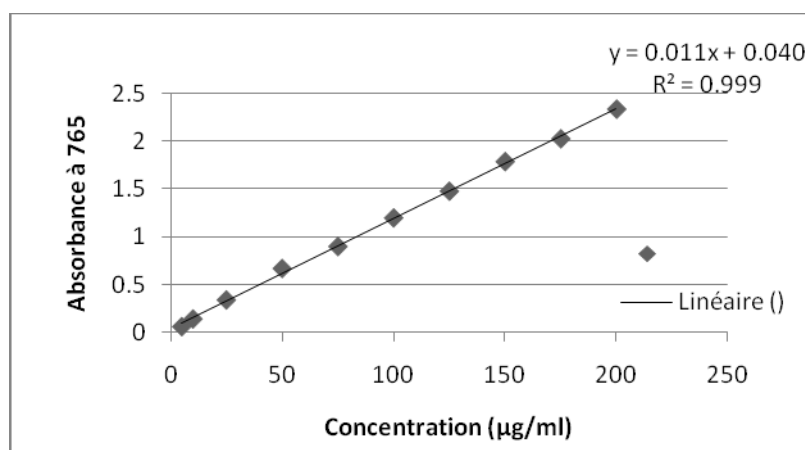


Figure 18. Droite d'étalonnages de l'acide gallique (moyenne $\pm$ SD de trois essais).

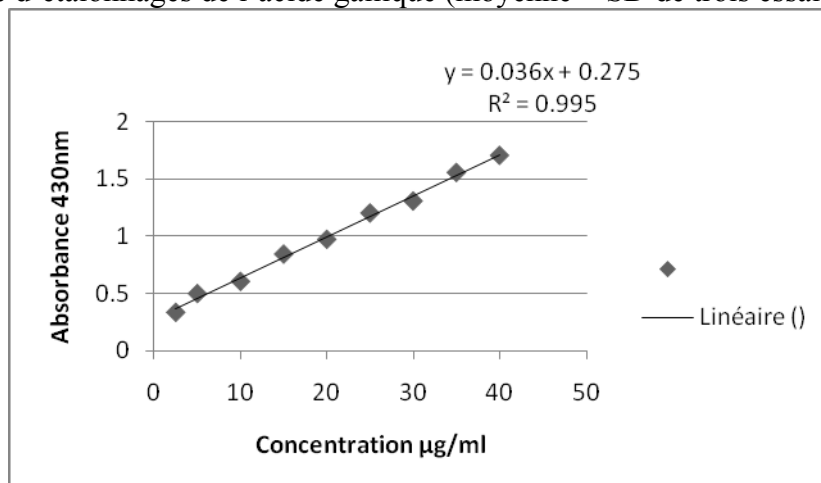


Figure 19. Droite d'étalonnages de la quercétine (moyenne $\pm$ SD de trois essais).

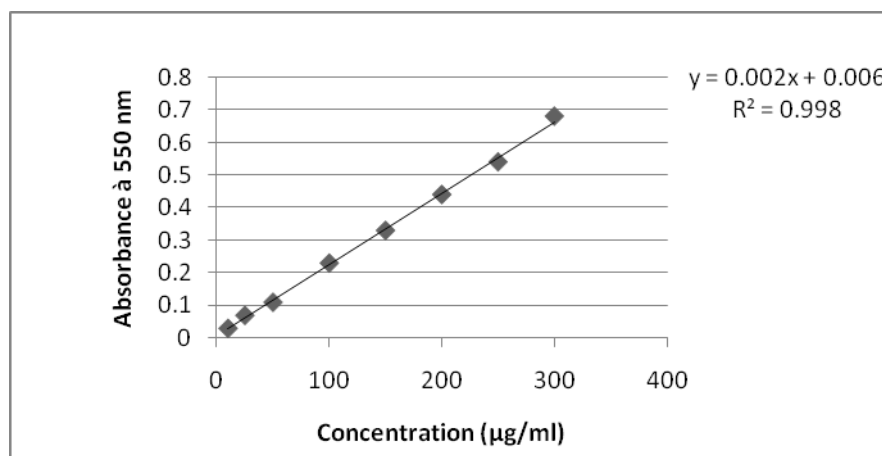


Figure 20. Droite d'étalonnages de la catéchine (moyenne $\pm$ SD de trois essais).

Tableau 13. Résultats du dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés dans les extraits de *Crataegus monogyna*.

Extraits	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)	Tanins ^(c)
EEp	04.33 $\pm$ 0.24	0.11 $\pm$ 0.1	0.0
EDm	17.87 $\pm$ 2.22	2.1 $\pm$ 0.10	0.5 $\pm$ 0.35
EMe	21.72 $\pm$ 6.10	3.2 $\pm$ 0.02	2.1 $\pm$ 0.01
EAq	11.61 $\pm$ 0.51	1.45 $\pm$ 0.06	0.3 $\pm$ 0.1

(a) μ g d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

(b) μ g d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (μ g EQ/mg d'extrait)

(c) μ g d'équivalent de catéchine par mg d'extrait (μ g EC/mg d'extrait).

Les résultats du dosage des polyphénols totaux révèlent que l'EMe est le plus riche en composés phénoliques (21.72 $\pm$ 6.10 μ g EAG/mg d'extrait), suivi par l'EDm (17.87 $\pm$ 2.22 μ g EAG/mg d'extrait), l'EAq renferme (11.61 $\pm$ 0.51 μ g EAG/mg d'extrait), tandis que l'EEp ne contient que (4.33 $\pm$ 0.24 μ g EAG/mg d'extrait).

L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'aluminium montre que l'EMe (3.2 $\pm$ 0.02 μ g EQ/mg d'extrait) et l'EDm (2.1 $\pm$ 0.10 μ g EQ/mg d'extrait) sont les plus riches en flavonoïdes, par la suite vient l'EAq (1.45 $\pm$ 0.06 μ g EQ/mg d'extrait) suivi par l'EEp (0.11 $\pm$ 0.1 μ g EQ/mg d'extrait).

Le dosage des tanins condensés montre que la teneur la plus élevée est celle de l'EMe (2.1 $\pm$ 0.01 μ g EC/mg d'extrait) suivie par l'EDm (0.5 $\pm$ 0.35 μ g EC/mg d'extrait) et l'EAq (0.3 $\pm$ 0.1 μ g EC/mg d'extrait).

L'examen de ces résultats permet de mettre une corrélation linéaire non significative entre la teneur en flavonoïdes et en composés phénoliques ($r^2=0.87$, $P\leq 0.05$), et entre la teneur en tanins et en composés phénoliques ($r^2=0.65$, $P\leq 0.05$).

Si on compare les résultats du dosage avec ceux de la bibliographie, on constate que la teneur en polyphénols de l'EMe (21.72 EAG/mg) est bien supérieure par rapport à celle trouvée par Yoo et ses collaborateurs (2008), soit 8.17 µg EAG/mg, tandis que les teneurs en flavonoïdes se rapprochent (3.2 EQ/mg versus 4.07 EC/mg pour l'extrait éthanolique brute des feuilles de *Crataegus pinnatifida*)

Toute fois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques, des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que des facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols (Aganga, 2001 ; Pedneault et *al.*, 2001 ; Fiorucci, 2006).

V.6. Tests biologiques

On a dépisté l'activité antioxydante (test au DPPH et le test de blanchissement du β carotène) et l'activité antimicrobienne (par la méthode de diffusion en milieu solide) de tous les extraits préparés (EEp, EDm, EMe et EAq).

Il est nécessaire de préciser qu'un résultat observé lors de l'évaluation d'un extrait brut ou d'une fraction enrichie est la composante de deux paramètres : l'activité intrinsèque d'un produit, d'une part, et d'autre part, sa quantité relative dans l'extrait. Ainsi, l'activité marquée d'un extrait peut tout aussi bien provenir d'une faible quantité de constituants très actifs, que d'une grande quantité de constituants peu actifs. De plus, il se peut qu'une activité observée résulte de la somme d'activités de plusieurs constituants (Cavin, 2007 ; Sokol-Letowska et *al.*, 2007).

V.6.1. Evaluation de l'activité antioxydante

V.6.1.1. Test de blanchissement du β carotène.

Dans ce test, la capacité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β carotène (disparition de sa couleur) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Kartal et *al* (2007).

La cinétique de blanchissement du β carotène en absence et en présence des extraits de *Crataegus monogyna*, de l'antioxydant standard (BHT) et les activités antioxydantes relatives (AAR) sont représentées dans les figures 21 et 22.

D'après les résultats, on constate que le BHT et tous les extraits testés inhibent d'une manière significative ($p \leq 0.05$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène par rapport au contrôle négatif (l'extrait est remplacé par le méthanol) qui représente 100% de la peroxydation.

L'EDm montre la plus grande activité inhibitrice avec une AAR estimé à 48.46%, mais cette valeur d'activité reste significativement inférieure ($p \leq 0.001$) à celle du contrôle positif(BHT) qui représente 100% d'activité inhibitrice.

L'EMe montre une AAR estimée à (36.40%) suivi par l'EEp (24.59%) qui est statistiquement supérieure à celle de l'EAq. Ce dernier représente l'extrait le moins actif (16.7%).

En comparaison avec l'antioxydant de référence (BHT) on peut conclure que ;

- L'EDm est 2.06 fois moins actif que le BHT.
- L'EMe est 2.74 fois moins actif que le BHT.
- L'EEp est 4.06 fois moins actif que le BHT.
- L'EAq est 5.98 fois moins actif que le BHT.

Pour notre cas, l'EAq a été lyophilisé, ce conditionnement pourrait influencer sur l'activité antioxydante (Lievre, 2004 ; Klervi, 2005).

L'activité antioxydante de l'EDm est statistiquement supérieure à celle de l'EMe ($p \leq 0.001$), il existe probablement des différences qualitatives dans la nature des composés phénoliques (qui entre dans la composition des extraits) influençant le pouvoir antioxydant des extraits. Les flavonoïdes glycosylés (EMe) ont une activité antioxydante inférieure à celle des flavonoïdes non glycosylés (EDm). Par exemple la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine (Marfak, 2003, Sokol-Letowska, 2007)

L'EEp renferme la teneur la plus faible en polyphénols, en flavonoïdes, mais il possède une activité significativement supérieure ($P \leq 0.001$) à celle de l'EAq, ceci pourrait être du à la contribution des huiles essentielles ainsi qu'à d'autres composés apolaires. L'effet antioxydant des composés apolaires (acide gras et/ou phospholipides) pourrait être le résultat d'une action synergique (Fujimoto et Kanede, 1980) ; ce qui est confirmé par les travaux de Tutour et al (1998) qui ont montré chez plusieurs espèces de Fucalées tempérées que les composés apolaires (pigments apolaires, lipides neutres...) permettent d'augmenter l'action antioxydante de la vitamine E (Klervi, 2005).

Il est relativement difficile de comparer les résultats de ce test avec ceux de la littérature. En effet, il existe une assez grande variation dans le choix des solvants d'extraction et dans celle de la méthode de mesure de l'activité antioxydante.

Selon Frankel et Meyer (2000), le test de blanchissement du β carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, ces deux auteurs ont proposé que les antioxydants apolaires montrent des propriétés antioxydantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi la prévention de la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du β carotène.

Selon Liyana-Pathriana (2006), un extrait qui inhibe ou retarde le blanchissement du β carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire.

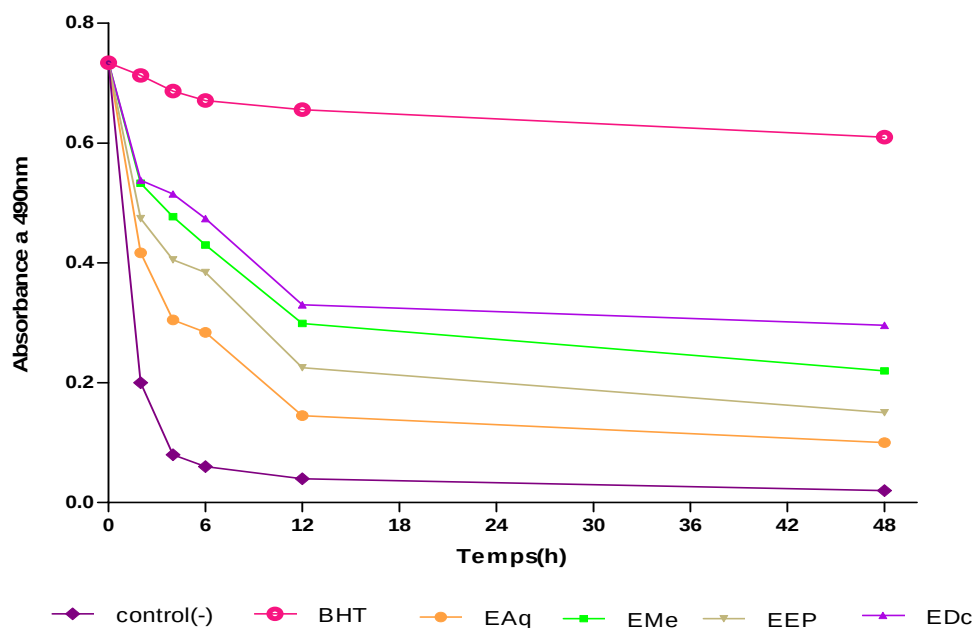


Figure 21. Cinétique de blanchissement du β carotène à 490nm en absence et en présence des extraits de *Crataegus monogyna* et du BHT. (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

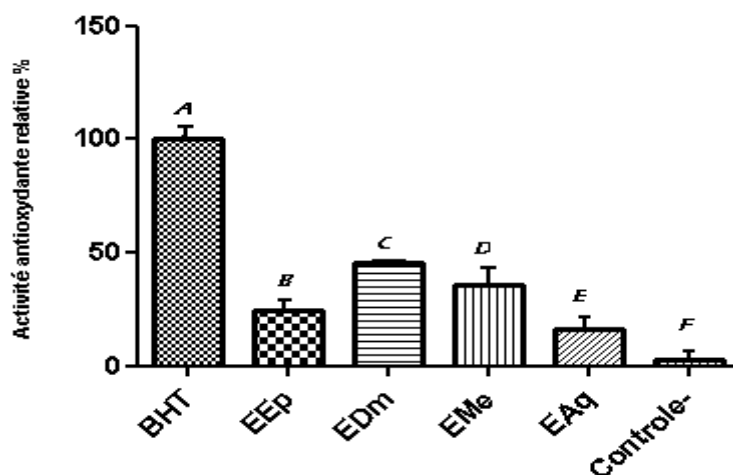


Figure 22. Activité antioxydante relative des extraits de *Crataegus monogyna* et du BHT dans le système β carotène/acide linoléique (les valeurs sont la moyenne de trois essais $\pm$ SD), les barres avec des lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ($p \leq 0.001$).

V.6.1.2. Test au DPPH

L'activité antiradicalaire des extraits de *Crataegus monogyna* vis-à-vis le radical DPPH a été évalué spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Les figures 23 et 24 représentent les profils de l'activité antiradicalaire obtenus pour les différents extraits de *Crataegus monogyna* et celui du BHT respectivement. Les IC₅₀, EC₅₀ et APR de chacun des extraits ont été déterminés.

Tableau 14. Activité antiradicalaire des extraits de *Crataegus monogyna* et du BHT.

	IC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ (µg/ml)	APR
BHT	4.47 ± 0.1	0.21 ± 0.04	4.76 ± 1.9
EEp	-	-	-
EDm	259.70 ± 1.23	11.80 ± 0.45	0.084 ± 0.003
EMe	331.85 ± 1.52	15.38 ± 1.47	0.065 ± 0.002
EAq	800 ± 1.48	36.36 ± 0.14	0.027 ± 0.002

Les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions ± SD.

L'activité antiradicalaire de l'EEp n'a pu être réellement quantifiée car aux concentrations maximales testées, il ne capte pas plus de 40 % du DPPH.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits EDm, EMe et EAq possèdent une activité dose dépendante.

La comparaison des extraits EMe, EDm et EAq révèle que l'EDm représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ de 259.70 µg/ml et un APR estimé à 0.084 suivi par l'EMe avec une IC₅₀ de l'ordre de 331.85 µg/ml et un APR de 0.065. L'EAq représente l'activité antiradicalaire la plus faible (IC₅₀ = 800 µg/ml, APR = 0.027), qui est 3 fois moins actif que l'EDm.

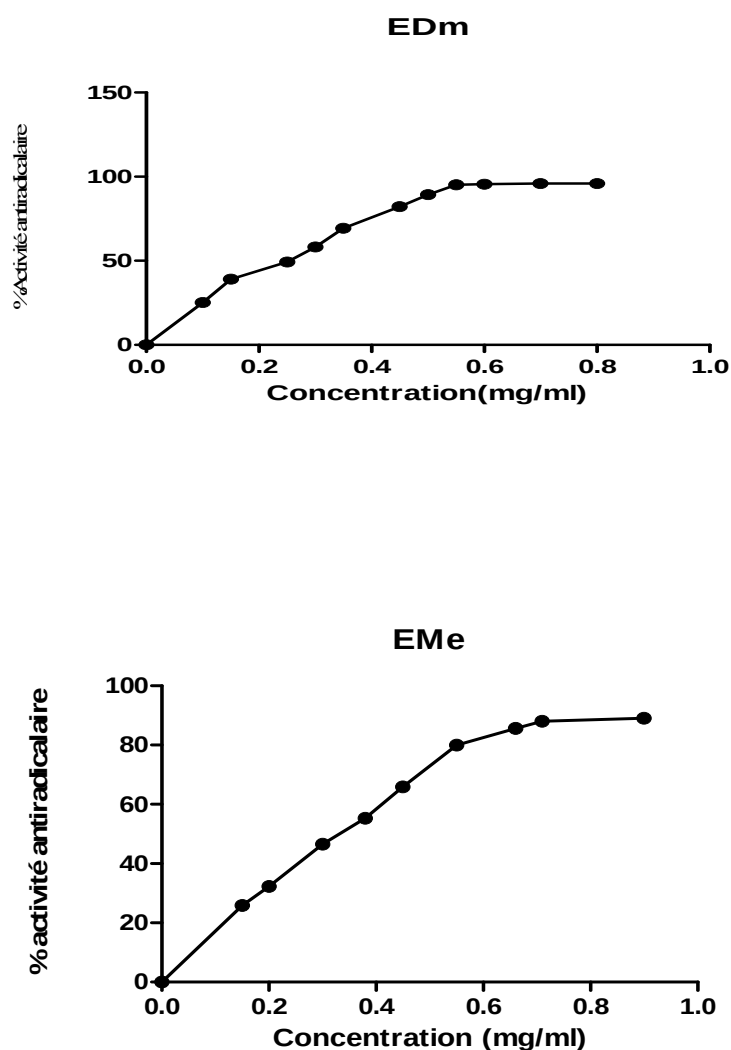
A des fins comparatives on a utilisé le BHT comme antioxydant standard, il a montré une activité antiradicalaire intéressante avec une IC₅₀ de l'ordre de 4.47µg/ml et une APR de l'ordre de 4.76. En comparaison avec le (BHT) tous les extraits testés s'avèrent moins actifs : l'EDm, l'EMe et l'EAq sont 56, 73 et 176 moins actifs que le BHT.

Les composés phénoliques semblent être des bons candidats pour leurs activités antioxydantes du fait de la présence de nombreux hydroxyles, pouvant réagir avec les radicaux libres (Klervi, 2005 ; Panovska, 2005 ; Sokol-Letowska, 2007). L'activité antiradicalaire des extraits EDm, EMe et EAq est probablement liée à leur contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins.

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacités antioxydantes, l'activité de ces molécules à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leur structures, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'-4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (Amic et *al.*, 2003 ; Marfak, 2003 ; Sokol-Letowska, 2007).

Selon Maataoui (2006), la capacité antioxydante des fruits de couleur pourpre semble être plus élevée que celle des fruits de couleur jaune – orange.

Yoo et ses collaborateurs (2008) montrent que *Crataegus pinnatifida* présente pour l'extrait éthanolique (des feuilles) une forte activité antiradicalaire (84.5%, test au DPPH). Il faut toute fois souligner qu'il ne s'agit ni de même solvant ni de même protocoles d'activité, de même la durée de conservation et la température pourrait expliquer l'écart observé entre nos résultats et ceux de la bibliographie (Klervi, 2005 ; Sokol-Letowska, 2007).



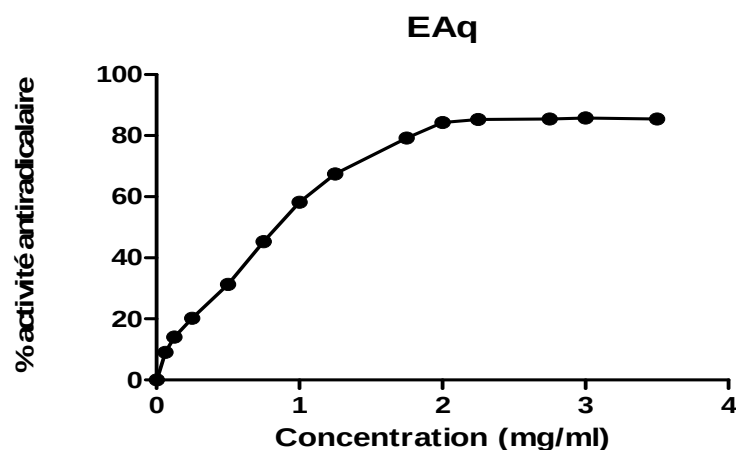


Figure 23. Activité antiradicalaire des extraits de *Crataegus monogyna* (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

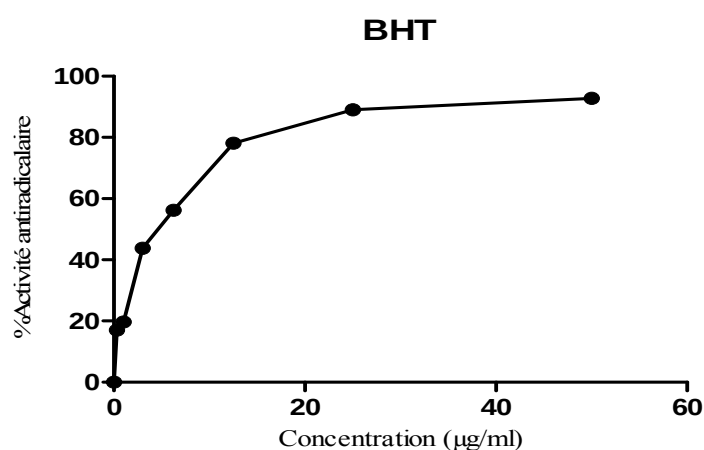


Figure 24. Activité antiradicalaire de l'antioxydant de référence (BHT) (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

V.6.2.Evaluation de l'activité antimicrobienne

Nous avons évalué l'activité antimicrobienne des extraits organiques et de l'extrait aqueux de *Crataegus monogyna* par la méthode de diffusion en milieu solide, cette activité a été révélée sur trois souches bactériennes de référence (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) , quatre souches bactériennes isolées à partir d'organes de volailles malades (*Salmonella typhimurium* (STB4), *Salmonella typhimurium* (ST54), *Salmonella typhimurium*, (STC3), *Salmonella typhimurium* (ST1) et une souche fongique (*Candida albicans*), issue à partir

des prélèvement de malades (selles), ensuite pour chaque disque nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes.

Nous avons réalisé un antibiogramme pour prédire la sensibilité des souches testées à un ou plusieurs antibiotiques (Joffin et Leyral., 2001) tableau 15.

Les résultats du screening antimicrobien des extraits EEp, EDm, EMe et EAq sont reportés dans les tableaux 16, 17, 18, 19 respectivement.

Tableau 15. Résultats de l'antibiogramme (Diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne).

Souches	Antibiotiques standards	Diamètres des zones d'inhibition de croissance (mm)
<i>Staphylococcus aureus.</i> ATCC25923 (Bactérie à Gram positif)	Penicilline	37
	Oxacilline	25
	Vancomycine	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (Bactérie à Gram négatif)	Imipenem	21
	Amikacine	21
	Fosfomycine	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (Bactérie à Gram négatif)	Ampicilline	22
	Cefoxitine	26
	Centamycine	25
<i>Salmonella typhimurium</i> (STB4) (Bactérie à Gram négatif)	Amoxicilline	09.11
	Fosfomycine	13.39
<i>Salmonella typhimurium</i> (ST54) (Bactérie à Gram négatif)	Ampicilline	0
	Cefoxitine	31
<i>Salmonella typhimurium</i> (STC) (Bactérie à Gram négatif)	Chloramphénicol	28
	Netilmicine	23

<i>Salmonella typhimurium</i> (ST1) (Bactérie à Gram négatif)	Amicacine	22
	Amoxicilline	23

Tableau 16. Activité antimicrobienne de l'EEp (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).

	Diamètres des zones d'inhibition de croissance microbienne *(mm)					
	Dilutions de l'EEp					
	1g/ml	1g/2ml	1g/4ml	1g/10	1g/20ml	1g/50ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13.01 ± 0.21	12.2 ± 0.26	11.15 ± 1.4	9.8±00	8.00± 2.1	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ST1)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (STB)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ST 54)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (STC)	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-

* : Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus). Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

(-) : pas d'inhibition.

Tableau 17.Activité antimicrobienne de l'EDm (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm)

	Diamètres des zones d'inhibition de croissance microbienne *(mm)
--	--

	Dilutions de l'EDm					
	1g/ml	1g/2ml	1g/4ml	1g/10	1g/20ml	1g/50ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12.00 ± 2.01	10.2 ± 0.5	9.4 ± 1.4	8.25 ± 1.2	7.00 ± 0.1	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ST1)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (STB)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ST 54)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (STC)	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-

* : Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus). Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

(-) : pas d'inhibition.

Tableau 18. Activité antimicrobienne de l'EMe (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm)

	Diamètres des zones d'inhibition de croissance microbienne *(mm)					
	Dilutions de l'EMe					
	1g/ml	1g/2ml	1g/4ml	1g/10	1g/20ml	1g/50ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9.05 ± 2.01	8.02 ± 0.5	7 ± 0.4	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ST1)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (STB)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ST 54)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (STC)	-	-	-	-	-	-

<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-
-------------------------	---	---	---	---	---	---

* : Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus). Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

(-) : pas d'inhibition.

Tableau 19. Activité antimicrobienne de l'EAq (diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures microbiennes en mm).

	Diamètres des zones d'inhibition de croissance microbienne *(mm)					
	Dilutions de l'EAq					
	1g/ml	1g/2ml	1g/4ml	1g/10	1g/20ml	1g/50ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ST1)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (STB)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ST 54)	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (STC)	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-

* : Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus). Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

(-) : pas d'inhibition.

Au regard de ces résultats, nous avons observé que les extraits EEp, EDm, et l'EMe ont inhibé la croissance d'une seule souche *S. aureus* (bactérie à Gram positif), ces extraits exercent une activité antibactérienne dose dépendante. La plus forte activité a été obtenue avec l'EEp avec un diamètre de zone d'inhibition de croissance de 13.01 ± 0.21 mm (à la concentration de 1g/ml) (Fig.25 et 26).

Certes l'activité inhibitrice des extraits organiques sur *S. aureus* est très faible que celle due aux antibiotiques de références, cependant nos extraits exercent une activité antibactérienne dans la

mesure où ils ne sont pas des produits purs mais des extraits brutes (Werner et *al.*, 1998 ; Sanogo et *al.*, 2006).

L'activité antibactérienne de l'EEp sur *S.aureus* pourrait s'expliquer par la présence probable des huiles essentielles, des coumarines et des triterpènes (yukiko et *al.*, 2002 ; Soharb et *al.*, 2001 ; Laure, 2005 ; Surveswaran et *al.*, 2007).

L'activité antibactérienne sur *S.aureus* des extraits EDm et l'EMe pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants, notamment les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les terpènes et les pectines (Scalbert, 1991 ; Bruneton, 1993 ; Elegami et *al.*, 2002 ; Hatano et *al.*, 2005 ; Sanogo, 2006 ; Surveswaran et *al.*, 2007).

La quercétine est probablement présente dans l'EDm, cette substance pourrait contribuer à son activité antibactérienne (Groot, 1998 ; Shan et *al.*, 2007).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on peut citer :

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiens.
- La séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
- L'inhibition de métabolisme microbien (Milane, 2004).

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont des puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase (Ohemeng et *al.*, 1993). Une étude récente a montré l'effet bactéricide de certains flavonoïdes sur *S. aureus* (Sato et *al.*, 1995 ; Milane, 2004 ; Hatano et *al.*, 2005).

L'EMe renferme une quantité appréciable en polyphénols mais il n'a montré que de faible activité inhibitrice sur la souche *S. aureus*, il se pourrait que son activité soit masquée par la présence des sucres (Cavin, 2007).

D'après les résultats obtenus, on remarque que quelque soit la nature de l'extrait et quelque soit la concentration, les bactéries à Gram(-) possèdent une forte résistance, cette résistance n'est pas surprenante, elle est en relation avec la nature de leurs membranes externes qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipopolysaccharide ce qui rend cette membrane imperméable à la plupart des agents biocides (Fauchere, 2002 ; Bouhdid et *al.*, 2006)

Dans nos conditions expérimentales, l'extrait aqueux et organiques n'ont donné aucune activité inhibitrice sur la souche clinique *Candida albicans*. Ceci pourrait être expliqué par l'absence de substances à activité antifongique comme les alcaloïdes (Bruneton, 1993).

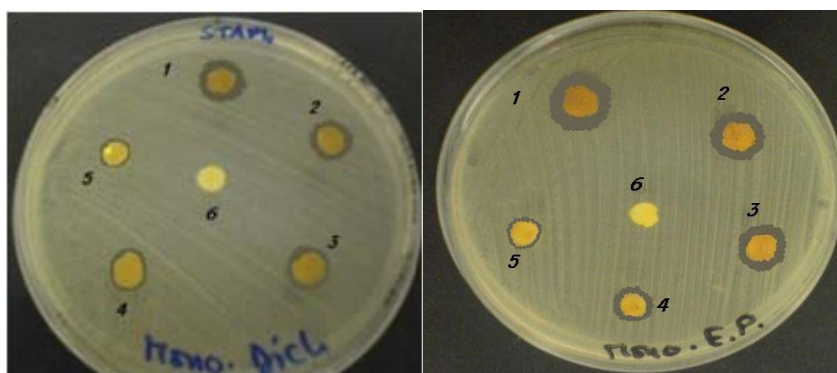


Figure 25. Photos montrant l'effet de l'EEp (à droite) et l'EDm (à gauche) sur la souche *Staphylococcus aureus*.

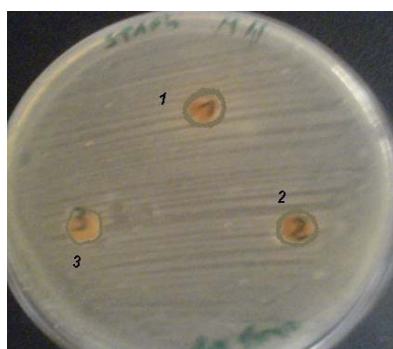


Figure 26. Photo du test antibactérien de l'EME sur la souche *Staphylococcus aureus*.

(Les concentrations : 1 : 1g/ml ; 2 : 1g/2ml ; 3 : 1g/4ml ; 4 : 1g/10ml ; 5 : 1g/20ml ; 6 : 1g/50ml.)

Mohammedi (2006) a étudié l'activité antimicrobienne de l'extrait flavonique préparé à partir de la partie charnue de *Crataegus oxyacantha* L, les résultats sont consignés dans le tableau 20.

Tableau 20. Activité antimicrobienne des extraits flavoniques (Mohammedi, 2006).

Souches	Diamètres des zones d'inhibition de croissance * (mm)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0
<i>P. aeruginosa</i> (P4)	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0

<i>E. coli</i> (E1)	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10.62 ± 1.47
<i>S. aureus</i> (ST1) ATCC 601	09 ± 2.46
<i>S. typhi</i> (S4)	0
<i>Candida albicans</i> 444	10.83 ± 0.76

* : Diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques (diamètre du disque inclus). Les valeurs sont la moyenne de trois répétitions.

D'après ce tableau, nous avons noté une résistance où aucune zone d'inhibition n'a été détectée avec l'extrait flavonique contre les souches à Gram (–) testées.

Nos résultats sont difficilement comparables avec ceux de la bibliographie étant donné que les méthodes utilisées sont différentes, le choix du protocole d'extraction et plus particulièrement celui du solvant est très important. En effet, selon sa polarité, les composés extraits ne sont pas les mêmes. Ainsi changer le protocole d'extraction de même que les solvants utilisés permettraient peut être de déceler des activités antimicrobiennes chez *Crataegus monogyna*, de plus la quantité du produit déposé sur les disques est plus faible que d'autres méthodes (dilution).

Ce test est rapide et simple à effectuer, cependant, il serait judicieux de mettre en place des tests antibactériens avec la méthode de dilution afin d'avoir des résultats plus rigoureux et plus objectifs. En outre il faudrait pousser plus loin l'investigation sur les activités antibactériennes, d'une part en testant les extraits sur d'autres souches et d'autre part en fractionnant les extraits car il y aurait dans les extraits non fractionnés des composés inhibiteurs masquant les composés actifs (Klervi, 2005 ; Cavin, 2007).

L'efficacité d'un extrait dépend de sa concentration, de la plante du quelle il est issu et de la souche testée (Klervi, 2005)

Conclusion et Perspectives

Les substances naturelles occupent de plus en plus une place de choix en thérapeutique. En effet, les plantes médicinales constituent de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit.

Le présent travail a porté sur l'étude des extraits organiques et de l'extrait aqueux (préparés à partir de la partie charnue) de *Crataegus monogyna* Jacq. (aubépine monogyne), et nous avons tenté de contribuer à sa valorisation en Algérie en établissant une relation entre sa composition chimique et ses activités biologiques.

Pour l'obtention de différents extraits, nous avons réalisé une extraction aqueuse par une macération à l'eau et une extraction organique par la méthode de polarité croissante.

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les flavonoïdes, les tanins condensés et les coumarines, ces métabolites secondaires ont de grandes valeurs thérapeutiques.

L'analyse qualitative des extraits par CCM et par CLHP a révélé la présence probable dans l'EDm de la quercétine, cette molécule est considérée comme le composé antioxydant le plus actif de la famille des flavonoïdes.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés dans les quatre extraits analysés montre que l'EDm et l'EMe sont les plus riches en ces métabolites. Tandis que l'EEp est considéré comme l'extrait le plus pauvre.

L'étude de l'effet anti-lipoperoxydant des extraits par la méthode de blanchissement du β carotène a montré que les extraits EDm et EMe sont les plus actifs comme inhibiteurs de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β carotène.

L'étude de l'effet piégeur du radical DPPH révèle que l'EDm et l'EMe sont les plus actifs comme piégeurs de ce radical.

L'activité antioxydante retrouvée dans les extraits de *Crataegus monogyna* Jacq. confère à la plante des vertus thérapeutiques contre certaines pathologies telles que l'athérosclérose, l'asthme et l'arthrite.

L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits de *Crataegus monogyna* par la méthode de diffusion en milieu solide a révélé que les extraits EEp, EDm et EMe possèdent un pouvoir antibactérien dose dépendant sur la souche *Staphylococcus aureus*, la plus forte activité a été obtenue avec l'EEp avec une zone d'inhibition de croissance de 13.01mm à la concentration de 1g/ml.

Tous les extraits organiques et l'extrait aqueux n'ont exercé aucune activité antifongique sur la souche clinique *Candida albicans*.

Ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur ce fruit en se focalisant sur l'EDm et l'EMe, à savoir fractionnement des extraits voir même isolement de substances qui sous tendent les diverses activités détectées. De plus, des études approfondies concernant l'identification des composés par des méthodes plus performantes seront nécessaires. Pour mieux évaluer l'activité antioxydante, d'autres études *in Vitro* et *in Vivo* seraient intéressantes, et il serait souhaitable de faire une étude dans le domaine toxicologique afin de mettre à la disposition des populations une plante active avec des posologies précises.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Aberkane M.C., 2006.** Etude phytochimique de la plante *Publicaria laciniata*. Thèse de doctorat. Batna, 163p.
- Aganga A.A., Mosase K.W., 2001.** Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*, **91**:107-113.
- Ali N.A.A., Julish W.D., Kusunick C., Lindesquist U., 2001.** Screening of yamani medicinal plant for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, **74**:173-179.
- Amarowicz R., Troszynska A., Shahidi Fereidoon., 2005.** Antioxydant activity of Almond seed extract and its fractions. *Journal of Food Lipids*, **12**:344-358.
- Amic D., Davidovic-Amic D., Beslo D., Trinajstic N., 2003.** Structure –radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemical Acta*, **76**: 55-61.
- Anderson C.M., Hallberg A., Hogberg T., 1996.** Advances in the developpement of pharmaceutical antioxidant drug. *Food Chem*, **28**: 65-180.
- Aravodis E., 2005.** Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, **4** (2):128-133.
- Asres K., Seyoum A., Veereshan C., Bucar F., Gibbons S., 2005.** Naturally derived anti HIV agents. *Phytother. Res*, **19**:557-581.
- Audigié C., Figarella J., Zonszain F., 1978.** Manipulation d'analyse biochimique. Doin (Ed). Paris, 247.
- Aymonin G.G., 1993.** Guide des arbres et des arbustes. Sélection du reader's Digest(Ed). Paris, 351p.

B

- Backous N., Delporte C., Andrad C., 1997.** Phytochemical and biological study of *Radialomatia hirsuta* (Proteaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **57**: 81-83.
- Bahorun T., Grinier B., Trotin F., Brunet G., Pin T., Luncky M., vasseur J., Cazin M., Cazin C et Pinkas M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, **46**(11):1086-1089.
- Bahorun T., 1997.** Substances naturelles actives, la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research*. Conseil Mauritus, Amas.

- Bartosikova L., necas J., Suchy V., Kubinova R., 2003.** Antioxydative effects of morine in ischemia, reperfusion of kidney in the laboratory .*Drug and Chemical Toxicology*, **72**:87-94.
- Bekro J.A.M., Konan K.M., Békro Y-A., Djié Bi M.G., Zomi Bi T.J., Mambo V., Boua B.B . 2008.** Phytocompounds of the extracts of four medicinal plants of Cote D'ivoire and assensment of their potential antioxidant by thin layer chromatography. *Euro Journal Publishing*, **24**(2), 219-228.
- Beloued A., 1998.** Etymologie des noms de plantes de bassin méditerranéen. OPU(Ed). Alger, 91p.
- Besle J.M., Lamaison J.L., Pradel P., Fraisse D., Viala D., Martin B., 2004.** Les flavonoïdes, des fourrages au lait. *Renc. Rech .Ruminants*, **11** :67-70.
- Beta T., Nam S., Pexter J.E., Sapirstein H.D., 2005.** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller milled fractions. *Cereal Chem*, **82**(4): 390-393.
- Boizot N., Charpentier J.P., 2006.** Méthodes rapides d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier.
- Booth N.L., Dejan N., Richard B., Stoci E., 2004.** New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **50**:120-123.
- Boudraa S., 2007.** Etude de la fraction minérale et vitaminique des fruits de *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. et *Ziziphus lotus* L. Mémoire de magister. Département d'agronomie. Université el Hadj Lakhdar. Batna, 151p.
- Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S., Abrini J., 2006.** Thymus essential oils : Chemical composition and in vitro antioxydant and antibacterial activities. Congrè international de Biochimie, Agadir.
- Brosse J., 2000.** Larousse des arbres et arbustes .Larousse (Ed).Canada, 576p.
- Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 2^{ème} edition Tec et Doc (Ed). Paris, 914p.
- Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales, 3^{ème} édition, Tec et Doc (ED). Paris, 658p.
- Brzozowska J., Hanower P., Tanguy J., 1973.** Polyphénols des feuilles de cotonnier et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, **12** :2353-2357.

C

- Catalano A., Rodilossis S., Caprari P., Coppola V., Procopio A., 2005.** 5 Lipxygenase regulates senescence like growth arrest by promoting Ros-dependent p53 activation. *EMBOJ*, **4** :17-179.
- Cavin A., 1999.** Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires, *Tinospora crispa* (Menispermaceae) ; *Merremia emarginata*(convolvulaceae) et *Orphea enneandra* (Annonaceae). Thèse de doctorat. Lausanne, 243p.

- Cavin A.L., 2007.** Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits africains du genre *Detarium* (Fabaceae-Caesalpinioideae) : *D. microcarpum* Guill. Et Perr. Et des formes comestibles et toxiques de *D. seneegalense* J.F.Gmel. Thèse de doctorat. Genève, 277p.
- Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Verdar Sucan., Ozekt., Baser K.H.C.2007.** Antimicrobial activities of methanolic extract and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, **100**:553-559.
- Chang Q, Zuo Z., Harrisson F., Chow M.S., 2002.** Hawthorn. *J. Clin. Pharmacol*, **42**:605-612.
- Chen C.N., Weng M.S., Wu C., Lin J.k., 2004** .Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells. *Food Chemistry*, **1**(2):175-185.
- Chevalier L., Crouzet-Segara C., 2004.** Médicaments à base des plantes. Masson (Ed). Paris, 354p.
- Chopra R.N., Nayar S.L. and Chopra I.C., 1986.** Glossary of Indian medicinal plants (Including the supplement). Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi.
- Christopher T.A., Lopez B.L., Yue T.L., Feuerstein G.Z., Ruffolo R.R., Ma X.L., 1995.** Carvedilol, a new beta-adrenoreceptor blocker, vasodilator and free-radical scavenger, exerts an anti-shock and endothelial protective effect in rat splanchnic ischemia and reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*, **273**: 64-71.
- Ciulei I., 1982.** Methodology for analysis of vegetable drugs. Parnaris (Ed), Bucharest, 67p.
- Cottiglia F., Loy G.,Garan D., Floris C., Casu M., Pompei R., Bonsignore L., 2001.** Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, **8**(4): 302-305.
- Couplan F., 1998.** Guide nutritionnel des plantes sauvages et cultivées. Nestlé (Ed). Paris, 255p.
- Crete P., 1965.** Précis de botanique. Tome II. Systématique des angiospermes. Masson (Ed). Paris, 429p.
- Cuit T., Nakamura K., Tians S., Kayhara H and Tian L., 2006.** Polyphenolic content and physiological activities of chinese hawthorn extracts. *Biochem*, **70**(12): 2948-2956.
- Cushine T.P.T., Lamb A.J., 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agent*, **26**:343-356.
- Cuvelin M.E., Berset C., 1992.** Use of a new test for determining comparative antioxidant activity of BHA, BHT, α Tocopherol and extracts from rosemary and sage. *Chem Soc*, **73**:645-652.

D

- Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Yves DACOSTA (Ed). Paris, 317p.
- Das H.C., Wang J.H., Lien E., 1994.** Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: a structure system-activity relation ship analysis. *Journal of Food Engineering*, **69**:133-136.

Degenring F.H., Suter A., Weber M., Saller R., 2003. A randomised double blind placebo controlled clinical trial of standardised extract of fresh *Crataegus* berries in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. *Phytomedicine*, **10**: 363-369.

Deina M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L., 2003. Natural product: their chemistry and biological significance. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **80**:65-70.

Diallo A., 2005. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (Myrtales). Thèse de doctorat. Bamako, 99p.

Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly K., Maiza A., 2004. Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R.Chimie*, **7**:1073-1080.

Dohou N., YamniK., Gmiran., Idrissi Hassani L.M., 2003. Etude de polyphénols des feuilles d'une endémique ibéro Marocaine, *Thymelaea lychroides*. *Acta Botanica Malacitana*, **29**:233-239.

Domnez A., 2004. The genus *Crataegus* L. (Rosaceae) with special reference to hybridation and biodiversity in Turkey. *Journal of Chromatography*, **28**: 23-29.

E

Edin H., Nimmo M., 1999. Contrôle des denrées alimentaires. Laboratoire CANTONAL (Ed). Paris, 66p.

Elegami A.A., Elnino E.I., Eltohami M.S., MuddathistK., 2002. Antibacterial activity of some species of family Combretaceae. *Phytotherapy research*, **16**:555-561.

Espiards E., 2002. Introduction à la transformation industrielle des fruits. Tec et Doc (Ed),360p.

F

Farhat R., 2007. Etude de la fraction lipidique et la composition en acides gras des huiles des fruits de : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. et *Ziziphus lotus* L. Mémoire de magister. Département d'agronomie. Université el Hadj Lakhdar. Batna, 109p.

Faucher J.L., Avril J.L., 2002. Bactériologie générale et médicale. Tome 1. Ellipses (Ed). Paris,214p.

Ferrari J., 2002. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaires des Thymelaceae et investigation phytochimique de l'une d'elle: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne. 242p.

Fiorucci S., 2006. Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Nice, 211p.

Fong H.s., Bauman J.L., 2002. Hawthorn. *Journal of Cardiovascular Nursing*, **16**(4):1-8.

Ford R.A., Hawkins D.R., Mayo B.C., Api A.M., 2001. The *in vitro* dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, **39**: 153-162.

Formica J.V., Regelson W., 1995. Review of the biology of quercetine and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, **33**:1061-1080.

Fosting S., 2004. Etude phytochimique et des activités biologiques de *Maerua angensis* (Cappridaceae).Thèse de doctorat. Bamako, 149p.

Frankel E.N., Meyer A.S., 2000. The problems of using one dimensional method to evaluate multifunctional food and biological antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**: 1925-1940.

Fridovich I., 1970. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem*, **231**: 899-911.

G

Garcia M.D., Saenz M.T., Ahumadam.C., Cert A., 1997. Isolation of three triterpenes and several aliphatic alcohols from *Crataegus monogyna* Jacq. *Journal of Chromatography*, **76**(7):340-342.

Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M., 2001. Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique-Pharmacognosie-Phytotherapie-homeopathie. Tec et Doc (Ed), 272p.

Giguere M.S., 2001. Isolement de coumarines de la calophyllum inophyllum de l'île de Tamanu. Sherbrooke. 28p.

Girre L., 2000. Les plantes médicinales. Ouest-France (Ed). Rennes, 30p.

Groot H., 1998. Une sagesse ancienne remise au bout du jour. *Tabula*, **3** :4-9.

Guignard J.L., 1998. Abrégé de botanique. Masson (Ed). Paris, 212p.

H

Halliwell B., 1999. How to characterize a biological antioxidant free radical. *Res.Comm*, **9**:1-32.

Harrisson D., Griendling K.K., Landmesser U., Hornig B., Drexler H., 2003. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, **91**:7-11.

Hatano T., Kusuda M., inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T., 2005. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, **66**:2047-2055.

Heimler D., Vignolini P., Din M.G., Vinueri F.F., Ronani A., 2006. Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*. **99**:464-469.

Hennebelle T., 2006. Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamiles productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse de doctorat. Lille, 304p.

- Herrara C.M., 1984.** Seed dispersal and fitness determinants in Wild rose : combined effects of Hawthorn , birds , mice and browsing ungulates .Spain , **63**:386-393.
- Hoffman L., 2003.** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat. Strasbourg, 245p.
- Huang M.T., Ferraw T., 1991.** Phenolic coumpoud in food and cancer prevention. Phenolic coumpounds in food and their effects on health, **3**:83.
- Hu S.G., Li L., He X.W., 2005.** Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chineseese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, **1062**:31-37.
- Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C., 2003.** Radical causes of cancer. *Nature*. **3**: 276-285.

J

- Jean F.I., 1992.** Analyse de produits naturels de *Taxus canadensis*. Thèse de doctorat. Québec. 113p.
- Joffin J.N., Leyral G., 2001.** Microbiologie technique 1 dictionnaire des techniques. CRDP, 248p.

K

- Kao H.Y., Hiipakko r.A., Liao S., 2002.** Modulation of of endocrine system and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology*, **141**:3980-3987.
- Kartal N., Sokmen M., Tepe B.D., Polissiou M., Sokmen A., 2007.** Investigation of the antioxydant properties of *Ferula orientals* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, **100**:584-589.
- Karumi Y., Onyeyili P.A., Oyugbuaja V.O., 2004.** Identification of active principals of *M. Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *J.Med.Sci*. **4** (3), 179 -182.
- Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin., 2005.** Synthesis and biological evaluation of novel angulary fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **15**: 3584-3587.
- Kim D.H., Kim D.Y., Kim Y.C., Jung J.W., Lee S., Yoon B.H., 2007.** Nodakenin, a coumarin compoud, ameliorates scopolamine induced memory distuption in mice. *Life Science*, **80**: 1944-1950.
- Kim H.P., Son k.H., Chang H.W., kong S.S., 2004.** Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action macanism. *J.Pharmacol.Sci*, **96**:229-254.
- Kini F., Saba A., Tits M., Angelot L., Guisson P.I., 2008.** Analyse par chromatographie et par spectrométrie électronique des extraits de feuilles de *Odontoneme strictum* (Acanthaceae). Mise en évidence de flavonoïdes du type flavone. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, **25**:117-121.
- Klaunig J.E., Kamendulis L.M., 2004.** The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **44**: 239-267.

- Klervi L.L., 2005.** Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et étude des composés de défense de différentes espèces de Sargassacées des Iles Salmon (Pacifique sud). 210p.
- Ko F.N., Cheng Z.J., Lin C.N., Teng C.m., 1998.** Scavenger and antioxidant properties of prenylflavones isolated from *Artocarpus heterophyllus*. *Free Radical Biology and Medicine*, **25**:160-168.
- Kohen R., Nyska A., 2002.** Oxidation of biological systems, oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, **30**:620-650.
- Koyuncu T., Pinar Y., Lule F., 2007.** Convective drying characteristics of Azerol (*Crataegus monogyna* Jacq.) and yellow (*Crataegus aronina*) fruit. *Journal of Food Engineering*, **78**:1471-1475.

L

- Laure F., 2005.** Étude de la composition chimique et de la biodiversité du *Calophyllum urophyllum* de Polynésie française. Thèse de doctorat, Nice. 373p.
- Laurent E., 1991.** Éléments minéraux in : Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Volume 4. Lavoisier (Ed). Paris, pp78-98.
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med*, **30**: 1076-1081.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Tian Y., 2007.** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102**:771-776.
- Li K., Geng X., Simonsen J., Karchesy J., 2004.** Novel wood adhesives from condensed tannins and polyethylenimine. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, **24**:327-333.
- Lievre K., 2004.** Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furanocoumarines) de la Rue officinale (*Ruta graveolens*) par transformation génétique. Thèse de doctorat, 197p.
- Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F., 2006.** Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**:477-485.
- Ljubunec P., Portonaya I., Cognan U., Azaich H., and Bomzon A., 2005.** Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**:153-161.
- Louis S., 2004.** Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des légumineuses. Thèse de doctorat. Lyon, 259p.
- Luthria D.L., Mukahapadhyay S., 2006.** Influence of sample preparation on Assay of phenolic acids from eggplant. *Agric. Food. Chem.*, **54**:41-47.

M

- Maataoui B.S., Hunyeur A., Hilalis., 2006.** Activités antiradicalaires d'extraits de jus de fruits du Figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus Indica*). *Lebanese Science Journal*, **7**(1) : 3-8.
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E., kefalas P., 2005.** Phenolic profile and antioxydant activity of the Algerian ripe date fruit (*phonix dactylifera*). *Food Chemistry*, **89**: 411-420.
- Maria A, Vera V ., Juan A., Monotoya S., Calva G., Emma G., Raminrez R., 2005.** Extraction, thermal stability and kenetic behavior of pectin methylestearase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. **5**:2-6.
- Marfak A., 2003.** Radiolyse Gamma des flavonoides. Etude de leur reactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat, 220p.
- Martínez-Cayuela M., 1995.** Oxygen free radicals and human disease. *Biochem*, **77**: 147-161.
- Mazzochi J., Dalioche G., Frenol U., 1999.** Glaner dans le midi. Tetrass (Ed).Paris, 169p.
- Messaili B., 1995.** Botanique, systématique des spermaphytes. OPU (Ed). Alger, 91p.
- Meyer A.S., Yi O.S., 1997.** Inhibit of human low density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxydants in grapes. *Journal of food, Agriculture*, **45**: 1638-1643.
- Milane H., 2004.** La quercetine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, étude et applications thérapeutique. Thèse de doctorat .Paris, 155p.
- Mitchetti A., 1992.** Tous les arbres de nos forets. Bordas (Ed). Belgique, 414p.
- Mohammedi Z., 2005.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et falvonoides de quelques plantes de la region de Tlemcen. Memoir de magister. Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen, 105p.

N

- Newman P.R., Timmerman B.N., Marby T.J., 1997.** Laboratory manual for the systematic identification of flavonoids.
- Novelli G.P., 1997.** Role of free radicals in septic shock. *Journal of Physiol Pharmacol.* **48**:517-527.

O

- Ochocka R.J., Rajzer D., Kowalski ., Lamparczyk H 1995.** Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. By capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **709** 197-202.
- Ojala T., Rames S., Haansu P., Vuorela H., Hiltunen R., Haahtela K., Vuerela P., 2000.** Antimicrobial activity of some coumarin containing hebal plants growing in filand. *Journal of Enthopharmacology*, **73**: 299-305.

- Okamura H., Mimura A., Yakou Y., 1993.** Antioxydant activity of Tannins and flavonoid in *Eucalyptus rostarta*. *Phytochem*, **33**:557-561.
- Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatanv T., 1983.** Studies on the activities of tannins And Related coumpounds from medicinal plant and drugs. Inhibition effects of lipid peroxidation in mithchordria and microsome of liver. *Chem. pharm .Bull*, **31**:1625-1631.
- Ozcan M., Hacisefrog ullari H., Marakoglu T., Arslan D., 2005.** Hawthorn (*Crataegus spp*) fruit: some physical and chemical properties. *Journal of Food Engineering*, **69**:409-413.

P

- Panda K., Chatopardhayaya R., Fhosh M.K., 1999.** Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damae of proteins and increased proteolysis. *Free Radicals. Biol Med*, **27**: 1064-1079.
- Panovska T.K., 2005.** *In vitro* antioxydant activity of some *Tencrium* species (Lamiaceae). *Acta Pharm.* **55**:207-214.
- Paris R.R., Moyse H., 1976.** Collection de précis de pharmacie. Tome I. Masson (Ed). Paris, 420p.
- Pastre J., Priymenko N., 2007.** Intérêt des antioxydants de l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Med. Vet*, **158**(4) : 180-189.
- Pedneault K., Leonharts., Angenol., Gosselin A., Ramputh A., Arnason J. T., 2001.** Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composes secondaires des organes végétaux. Texte de conférence. Canada, 1-5.
- Peronny S., 2005.** La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*). Thèse de doctorat, 151p.
- Perret C., 2001.** Analyse de tannins inhibiteurs de la stilbene oxydase produite pour Botrytis cinerea Pers : Fr. Thèse de doctorat, 173p.
- Pincemail j., Bonjean K., Cayeux K., defraigne J.O., 2002.** Physiological action of antioxydant defences. *Nutrition Chimique et Metabolisme*, **16**:233-239.
- Pittler M.H., Shmidt K., 2003.** Hawthorn extract for treating chronic heart failure. *Am.J.Med*, **114** (8):665-674.
- Potterat O., 1997.** Antioxydant and free radical scavengers of natural origin. *Curent Organic Chemistry*, **1**:415-440.
- Prakash D., Upadhyay G., Brahma N., Single H.B., 2007.** Single antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of Soybean(glycine max). *Food Chemistry*. **104**:783-790.

R

- Redoyal L.M., Beltram M., Sauchor., Olmedo D.A., 2005.** Bioorganic and medicinal chemistry Letters. *Fitoterapa*, **15**:4447-4450.

- Rehman A., Nouroozj., Moller W., 1999.** Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *EEBS*, **488**:120-122.
- Repcak M., Imrich J., Fanekova M., 2001.** Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Plant Physiol*, **158**: 1085: 1087.
- Reynaud J., Lussignol M., 2005.** The flavonoids of *Lotus Corniculatus*. *Lotus Newsletter*, **35**:75-82.

S

- Saadoudi M., 2007.** Etude de la fraction glucidique des fruits de : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L. et *Ziziphus lotus* L. Mémoire de magister. Département d'agronomie. Université el hadj Lakhdar. Batna, 80p.
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Mansredini S., Radice M., Irimi R., 2005.** Comparative evaluation of 11 essentials oils of different origin as functional antioxydants, antiradicals and antimicrobial in food. *Food Chemistry*, **91**: 621-632.
- Sanchez-Moreno C., 2002.** Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, **8**:121-137.
- Sanogo R., Diallo D., Diarra S., Ekoumon C., Bougoudougou F., 2006.** Activité antibactérienne et antalgique des deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Medical*, **1** :18-24.
- Sato M; Tsuchiya H; Takase I; Kureshiro H; Tanigaki S; Iinuma M; 1995.** Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics *Phytother. Res.* **9**(7): 509-12.
- Scalbert A., 1991.,** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**:3875-3883.
- Schorderet M., 1992.** Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. OPU. Alger, 918p.
- Shan B., Cai Y.Z., Brooks G.D., Cokk H., 2007.** The in vitro antibacterial activity of dietary spiece and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Chemistry*, **117**:112-119.
- Singleton V.L., Ortorfer R., Lamnela R.M., 1999.** Analyse of total phenols and other oxidation substrate and antioxydants by mean of Folin Ciocalteu reagent. Academic press, **5**:152-178.
- Soharb M.H., Rahman M.E., Hassan C.M., Rashid M.A., 2001.** Antibacterial activity of *Claussena heotaphylla*. *Fitoterapia*. **72**: 547-549.
- Sokol-Letowska A., Oszmiansk J., wojdylo A., 2007.** Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, **103**:853-859.
- Sparska T.H., Martin T., 1999.** Yields of hawthorn *Crataegus monogyna* berries under different hedgerow management. *Agricultur. Ecosystems and Envirronnement*, **72**: 107-110.

Stefanova T., Nikolova N., Michailova A., Mitov I., Iancovii., Zlabinger g.I., Neychev H., 2007. Enhanced resistance to *Salmonella enteric* sero var typhimurium infection in mice after coumarin treatment. *Microbes and infection*. **9**: 7-14.

Surveswaran S., Cai Z.Y., Cark H., Sun M., 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 indian medicinal plants. *Food chemistry*, **102**: 938-953.

Svedstroma U., Vuorela H., Kostianen R., Leak I., Hiltunen R., 2006. Fractionation of polyphenols in hawthorn into polymeric procyanidins, phenolic acids and flavonoides prior to high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **11**(12):103-111.

T

Taguchi G., Fujikawa S., Yazawa T., Kodaira R., Hayashida N., Shimosaka M., Okazaki M., 2000 . Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Science*, **151**: 153-161.

Tahrouch S., Audary C., Rapior S., Moudolot L., Gargadenneca., Fruchner A., 2000. Polyphenol investigation of *Argania spinosa* (Sapotaceae) endemic tree from Morocco. *Acta Bot. Gallica*, **147**(3):225-232.

Thati B., Noble A., Rowan R., Creaven S.B., Walsh M., Egan d., Kavanagh K., 2007. Mechanism of action of coumarin and silver coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicology in vitro*, **21**: 801-808.

Tijburg L.B.M., Maller T., Folts j.d., Weisberger U.m., Katau M.B., 1997. Tea flavonoids and cardiovascular diseases. *Crit,Rev. Food Sci*,**37**:771-785.

Tohda M., Marikami Y., Mastsumoto K., Watanabe H., 2004. Antioxydant and free radical-scavenging activity of choto-san and its related constituents. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **27**:38-46.

U

Urbonaviciute A., Jakstas V., Kornysova O., Janulis M., Maruska A., 2006. Cappillary electrophoretic analysis of flavonoids in single styled hawthorn(*Crataegus monogyna* Jacq) ethanolic extracts. *Journal of Chromatography A*, **11**(12): 339-344.

V

Veselovsskaya M.V., Garzed M.M., vinogradova V.I., Khilia P.V., 2006. Modified coumarins furocoumarin derivatives of cytisin. *Chemistry of Natural Compound*, **42**(3): 277-280.

Veveris M., Kock E., Chatterjee S.S., 2004. *Crataegus* special extract WS1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion. *Life Science*, **74**:1945-1955.

Villars G., 1971.Chromatographie sur couche minces. Tec et Doc(Ed).Paris, 370p.

W

- Wagner H., Bladt S., 1996.** Plant drug analysis. A thin layer chromatography Atlas. Springer (Ed). Munich, 384p.
- Weissburger J.M., 1997.** Tea and health: a historical perspective. *Cancer let.* **114**: 315-317.
- Werner F., Paul O.O., Rainer A., 1998.** Antibacterial activity of east African medicinal plants. *Journal of Entho Pharmacology*, **60**: 79-84.
- Wu R.C., Huang Y.M., Lin Y.T., Ju H.Y., 2007.** Antioxydant properties of cortex fraxini and its simple coumarins. *Food Chemistry*, **35**: 3-8.

Y

- Yochum L., Kusli L., Meyer K., Folsom A.R., 1999.** Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am. J. Epiderma.* **149**:943-949.
- Yoo K.M., Lee H.C., Lee H., Moon B., Lee C.Y., 2008.** Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, **106**:929-936.
- Yukiko T., Shikishima Y., Takaishi., Shibata H., Higutu T., 2002.** Coumarins and gamma pyrone derivatives from Prangos pabularia: Antibacterial activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry.* **59**: 649-654.

Z

- Zabri H., Kodjo C., Beni A., Marnyrbekova B., Ko J., Bekro Y.A., 2008.** Phytochemical screening and determination of flavonoids in *Secamone afzeli* (Asclepiadaceae) extracts. *African journal of Pure and Applied Chemistry*, **2**(8):80-82.
- Zhang D.L., Zhang Y.T., Yin J.J., zhao B.L., 2004.** Oral administration of Crataegus flavonoids protects against ischemia reperfusion brain damage in gerbils. *Journal of Neurochemistry*, **90**:211-219.
- Zhang Z., Hoa K.K., Huang Y.,Cena zhen Y., 2006.** Hypocholesterolemic activity of hawthorn fruit in mediated by regulation of cholesterol-7- hydroxylase and acyl coa: cholesterol acyl transferase. *Food Research* ,**35**:885-891.

Résumé :

Les extraits naturels de plantes contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques. Dans la présente étude nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits organiques et de l'extrait aqueux préparés à partir de la partie comestible de *Crataegus monogyna* Jacq. Le criblage préliminaire basé sur des tests spécifiques a conclu en une présence de substances ayant de grandes valeurs thérapeutiques (flavonoïdes, tanins et coumarines). L'analyse qualitative des extraits par chromatographie sur couches minces et par chromatographie liquide à haute performance a révélé la présence probable de la quercetine dans l'EDm. L'estimation quantitative des polyphénols totaux (par la méthode de Folin-Ciocalteu), des flavonoïdes totaux (par la méthode au trichlorure d'aluminium) et des tanins condensés (par la méthode au trichlorure de fer) a montré que l'EDm et l'EMe sont les extraits les plus riches en ces composés. L'inhibition de l'oxydation couplée de l'acide linoléique – β carotène a été évaluée par le test de blanchissement du β carotène, qui a montré une activité antioxydante considérable pour l'EDm (48.46% d'inhibition) et pour l'EMe (36.40% d'inhibition). De même, l'évaluation quantitative du pouvoir piégeur des extraits IVs-à-IVs du DPPH confirme que l'EDm et l'EMe sont les plus actifs, avec une IC_{50} de l'ordre de 259.70 μ g/ml et 331.85 μ g /ml respectivement. L'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits par la méthode de diffusion dans un milieu solide montre que les extraits EEp, EDm et EMe possèdent un pouvoir antibactérien sur la souche *Staphylococcus aureus* mais à des concentrations élevées, par contre tous les extraits testés se sont révélés inactifs sur (*Candida albicans*)

Mots clés : *Crataegus monogyna* Jacq, extraits naturels, pouvoir antioxydant, pouvoir antimicrobien, piégeur.