

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



UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDAR BATNA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE

Pour L'obtention Du Diplôme De

MAGISTERE

EN BIOLOGIE

Option : Biochimie Appliquée

Présenté par

ABDESSEMED Hadjira

THEME

ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES EXTRAITS DU FRUIT DE Crataegus azarolus L.

Devant le jury

M^{me} ALLOUI-LOMBARKIA O.

M^{me} ROUABEH-HAMBABA L.

M^{me} AMEDDAH S.

M^r LAROUI S.

Pr. UNIVERSITE DE BATNA

Pr. UNIVERSITE DE BATNA

M.C. UNIVERSITE DE CONSTANTINE

Pr. UNIVERSITE DE BATNA

PRESIDENTE

RAPPORTEUR

EXAMINATRICE

EXAMINATEUR

ANNEE UNIVERSITAIRE 2009/2010

Remerciement

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à M^{me} HAMBABA L., professeur à la faculté des sciences, Université de Batna pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'accordé m'ont permis d'achever ce document.

J'exprime mes vifs remerciements à M^{me} LOMBARKIA O., professeur à l'Université de Batna pour sa précieuse aide et ses conseils et pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à M^{me} AMEDDAH S., Maître de conférences à l'Université de Constantine pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de faire partie de ce jury.

Mes remerciements vont également à Mr LAROUJ S., professeur à l'Université de Batna d'avoir accepter de faire partie de ce jury.

Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance à Mr ABDEDDAIM M., Maître assistant- chargé de cours à l'Université de Batna tout d'abord pour m'avoir inspiré le sujet, pour son accueil au sein de son laboratoire et pour ses orientations judicieuses.

J'exprime mes vifs remerciements à Mr ABERKANE M-CH. et Mr AYACHI A. qui nous ont permis de réaliser une grande partie de notre travail au sein de leurs laboratoires.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents, surtout ma mère, qu'ils trouvent ici l'expression de mon affection pour leurs aides et leurs soutiens.

A mon conjoint pour son appui et sa compréhension.

A mes anges Ahmed Moutiâa, Abdelmouiz et Mousâab.

A mes adorables nièces et neveux.

A mes frères et mes sœurs, cousines et cousins pour leurs aides.

A toute ma famille.

A toutes mes amies.

A tous ceux qui me sont chers.

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Revue sur l'espèce *crataegus azarolus* L

1. Généralités	3
2. Composition chimique.....	7
3. Propriétés pharmacologiques.....	11
4. Autres utilisations.....	14

II. Les métabolites secondaires

1. Les flavonoïdes.....	15
1.1. Structure chimique et classification.....	16
1.2. Localisation et distribution.....	18
1.3. Activités biologiques des flavonoïdes.....	19
2. les tanins.....	22
1.1. Structure chimique et classification.....	22
1.2. Localisation et distribution.....	24
2.3. Activités biologiques et thérapeutiques des tanins.....	24

III. Stress oxydatif et antioxydants

1. Les radicaux libres.....	28
2. Stress oxydatif.....	32
3. les antioxydants.....	35

IV. Les antimicrobiens

1. Définition.....	37
--------------------	----

2. Les agents chimiothérapeutiques.....	37
3. Mécanismes de résistances microbiennes.....	42

Chapitre II: Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	43
2. Méthodes.....	44
2.1. Conservation du fruit.....	43
2.2. Paramètres physiques du fruit.....	44
2.3. Détermination du taux d'humidité.....	44
2.4. Détermination du taux de matière organique.....	45
2.5. Procédés d'extraction.....	45
2.6. Analyse des extraits.....	48
2.6.1. Tests préliminaires.....	48
2.6.2. Chromatographie sur couches minces CCM.....	48
2.6.3. Chromatographie liquide à haute performance HPLC.....	49
2.6.4. Spectrophotométrie UV-Visible.....	50
2.6.4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	51
2.6.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	52
2.6.4.3. Dosage des tanins.....	53
2.7. Test de l'activité antimicrobienne.....	54
2.8. Test de l'activité antioxydante.....	55
2.8.1. Méthode chromatographique CCM (au DPPH).....	55
2.8.2. Méthode spectrophotométrique.....	56
2.8.2.1. Test antiradicalaire au DPPH.....	56
2.8.2.2. Test de blanchissement du β -carotène.....	57
2.9. Analyses statistiques.....	58

II. Résultats et discussions

1. Paramètre physique.....	59
2. Détermination du taux d'humidité.....	60
3. Détermination du taux de matière organique.....	61
4. Procédés d'extraction.....	61
5. Analyse des extraits.....	63
5.1. Tests préliminaires.....	63
5.2. Chromatographie sur couche mince CCM.....	64
5.3. Chromatographie à haute performance HPLC–RP-C18.....	67
5.4. Dosage des différentes substances phénoliques.....	69
6. Test de l'activité antimicrobienne.....	72
7. Test de l'activité antioxydante.....	75
7.1. Méthode chromatographique CCM (test au DPPH).....	75
7.2. Test au radical DPPH.....	76
7.3. Test de blanchissement du β -carotène.....	80
<i>Conclusion générale</i>	83

Annexes

Références bibliographiques

Liste des tableaux

Tableau N ^o	Titre	Page
I.	Propriétés biochimiques de la pulpe de <i>Crataegus spp.</i>	7
II.	Teneur en éléments minéraux des fruits de <i>Crataegus</i>	8
III.	Distribution nutritionnelle des flavonoïdes	18
IV.	Teneur en flavonoïdes de quelques fruits et légumes.....	18
V.	Espèces réactives de l'oxygène.....	28
VI.	Rapports (partie comestible / fruit et noyau / fruit) du fruit de <i>Crataegus azarolus</i> L.....	59
VII.	Le taux d'humidité et de matière sèche du fruit de <i>Crataegus azarolus</i> L.	60
VIII.	Le taux de cendre et de matière organique des fruits de <i>Crataegus azarolus</i> L...	61
IX.	Les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés.....	62
X.	Aspects, couleurs et rendement des divers extraits du fruit de <i>Crataegus azarolus</i> L.....	62
XI.	Résultats des tests préliminaires des flavonoïdes, des tanins et des alcaloïdes sur les différents extraits du fruit de <i>Crataegus azarolus</i> L.	63
XII.	Rapports frontaux et couleurs des standards après révélation	64
XIII.	Temps de rétention des standards testés et détectés dans les différents extraits des fruits de <i>Crataegus azarolus</i> L.	69
XIV.	Dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés dans les extraits du fruit de <i>Crataegus azarolus</i> L.....	70
XV.	Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus par différents extraits du <i>Crataegus azarolus</i> L.	73
XVI.	Les valeurs significatives de l'activité antiradicalaire des différents extraits du fruit de <i>Crataegus azarolus</i> L. et des standards tester.....	77

Liste des figures

Figure N ^o	Titres	Page
1.	Aire de répartition du <i>Crataegus</i> en Algérie.....	4
2.	Arbre et fruits du <i>Crataegus azarolus</i> L.....	6
3.	Structure chimique des acides phénoliques de l'aubépine.	9
4.	Structure chimique des majeurs Flavonoïdes et procyanidol de l'aubépine..	10
5.	Structure chimique des acides triterpéniques de l'aubépine.	11
6.	Structure de base des flavonoïdes.....	16
7.	Voie de biosynthèse de différentes classes des flavonoïdes.....	17
8.	Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes.....	20
9.	Structure des tanins hydrolysables et leur monomère.....	23
10.	Structure des tanins condensés et leur monomère.....	24
11.	Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR.....	33
12.	Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).....	34
13.	L'acide paraaminobenzoïque et son antagoniste 'sulfanilamide'.....	38
14.	Différentes parties du fruit (<i>Crataegus azarolus</i> L.)	43
15.	Différentes étapes d'extraction par épuisement successif du matériel végétal.....	46
16.	Extraction par macération aqueuse.....	47
17.	Courbe d'étalonnage des polyphénols (moyenne \pm SD de trois essais).....	51
18.	Courbe d'étalonnage des flavonoïdes (moyenne \pm SD de trois essais).....	52
19.	Courbe d'étalonnage des tanins (moyenne \pm SD de trois essais).....	53
20.	Forme radicalaire et réduite du DPPH.....	56
21.	Chromatographie sur couche mince des extraits polaires des fruits de <i>Crataegus azarolus</i> L. et des standards (révélation par la vanilline..... sulfurique).	65
22.	Chromatographie sur couche mince des extraits apolaires des fruits de <i>Crataegus azarolus</i> L. (révélation par la vanilline sulfurique).	66
23.	Chromatogramme de l'extrait éthérique du <i>Crataegus azarolus</i> L.....	67
24.	Chromatogramme de l'extrait diclorométhane du <i>Crataegus azarolus</i> L.	67
25.	Chromatogramme de l'extrait méthanolique du <i>Crataegus azarolus</i> L.....	68

26.	Chromatogramme de l'extrait aqueux du <i>Crataegus azarolus</i> L.....	68
27.	Corrélation linéaire entre la concentration en polyphénols totaux et la concentration des tanins condensés des différents extraits du fruit de..... <i>Crataegus azarolus</i> L.	71
28.	Évaluer de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé	73
29.	Chromatographie sur couche mince des extraits des fruits de <i>Crataegus azarolus</i> L. et des standards (révélation par le DPPH).....	75
30.	Activité antiradicalaire des extraits du <i>Crataegus azarolus</i> L.	76
31.	Activité antiradicalaire des standards.....	78
32.	Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits du <i>Crataegus azarolus</i> L. et du BHT.....	80
33.	Activité antioxydante relative des extraits du fruit de <i>Crataegus azarolus</i> L., du BHT et du test contrôle dans le système..... β -carotène / acide linoléique.	81

Liste des abréviations

AAR	: Activité antioxydante relative
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ANOVA	: Analyse de variance
APR	: Pouvoir antiradicalaire
ATCC	: American type culture collection
BAW	: n-Butanol/Acetic acid/water
BHT	: Butylated hydroxytoluen
CCM	: Chromatographie sur couches minces
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
DMSO	: Diméthyle sulfoxyde
DO	: Densité optique
DPPH	: Diphenylpicrylhydrazyl
EAG	: Equivalent d'acide gallique
E. Aqe	: Extrait aqueux
EC	: Equivalent de catéchine
E. Dic	: Extrait diclorométhanique
E. Eth	: Extrait éthéropétrolique
E. Met	: Extrait méthanolique
EOR	: Espèces oxygénées réactives
EQ	: Equivalent de quercétine
GC-MS	: Gas Chromatography – Mass Spectroscopy
GPx	: Glutathion Peroxydase
GR	: Glutathion Réductase
GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Glutathion oxydé
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HPLC-ED	: High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical detection
IC₅₀	: Concentration inhibitrice à 50%

LD₅₀	: dose létale de 50% des animaux d'expérience
NAD	: Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH	: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NOS	: Nitric oxide synthase
PABA	: paraaminobenzoïque acid
PR	: Pouvoir réducteur
Rf	: Rapport frontal
SOD	: Superoxyde dismutase
UV/Vis	: Ultraviolet/Visible
TR	: Temps de rétention

Introduction Générale

L'Algérie dispose d'un ensemble d'espèces naturelles et cultivées à gamme importante et variée. Cette richesse naturelle reste insuffisamment connue. Une bonne partie des ressources végétales à intérêt économique, social et sanitaire n'est pas connue du grand public, ceci concerne soit les espèces aromatiques, condimentaires ou médicinales.

Des remèdes traditionnels à base de plantes ont été longtemps employés sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action, bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal étaient attribués à des métabolites secondaires tels que les alcaloïdes et dérivés, les terpènes, les stéroïdes et les composés polyphénoliques (Bahorun, 1997).

A l'heure actuelle, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, la toxicité des antioxydants synthétiques, utilisés comme additifs alimentaires, conduit à la recherche des substances naturelles dotées d'activités antimicrobienne et antioxydante sans avoir d'effets irritants ou toxiques.

Dans ce contexte, s'inscrit ce présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les activités antimicrobiennes et antioxydantes des différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. L'espèce appartient à la famille des Rosacées. Un fruit oublié, saisonnier très apprécié par la population algérienne et notamment les enfants (surtout les écoliers).

L'espèce *Crataegus azarolus* L. est considérée comme plante médicinale largement utilisée dans la médecine traditionnelle comme bon remède pour les douleurs des appareils digestif et urinaire (Rose et Treadway, 1999). Elle régularise les rythmes cardiaques, la circulation sanguine, l'hypertension artérielle et calme le système nerveux (Pelotti, 1987 ; Foster et Duke, 1990 ; Belouad, 2003). D'ailleurs, elle possède plusieurs activités thérapeutiques : antispasmodique, astringente, diurétique, fébrifuge, hypotensive et sédative (Fernandez, 2003).

Les objectifs de ce présent travail sont fixés dans les quatre points suivants :

- L'analyse des différents extraits organiques et aqueux du fruit de *Crataegus azarolus* L. en utilisant la CCM et l'HPLC.

- Le dosage du contenu en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins des différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L.
- L'étude de l'activité antimicrobienne des différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L.
- L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. en utilisant le test au DPPH et le test de blanchissement du -carotène.

Chapitre I

Etude bibliographique

I. Revue sur l'espèce *crataegus azarolus* L.

1. Généralités

1.1. Etymologie

***Crataegus azarolus* L.:** Azérolier ou Epine d'Espagne, en arabe Zaaroura, nommé par les anglophones Azarole Hawthorne.

***Crataegus* :** nom générique des Aubépines de la famille des Rosacées, désignant en latin « *Crataegon* » ou « *Crataegos* », l'Azerolier (*Crataegus azarolus* L.) peut être du grec (kratos) par allusion à la dureté du bois (Couplan, 2000).

Le nom botanique des aubépines est dérivé d'un terme qui chez Théophraste, désigne l'azerolier (Brosse, 2000). D'ailleurs son nom du genre « *Krataigos* », veut dire, fort résistant (Aymonin, 1993).

azarolus : de l'espagnol « *acerola* » qui désigne le fruit, lui-même emprunté à l'arabe « az-zou'rour »; ce sont donc probablement les arabes qui ont introduit l'Azérolier en Afrique du nord, puis en Espagne (épine d'Espagne), d'où il passa ensuite en France (Mazzocchi, 1999; Brosse, 2000).

L.: l'abréviation du nom du botaniste qui a été le premier à décrire la plante «Karl Van LINNE », (1707-1778) du Suède, qui a décrit plus de 8000 espèces et affecte à chacune d'elles un nom binominale. La plupart de ces espèces, appelées espèces linnéennes, restent valables de nos jours (Messaili, 1995).

1.2. Origine et Répartition

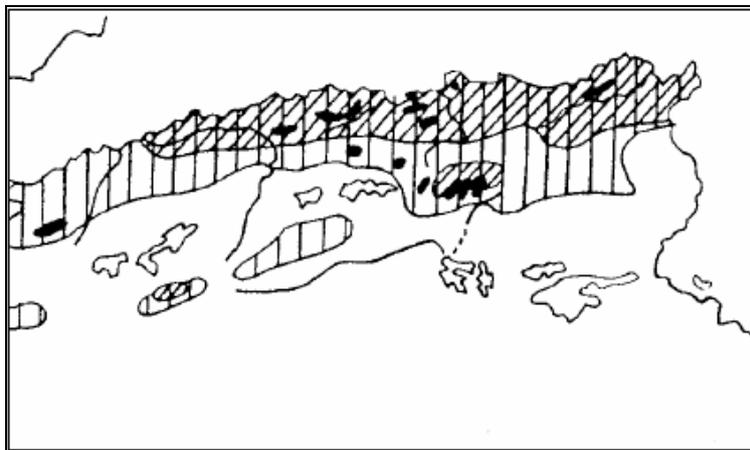
D'après Mazzocchi (1999) et Brosse (2000), l'azérolier est originaire de la méditerranée orientale, sud de l'Europe, Afrique du nord et de l'Asie mineure (de la Crète au Turkestan). L'aubépine, comprend plus de 200 espèces, répandue dans les zones tempérées de l'hémisphère nord (Ozcan et *al.*, 2005).

L'azerolier est présent à l'état sauvage dans tous les pays méditerranéens (Bignami et *al.*, 2000). Il est aussi cultivé en Europe, notamment en France surtout pour ses variétés à gros fruits (poletti, 1987; Brosse, 2000). Naturalisé en Amérique du nord et cultivé en région méditerranéenne (Grieve, 2003).

En Algérie, l'azerolier est localisé surtout dans le tell algéro-constantinois (**figure 1**), d'une façon spontanée en forme de forêts assez rares et parfois planté en haies ou en clôture dans les jardins en zone rurales. Les espèces existantes en plus d'azerolier en Algérie, on trouve : *Crataegus oxyacantha* L. (boumekherri ou babaadjina), *Crataegus monogyna* Jacq. (ssp de *C. oxyacantha*), *Crataegus maura* et l'hybride *azarolus* × *oxyacantha* = *C. ruscinonensis* Gren. et Blanc (Azerolier du Roussillon) (Gloaguen, 1982), ce dernier existe dans le constantinois, il diffère de *C. azaroluse* par ses pédicelles glabres et ses fruits plus petits (10-15mm) au lieu de 15 à 30 mm (Quezel et Santa, 1962).

Récemment, Serhane (2005) a pu confirmer la présence de l'azerolier dans les régions :

- La région de Constantine : Djebel El Meridj, El Khroub et Ain Abid ;
- La région de Guelma : Oued Zenati, Ras el Akba ;
- La région de Souk Ahras : Bouchegouf ;
- La région de Sétif : Bougaa, Ain Roua, Ain Kbira, Beni Aziz, djebel Boutaleb et Ouled Tebène ;



▨▨▨ *Crataegus azarolus* L. ▨▨▨ *Crataegus oxyacantha* L.

Figure 1. Aire de répartition du *Crataegus* en Algérie (Quezel et Santa, 1962).

1.3. Exigences climatiques

L'aubépine, arbuste très résistant, elle supporte toutes les rigueurs du climat: sécheresse, froid, vents violents, pluies torrentielles et même la pollution urbaine (Yves-Marie, 1988; Larousse agricole, 1992).

L'azérolier préfère les climats chauds, les régions ensoleillées et les sols secs, lourds et argileux, cet arbre peut se développer sur des sols alcalins voir calcaires et tolère la pollution atmosphérique (Jacamon, 1992; Ken, 2000; Milouane, 2000; Koyuncu *et al.*, 2007).

1.4. Classification botanique

D'après Messaili (1995), La position taxonomique de l'Azerolier est comme suit :

Règne : Végétal

Sous-règne : Cormophytes (plantes à axe ou plantes vasculaires)

Embranchement : Spermaphytes (plantes à graines)

Sous-embranchement : Angiospermes (plantes à fruits)

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Dialypétales (Choripétales)

Série : Calciflores

Ordre : Rosales

Famille : Rosacées

Tribu : Pirées

Genre : *Crataegus*

Espèce : *Crataegus azarolus* L.

Cette espèce appartient à une famille très importante en agriculture; elle renferme la plupart de nos arbres fruitiers. Les **Rosacées**, en général sont divisées en deux grands groupes; les multicarpellées et les **paucicarpellées**. Ce dernier comprend quatre tribus : Spirées, Prunées, **Pirées**, Chrisobalanées.

Au **Pirées**, appartient les Genres : *Pyrus*, *Cydonia*, *Eriobotrya*, ***Crataegus***, *Cotoneaster* et *Mispilus*.

Crataegus, Aubépine est une des Rosacées spontanées d'Algérie (Messaili, 1995; Quezel et Santa, 1962).

1.5. Description de l'espèce

L'azerolier ou épine d'Espagne arbuste ou arbrisseau (4-6m), plus rarement petit arbre (jusqu'à 12m). Écorce lisse et gris clair, devenant brunâtre avec gerçures. Rameaux pourpres foncés, peu épineux (parfois sans épines), les jeunes blanchâtres cotonneux, bourgeons globuleux.

Feuilles caduques, alternes, à pétiole poilu-cotonneux (au moins à la base), de 2 à 5 cm de longueur, en forme d'éventail profondément divisées en 3-5 lobes entiers ou peu dentés, poilus, de couleur verte blanchâtre en dessous (figure2).



Figure 2. Arbre et fruits du *Crataegus azarolus* L.

www.comune.fe.it (consulté le 21 mars 2009)

Fleurs blanches ou rosées (avril-mai), odorantes, en bouquets terminaux en inflorescences denses, de 10 à 20 petites fleurs à pédoncules velus-cotonneux. Sépales à-peu-près aussi larges que longs, à deux styles (parfois un seul style).

Fruits assez gros (azeroles) mûrissent en Septembre Octobre ressemblât à des pommes miniature, de forme ovoïde 1,5 à 2 cm de diamètre, rouge vermillon ou jaunâtre vire au blanc crème, à la chair pulpeuse parfumée, d'un goût acidulé, agréable, à 2 noyaux osseux, planes à la face intérieure, parfois trois noyaux triangulaires rainurés, ou un seul noyau entier (Fournier, 1952; Quezel et Santa, 1962 ; Huxley, 1974 ; Olegpal, 1974 ; Pokorny, 1975; Gloaguen, 1982 ; Yves-Marie, 1988 ; Bosse, 2000; Espiard, 2002).

2. Composition chimique

Plusieurs travaux ont été réalisés pour déterminer la composition chimique de l'aubépine afin d'expliquer son pouvoir traitant et ses applications médicales et pharmaceutiques.

L'aubépine possède un potentiel énergétique et nutritionnel non négligeable confirmé par les travaux de plusieurs chercheurs, ceux d'Ozcan et *al.*, (2005) sur des espèces Turque de *Crataegus*, a achevé aux résultats présentés dans le **tableau I**.

Tableau I. Propriétés biochimiques de la pulpe de *Crataegus spp*
(Ozcan et *al.*, 2005)

Fraction	teneur
Humidité	64.26%
Protéines	2.48%
Lipides	0.87%
Cellulose brute	4.67%
Cendres	2.28%
Energie	34.02 (Kcal/g)

Les fruits de l'azérolier contiennent 15.9% des sucres totaux, les oses simples majoritaires comme le fructose, glucose et rhamnos (Dzhangaliev, 2002).

Selon les travaux de Bignami et *al.*, (2000) sur plusieurs variétés de *Crataegus azarolus* L., montrent la richesse en saccharose de quelques variétés et son absence chez certains. Ces fruits sont aussi riches en polysaccharides : cellulose et pectine (Baba Aissa, 1999).

Selon l'étude réalisée par Saadoudi, (2008) concernant la fraction glucidique de l'azérole algérien provient de la région de Mila, les sucres solubles sont d'une teneur de 9.86% de la matière sèche, où 3.03% présente des sucres réducteurs et 6.83% du saccharose. Concernant les polysaccharides, cette espèce renferme 6.86% de pectine et 11.97% de cellulose, de la matière fraîche du fruit. Son apport énergétique est de 37.98 Kcal (Saadoudi, 2008).

Le contenu des fruits secs d'azérolier en aminoacides totaux varie entre 3 à 6%, caractérisé par des acides aminés aromatiques (Chang et *al.*, 2006).

Les lipides sont présents en trace (Brunetone, 1999), le travail de Ferhat, (2008) sur l'azérole de la région de N'gaous aboutit au contenu de 0.67% matière grasse par matière

sèche. D'où 1.32% de cette matière sont des lipides insaponifiables, les acides gras dominants qui sont l'acide oléique et l'acide linoléique.

Selon

Concernant les éléments minéraux, le **tableau II** présente les principaux éléments de la partie charnue de *Crataegus spp* (Ozcan et al., 2005) et ceux trouvés par Boudraa, (2008), concernant, *Crataegus azarolus* L. de la willaya de Batna.

Tableau II. Teneur en éléments minéraux des fruits de *Crataegus*
(Ozcan et al., 2005; Boudraa, 2008)

Élément	Teneur (ppm)	
	Ozcan et al., (2005)	Boudraa, (2008)
Ca	3046.37±199.90	4349.6±0.00
P	1477.88±53.15	131.1±14.8
K	13531.96±501.38	2502.6±17.0
Mg	1502.55±120.06	4746.9±4.9
Na	312.18±13.39	137.0±0.00
Fe	32.77±2.46	45.6±7.2

L'aubépine est caractérisée par sa richesse en acides organiques (3-6%), tels que l'acide caféique, malique, tartrique, citrique et chlorogénique (Chang et al., 2006; Kjaer et al., 2006). L'augmentation de ces acides permet de stabiliser les substances phénoliques au cours du stockage (Brunetone, 1999 ; Chang et al., 2006). Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. D'où, les composés phénoliques déterminent également la saveur des fruits. Les flavonoides sont responsables de l'amertume des fruits attardés (citrus surtout) et peuvent donner naissance par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée. Les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs (Dubois et al., 1977). Les anthocyanes et certains flavonoides participent à la coloration des fruits mûrs (Spignoli et al., 1999).

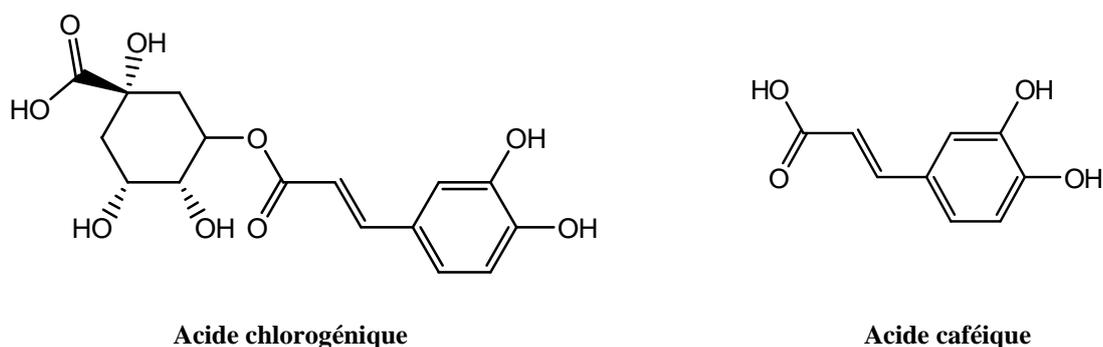


Figure 3. Structure chimique des acides phénoliques de l'aubépine.

Les analyses réalisées par Hadjimitsi et Zabetakis (2005) sur la pulpe des azéroles ont permis la détermination de quarante quatre composés volatils dominés par les aldéhydes aliphatiques et aromatiques, les cétones, les alcools, les monoterpènes et les triterpènes.

Les études réalisées par Urbonaviciuté et *al.*, (2006) au moyen d'HPLC, ont démontré la présence des flavonoïdes tels que: vitexine, quercétine, hypéroside, procyanidines oligomères. Les extraits aqueux des azéroles sont très riches en flavonoïdes (Skerget et *al.*, 2005; Chang et *al.*, 2006)

Les majeurs métabolites secondaires de cette espèce sont des flavonoïdes (1-2%) et des proanthocyanidols (2-3%) (Bruneton, 1999; Degenring et *al.*, 2003 ; Ercicli et *al.*, 2004 ; Lijuan et *al.*, 2005, Valls et *al.*, 2007).

On rencontre de la rutine, hypéroside, orientine, vitexine, et leur dérivé vitexine-2''-O- rhamnoside (flavonoïde principal des fleurs), acétyllevitexine-2''rhamnoside (accompagné chez quelque espèce) (Rita Bilia et *al.*, 2007). Dans l'inflorescence, des flavonoïdes glycosides essentiellement quercétol-3 galactoside, hypéroside, spiréoside et rutoside sont présents (Bruneton, 1993 ; Bruneton, 1999 ; Fong et Bauman, 2002). Selon Dacosta (2003), les baies d'aubépine contiennent des flavanones, précisément la naringine (naringénine-3 rhamnoglucose).

Dans les feuilles, les proanthocyanidines sont caractéristiques ; procyanidol di, tri, tétra et oligomères d' (-) épicatechine et /ou (+) catéchine, avec des liaisons de type (4 →8), (4 →6) (Bruneton, 1999). Selon Svedström et *al.*, (2002a, 2002b), les procyanidines représentent 0,2% de la matière sèche des azéroles et ont identifié deux oligomères procyanidines; un trimère: épicatechine (4 → 8) épicatechine (4 → 6) épicatechine et un pentamère constitué d'unités (-) épicatechine liées par des liaisons (4 → 8).

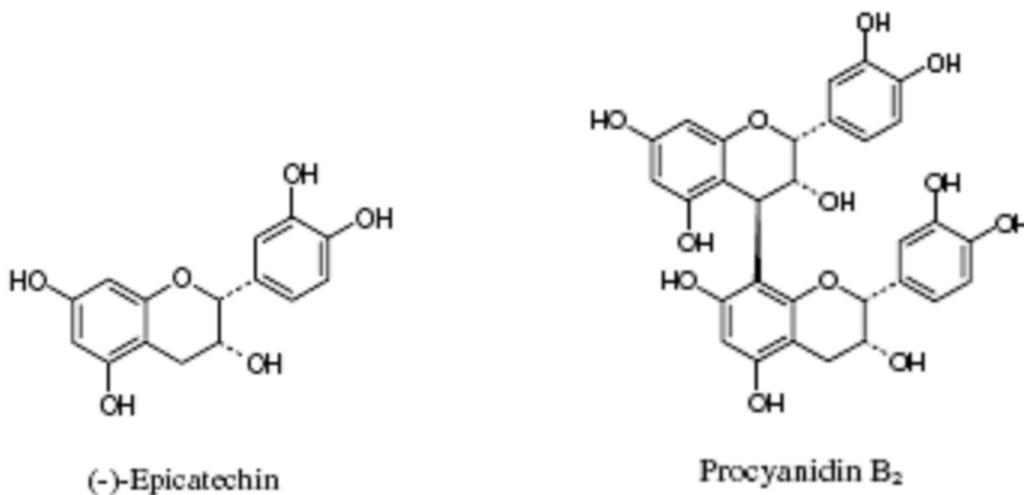
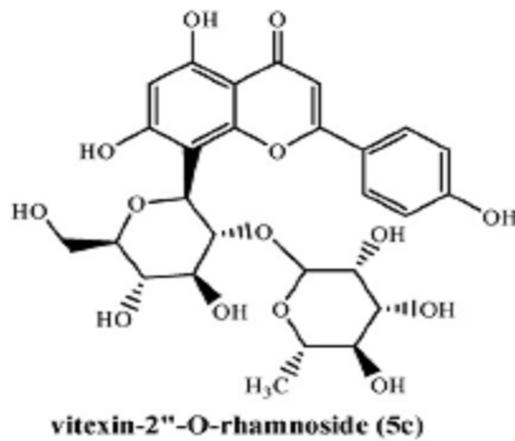
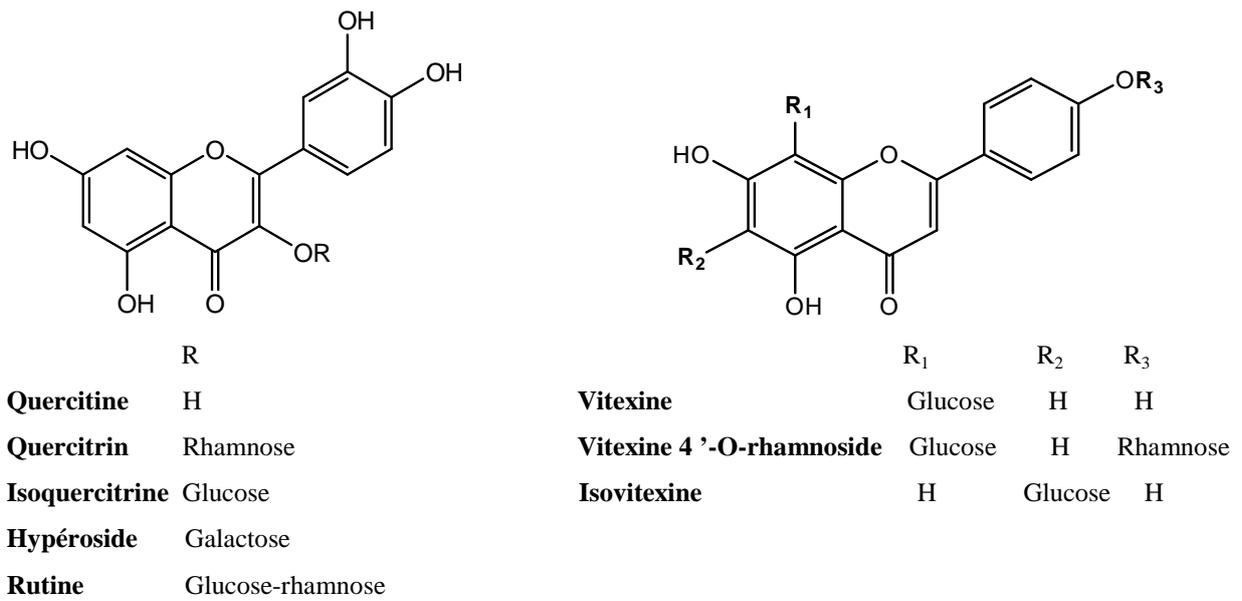


Figure 4. Structure chimique des majeurs Flavonoïdes et procyanidol de l'aubépine.

Les flavonoïdes et les oligomères procyanidiniques sont surtout dans les feuilles et les fleurs, mais ils sont plus faibles dans les fruits : environ 0.1-0.5% flavonoïdes, ainsi la vitexine et la vitexine 2''-rhamnoside ne sont présents qu'en traces (Wichtel et Anton, 1999).

Les constituants non phénoliques sont les acides triterpéniques pentacycliques de (0.5-1.4%), comme l'acide ursolique, l'acide oléanolique et son dérivé le 2- hydroxy connu sous le nom de l'acide crataegolique sont parmi les composés caractéristiques des *Crataegus* (Chang et *al.*, 2002 ; Fong et Bauman, 2002).

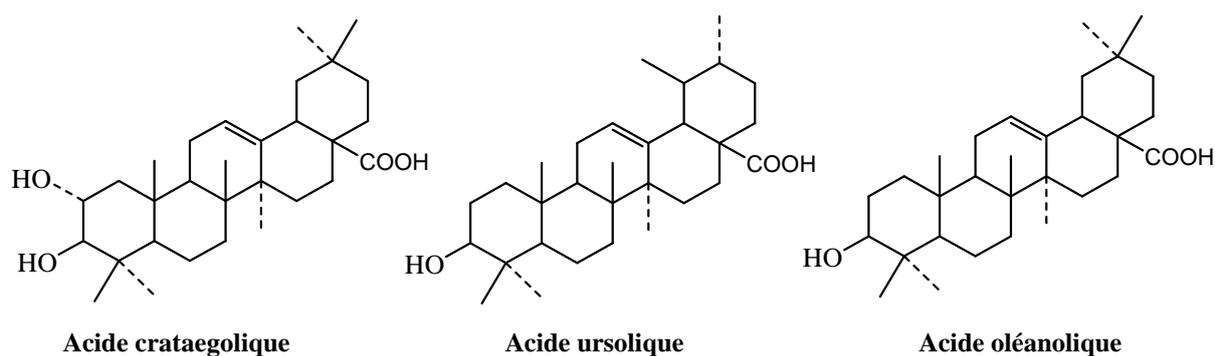


Figure 5. Structure chimique des acides triterpéniques de l'aubépine.

D'après Rose et Treadway (1999), les constituants thérapeutiques principaux qui ont été isolés de l'aubépine sont des flavonoïdes et des procyanidines. D'autres constituants incluent la catéchine, les triterpénoïdes, les acides carboxyliques aromatiques, les dérivés aminés et de purine et divers autres composés (Lacoste, 2006).

3. Propriétés pharmacologiques

En médecine Chinoise, l'aubépine est employée depuis environ 650 ans avant l'ère chrétienne, notamment pour traiter les troubles cardiovasculaires (Croxtton et Sparks, 2002 ; Chang et *al.*, 2003).

En Algérie ; les populations algériennes utilisent l'azérolier depuis longtemps pour des soins divers (Abdelguerfi, 2003).

Vers la fin du 19^{ème} siècle, les médecins européens commencèrent à expérimenter l'aubépine comme médicament pour les maladies cardiovasculaires (Brothers, 1917 ; Rose et Treadway, 1999 ; Lacoste, 2006). Aujourd'hui, la plante connaît une grande vertu, elle entre dans la composition de plus de 200 préparations médicinales (Lacoste, 2006). Elle est généralement associée à d'autres espèces: passiflore, valériane, voire tilleul ou mélisse (Bruneton, 1999).

Les fruits et les feuilles de l'aubépine ont été considérés comme bon remède pour les douleurs de l'appareil digestif et urinaire (Rose et Treadway, 1999). Elle est antispasmodique, astringente, diurétique, fébrifuge, hypotensive, sédative (Fernandez, 2003).

Les fleurs de l'azerolier régularisent les rythmes cardiaques, la circulation sanguine, l'hypertension artérielle et calment le système nerveux (Polleti, 1987 ; Foster et Duke, 1990 ; Belouad, 2005). Comme ils agissent sur les symptômes assez variables : irritabilité, insomnie, gêne de la respiration, vertige, sensation d'angoisse (Belouad, 2005).

Les feuilles ont la réputation de traiter les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète et la faiblesse sexuelle (Ljubuncic et al., 2005)

Bien avant le siècle dernier, ses remarquables propriétés tonicardiaques avaient été reconnues (Ody, 1995 ; Lacoste, 2006). Les récentes analyses ont confirmé ces propriétés :

- Selon Ammon et kaul (1994a, 1994b), les extraits aqueux et alcooliques des azéroles ont des effets très bénéfiques sur le cœur, la circulation sanguine et la décontraction vasculaire sur l'aorte (Viereling et al., 2003).
- La racine, la feuille et la fleur de *Crataegus* contiennent tous des composés cardioactifs (McGuffin, 1997).
- Selon les études de Sun et al., (2002) les extraits de *crataegus* ont montré des effets cardioprotecteurs via l'activité de piéger les radicaux et d'inhiber l'élastase.
- Les études signalées par Ozcan et al., (2005) ont confirmé le potentiel cardiotonique de ces fruits car ils sont employés pour le traitement de la faiblesse du cœur, plus particulièrement si ceci est accompagné par une hypertension.
- Les fruits sont employés pour le traitement de diverses maladies cardiovasculaires, y compris l'insuffisance cardiaque, l'hypertension et l'athérosclérose (Veveeris, Koch et Chatterjee, 2004 ; Chang et al., 2006).

Depuis longtemps apprécié par leur astringence, les azéroles permettent de réduire les diarrhées et les maux du cycle mensuel, d'assouplir la peau et de traiter les problèmes de l'hydropisie. Ils ont aussi des propriétés diurétiques (Ody, 1995 ; Ozcan et al., 2005). Les fruits du *Crataegus azarolus* L. sont devenus parmi Les remèdes de l'hypertension orthostatique (Kroll et al., 2005).

Les analyses effectuées par Zhang et al., (2002) lui ont permis de déduire que les extraits aqueux et éthanoliques des azéroles diminuent le taux de cholestérol dans le sang en favorisant une sécrétion importante des acides biliaires. Dans une autre étude sur l'homme, concernant des volontaires diagnostiqués en tant que hyperlipidimiques, après un mois de

consommation d'aubépine, les niveaux moyens de cholestérol et de triglycérides du sérum ont diminué de 7.31 ± 1.04 au 6.19 ± 1.56 mmol/l et de 1.93 ± 0.92 au 1.75 ± 0.96 mmol/l ($P < 0.001$) (Zapatero, 1999). La teinture de *Crataegus* empêche également l'accumulation du cholestérol dans le foie en augmentant la dégradation de cholestérol en acides biliaires et simultanément par suppression de la biosynthèse du cholestérol (Rajendran et al., 1996).

L'aubépine renforce la contraction du myocarde (Gruenwald., 1998). Les extraits procyanidines de l'aubépine aident à réduire les niveaux de cholestérol et à diminuer la taille des plaques athérosclérotiques. Cette action est le résultat de la capacité de l'aubépine à maintenir l'intégrité de la matrice (collagène) des parois des vaisseaux, les rendant plus résistants, ce qui peut aider à empêcher le développement et la progression de la plaque athérosclérotique (Rose et Treadway, 1999). Les procyanidines oligomères sont responsables des actions cardiaques des *Crataegus*. Ils augmentent l'utilisation de l'oxygène par le cœur et aident le métabolisme enzymatique (Davies, 2000).

Les proanthocyanidines favorisent la relaxation et la dilatation des artères coronariennes, de ce fait augmentent l'irrigation cardiaque. Ils sont aussi très antioxydants, stoppent ou diminuent la détérioration des vaisseaux sanguins (Chevallier, 1996). Les extraits hydro-alcooliques et les procyanidols augmentent le débit coronarien (expérimenté sur organe isolé et de même *in vivo*). L'action impliquerait une inhibition de la phosphodiesterase de l'AMPc et l'on a mis en évidence une activité sur les récepteurs α -adrénergiques (Bruneton, 1999).

Les amines cardiotoniques: triméthylamine ; dans les fleurs seulement, phénylalanine et tyramine permettent une meilleure circulation, réduisent l'hypertension et donc maintiennent l'équilibre cardiaque (Davies, 2000).

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

Les extraits de *Crataegus* ont montré une basse toxicité avec une dose létale LD₅₀ égale à 25mg/Kg (Ammon et Handel, 1981).

Selon Bruneton (1999), La drogue n'est pas toxique en aigu, on ne lui connaît ni effets secondaires majeurs, ni interactions médicamenteuses, ni contre-indication.

4. Autres utilisations

Les bouquets de fleurs blanches, roses ou rouges parsemées d'étamines noires, le vif feuillage automnal et les baies écarlates sont autant de présents que nous offrent les charmantes aubépines (Yves-Marie, 1988). Des formes et des cultivars divers d'aubépines sont recherchés pour l'ornementation et la beauté de leur floraison (Corbin, 1992). Elle est également utilisée comme porte greffe, produit des hybrides entre Aubépines et Néflier (Timbal, 1986; Beloued, 2003).

Dans la nature, il fournit un abri excellent et des emplacements pour beaucoup de petits animaux. Ces baies constituent une bonne source alimentaire importante pour les oiseaux, les rongeurs et autres mammifères, surtout en hiver (Croxtton et *al.*, 2002; Gamlin, 1993).

Selon Serhane (2005), en Algérie, les azéroles sont considérés comme source de revenu vu leur commercialisation. Les fleurs sont considérées comme source nourricière pour les abeilles, en période de floraison. L'azerolier est un arbre d'alignement ou de clôture défensive autour des prairies, armé d'épine interdit l'accès du bétail (Iserin, 2001). Un plant de reboisement et de lutte contre l'érosion.

Plusieurs études ont confirmé le potentiel des fruits *crataegus azarolus* L. en tant que bonne source d'antioxydants vu leur richesse en procyanidines, en flavonoïdes (flavones) (Skerget, 2005 ; Svedström, 2006). Les feuilles et les sommités fleuries sont utilisées pour la préparation du thé et des tisanes, les fleurs pour l'aromatisation et la décoration des sirops, du dessert et des salades (Uphof, 1959; Lust, 1983; Kunkel, 1984; Galle, 2005).

Beaucoup de produits obtenus à partir de la pulpe du fruit ; les confitures, les marmelades, les gelées, les sirops, les jus, les boissons alcooliques et la farine, comme il rentre dans la préparation de vinaigre. Les différentes transformations diminuent l'apport vitaminique de ce fruit et la consommation à l'état frais reste préférable (Aymonin, 1993; Theiss, 2002; Ercisli et *al.*, 2004; Ljubuncic et *al.*, 2005; Koyuncu et *al.*, 2007; Vivar-Vera et *al.*, 2007).

Longtemps, chez les anciennes civilisations, l'aubépine a eu la réputation d'accroître la fertilité et la fidélité conjugale, assure la protection et le bonheur des nouveaux nés, c'est l'arbuste sacré des fées (Iserin, 2001; Lacoste, 2006).

II. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires, substances très variées qui ne sont pas impliquées dans les activités fondamentales des organismes. Ils sont dans leur grande majorité issus de plantes supérieures. Leurs rôles physiologiques demeurent assez mal connus, ils semblent jouer un rôle dans la défense des végétaux contre les infections des pathogènes (Amiont, 1990 ; Treutter et Feucht, 1990) et également jouer un rôle dans la protection contre les UV (Awad et *al.*, 2000). Parmi ces métabolites ; les polyphénols, les saponines, les terpénoïdes, les alcaloïdes, ...etc. dont certains possèdent plusieurs vertus thérapeutiques.

Les polyphénols caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portent des groupements hydroxyles libres ou glycosylés. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006). Les principales classes des composants phénoliques sont les acides phénoliques (acide caféique, acide ferulique, acide chlorogénique...), les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines (King and Young, 1999 ; Tapiero et *al.*, 2002). Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives (King et Young, 1999), largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antimicrobiens (Bahorun, 1997 ; Cetkovic et *al.*, 2008).

Les métabolites secondaires majoritaires du fruit de *Crataegus azarolus*, sujet d'étude, se présentent en flavonoïdes (flavones, flavonols) et en tanins condensés d'unité de base flavanol (flavan-3-ol : épicatechine), d'où l'aubépine est considéré comme drogue à proanthocyanidols dimères (Bruneton, 1999).

1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (*flavus*, jaune en latin) représentent une large gamme de composés naturels, appartenant à la famille des polyphénols, considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de la couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005).

1.1. Structure chimique et classification

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux cycles aromatiques en C₆ (cycle A et cycle B), relié par un hétérocycle en C₃ (cycle C) (Bruneton ; 1999 ; Pietta, 2000) **figure 6**.

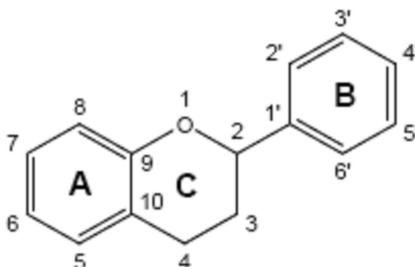


Figure 6. Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (Pietta, 2000), dont les plus importantes sont les flavones, les flavanones, les flavonols, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanidines. La **figure 7** résume les deux voies shikimate et acétate, principales de la biosynthèse des flavonoïdes ainsi que leurs différentes classes (Remesy et *al.*, 1996).

Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants (groupement hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B (Heim et *al.*, 2002). Dans les flavonoïdes au sens strict, le deuxième cycle benzène (B) se lie à l'hétérocycle (C) en position 2. Lorsque la liaison s'effectue en position 3, les composés résultant sont des isoflavonoïdes. En plus l'hétérocycle (C) peut être pyrone (flavon) ou son dihydrodérivé (flavanone). La fixation d'un groupement hydroxyle sur le carbone 3 dans les deux cas précédents constitue respectivement les flavonols et les flavononols (Birt et *al.*, 2001). A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont glycosylées, l'unité glycosidique la plus commune est le glucose mais parfois elle peut être Glucorhamnose, galactose, arabinose ou rhamnose. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone ou génine (Heim et *al.*, 2002)

Voie des shikimates

voie d'acétate

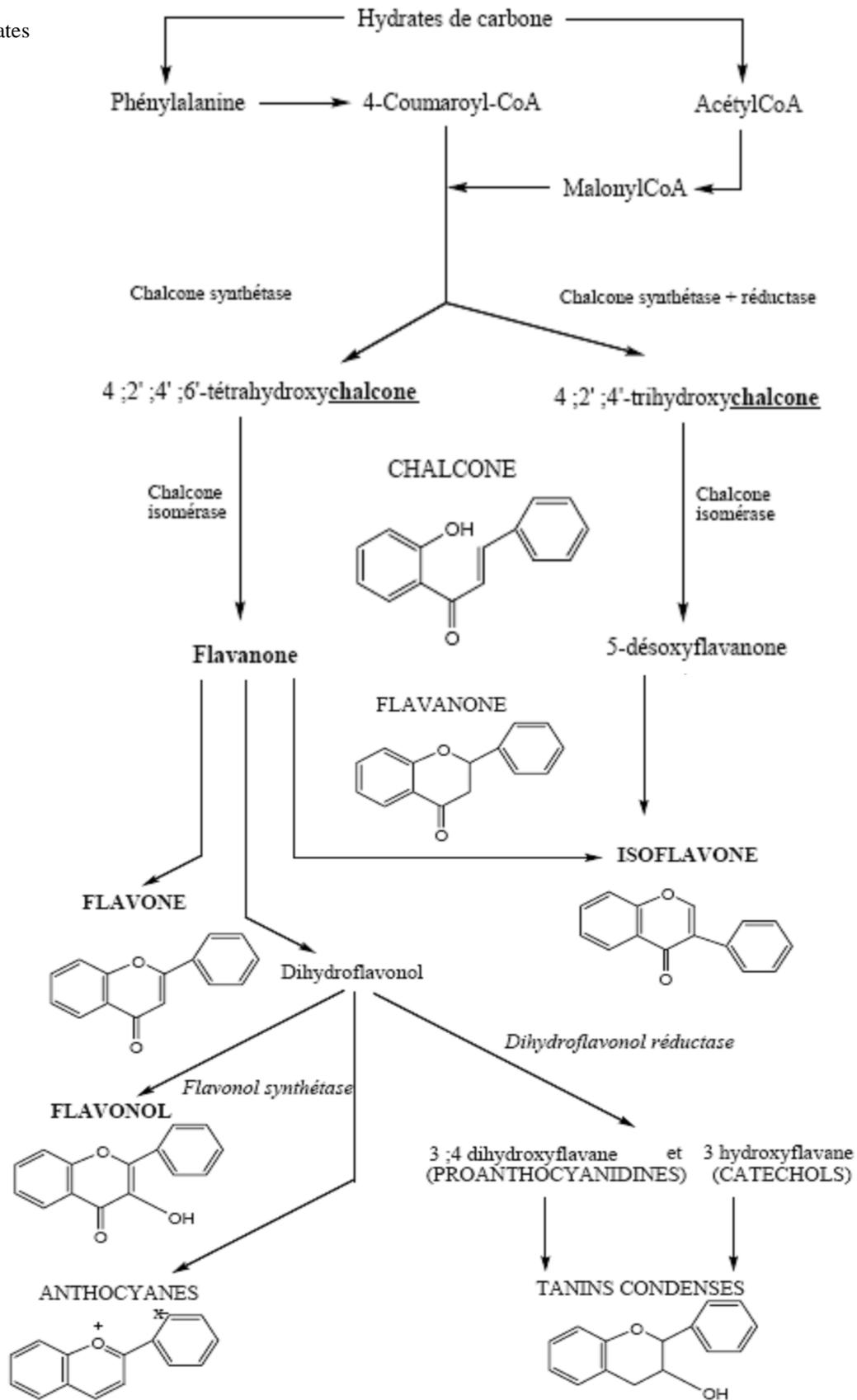


Figure 7. Voie de biosynthèse de différentes classes des flavonoïdes (Remesy et al., 1996)

1.2. Localisation et distribution

Dans le règne végétal, les flavonoïdes sont rencontrés chez les végétaux supérieurs, on les trouve en abondance dans les familles : Polygonacees, Rutacees, Legumineuses, Apiacees et Asteracees (Hadi, 2004). Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes feuilles, ainsi que dans les téguments externes des fruits. On estime que la prise moyenne des flavonoïdes par l'homme s'étend de 25 mg à 1 g/jour (Wang et Mazza, 2002). De nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavones, flavonols et flavanones (**tableau III**) (Merfek, 2003). Lugasi et *al.*, (2003) ont étudié la composition en flavonoïdes de quelques fruits et légumes (**tableau IV**) et ils ont conclu que la teneur des aliments en flavone et en flavonol est fortement influencée par des facteurs tels que : la variation du type, la croissance, la saison, le climat et le degré de maturité.

Tableau III. Distribution nutritionnelle des flavonoïdes (Merfek, 2003)

Tableau IV. Teneur en flavonoïdes de quelques fruits et légumes (Lugasi et *al.*, 2003)

Flavonoïdes	Aliments	Echantillon végétal	flavonoïdes totaux (poids à l'état frais mg/Kg)
lavanones		légumes	
naringénine	fruit du genre <i>citrus</i>	Brocoli	46.2
		Chou blanc	17.7
Flavones		Oignon rouge	124.1
Chrysin	peau de fruits	Oignon pourpre	195.6
apigénine	persil, thym, romarin	Épinards	338.6
lutéoline	persil, céleri	Persil feuilles	80.8
		Céleri feuilles	402.8
Flavonols		fruits	
kempférol	radis, brocoli, thé noir	Pastèque	18.4
quercétine	oignon, pomme, olive, tomate	Cassis	52.8
myricétine	canneberge, vin rouge	Fraises	1003
		Raisin	38.7
Flavan-3-ols		Noix	4565
épicatéchine	thé vert, thé noir	Kiwi	22.3
catéchine	thé vert, thé noir	Banane	22.8
épigallocatechine	vin rouge	Pomme	65.3
Anthocyanidols		Poire	24.7
cyanidol	cassis, myrtilles	Prune	23.3
malvidol	raisins, fraises, cassis	Abricot	11.5
apiginidol	framboises, fraise		

Concernant Le monde animal, on trouve des flavonoïdes dans la propolis des abeilles par exemple la chrisine, la quercétine et la galangine. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires (Merfek, 2003).

1.3. Activités biologiques des flavonoïdes

La principale propriété initialement attribuée aux flavonoïdes, est d'être vasculoprotectrice et venotonique (Bruneton, 1999). Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmaco biologiques comme entre autres des effets hypocholestérolémiant (Formica et Regelson, 1995) antiviraux, antimicrobiens, et anticancéreux (Narayana et *al.*, 2001 ; Seyoum et *al.*, 2006) antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépato protecteurs (Middleton et *al.*, 2000). Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels (Saija et *al.*, 1995).

1.3.1. Activité antioxydante

L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante, ce mécanisme est lié à la structure et à l'arrangement des groupements hydroxyles des flavonoïdes (Sokol-Letowska A et *al.*, 2007). Des études faites sur la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres ont montré que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- i. La structure ortho dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- ii. La double liaison C₂-C₃ en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- iii. La présence du groupe 3OH en combinaison avec la double liaison C₂-C₃.

A titre d'exemple, la quercétine satisfaite à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (Marfak, 2003 ; Balasundram, 2006).

À cause de leur faible potentiel redox, les flavonoides (Flav-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les EOR comme OH[•] et O₂^{-•}, les radicaux peroxy et alkoxy par transfert d'hydrogène (**figure 8**). Le radical aroxy résultant (Flav-O[•]) peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (Javanovic *et al.*, 1994).

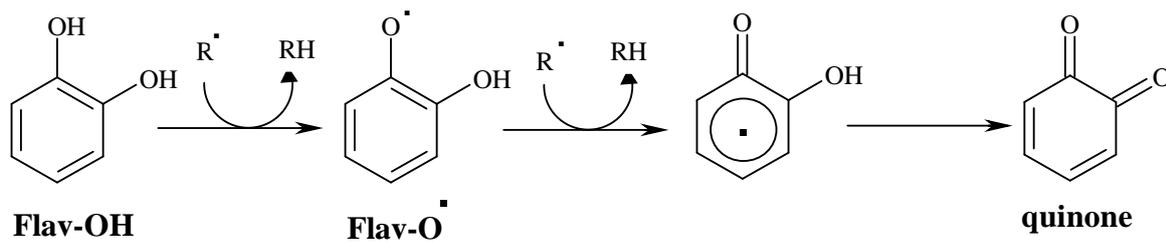


Figure 8. Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (Pietta, 2000)

Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques responsables de la production de radical hydroxyle (Fe et Cu), les sites potentiels pour la chélation de ces ions métalliques sont; i. un noyau catéchol sur le cycle B, ii. Les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C et iii. Les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (Pietta, 2000 ; Heim et *al.*, 2002).

L'inhibition des enzymes génératrices des EOR présente un autre mécanisme de l'activité antioxydante, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la xanthine oxydase et d'autres enzymes comme la protéine kinase C, cyclooxygénase et la lipooxygénase. Ceux qui possèdent une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (Pietta, 2000 ; Denciov et Afanas'ev, 2005).

1.3.2. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques, ils inhibent plusieurs enzymes intervenant dans divers mécanismes biologiques.

Ils inhibent l'histidine décarboxylase, l'élastase, l'hyaluronidase, ce qui permettrait de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire ; ils inhibent aussi d'une manière non spécifique la catéchol-O-méthyltransferase, ce qui augmenterait la quantité de la catécholamine disponible et donc provoquerait une élévation de la résistance vasculaire. En plus, les flavonoïdes inhibent la phosphodiesterase de l'AMP_C, ce qui pourrait expliquer leur activité anti-agrégante plaquettaire ; aussi, ils inhibent l'aldose réductase qui est impliquée dans la pathogénie de la cataracte (Bruneton, 1999). Par ailleurs, les flavonoïdes peuvent inhiber la promotion de tumeur à travers un effet inhibiteur sur la phosphoxylase C et la protéine kinase (Formica et Regelson, 1995 ; Kao et *al.*, 2007).

1.3.3. Activité cardiovasculaire

Les flavonoïdes sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (Bruneton, 1999). Ils sont des protecteurs des maladies cardiovasculaires, peuvent induire la vasodilatation et provoquent la relaxation des muscles lisses cardiovasculaires ce qui engendre une activité anti-hypertensive et des effets antiarrhythmiques (Formica et Regelson, 1995).

Les flavonoïdes protègent LDL de l'oxydation et par conséquent empêchent la formation des plaques athérosclérotiques, ils ont des effets antithrombotiques à travers l'empêchement de l'agrégation plaquettaire (Formica et Regelson, 1995).

1.3.4. Activité anti-inflammatoire

Les flavonoïdes ont un effet palliatif sur l'inflammation dû à l'inhibition de la libération de l'histamine et la synthèse des leucotriènes et comme piègeurs de superoxyde (Formica et Regelson, 1995).

Des études montrent que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique, qui conduit à la formation des prostaglandines et des leucotriènes médiateurs de l'inflammation et des manifestations allergiques (Landolfi, 1984).

1.3.5. Activités antimicrobienne et antivirale

Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase (Picman et al., 1995). D'autre part, plusieurs études ont montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *Staphylococcus aureus*.

L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie, une étude faite sur *Dianthus caryophyllus* a montré l'efficacité de ces flavonoïdes sur des souches fongiques (Galeotti et al., 2008). Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, il faut citer :

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes.
- Séquestration de substrats nécessaires à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
- L'inhibition du métabolisme microbien (Mila et Scalbert, 1994).

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales (Mahmood et *al.*, 1993). Mucsi et Pragai, (1985) ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus d'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMP cyclique dans les cellules infectées.

Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), aussi les flavonoïdes se sont avérés de bons inhibiteurs de transcriptase reverse (Spedding et *al.*, 1989). Autre étude a montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte. Enfin, les flavonoïdes restent susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1, cette enzyme permet l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte (Mahmood et *al.*, 1993).

2. Les tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles de masse moléculaire comprise entre 500-3000. Ayant la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides...) (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Ghestem et *al.*, 2001). Parmi les caractéristiques des tanins le goût d'astringence qui est une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (Peronny, 2005).

Le rôle biologique des tanins dans la plante est lié à sa propre protection contre les infections fongiques et bactériennes (Peronny, 2005), les insectes et les animaux herbivores (Khanbabaee et Ree, 2001).

2.1. Structure chimique et classification

Selon leur structure chimique les tanins sont classés en deux groupes :

2.1.1. Tanins hydrolysables

Ce sont des polyesters de glucose (ou de molécules apparentées) et d'un nombre variable d'acide phénolique qui est : soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tanins éllagiques (Bruneton, 1999 ; Ghestem *et al.*, 2001) (**Figure 9**).

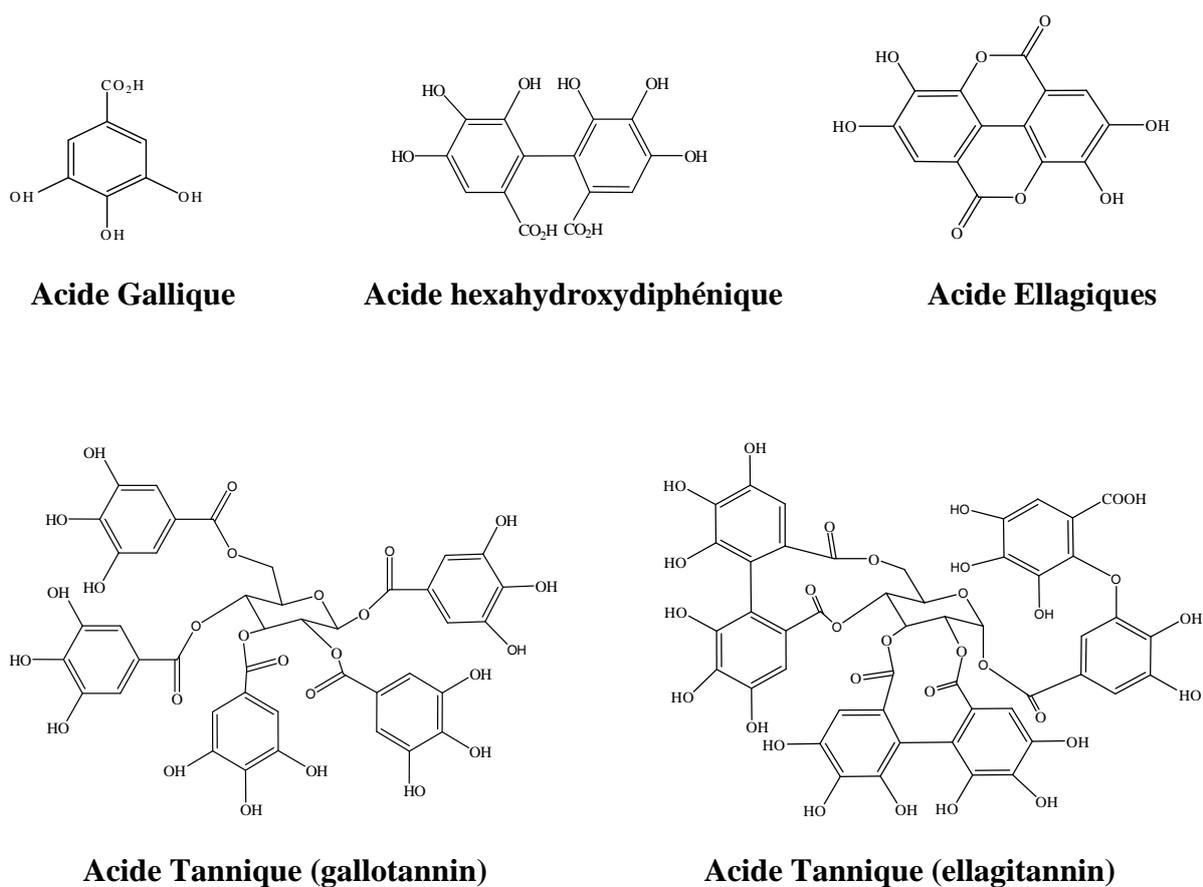


Figure 9. Structure des tanins hydrolysables et leur monomère (Bruneton, 1999).

2.1.2. Tanins condensés (proanthocyanidines)

Ce sont des dérivés non hétérosidiques, n'ayant pas tous des propriétés tannantes, résultant de la polymérisation d'un nombre variable d'unités flavane (flavan-3-ols), le plus souvent épicatechine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de cinquante unités (Ghestem *et al.*, 2001 ; Khanbabaee et Ree, 2001). Ces unités liées entre elles par une seule liaison carbone-carbone 4-8 ou 4-6 dans les proanthocyanidines de type B, ou par une liaison interflavanique double (C-4-C-8 ou C-4-C-6) et (C-2-O-C-7) dans les proanthocyanidines de type A (Bruneton, 1999 ; Vivas *et al.*, 2006) (**Figure 10**).

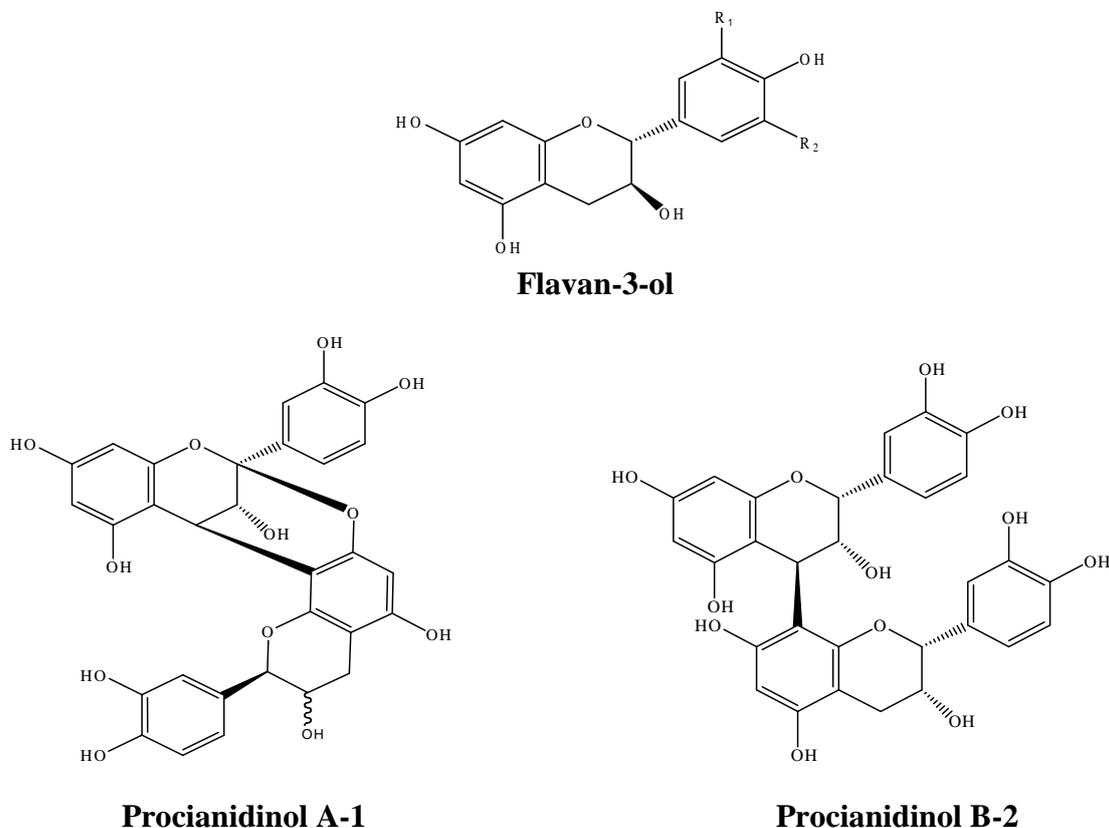


Figure 10. Structure des tanins condensés et leur monomère (Bruneton, 1999).

2.2. Localisation et distribution

Très répandus dans le règne végétal, Les tanins sont particulièrement abondants chez les Conifères, les Fagacée et les Rosacée (Ghestem *et al.*, 2001).

Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits, les racines, les graines) avec une accumulation fréquente dans les organes âgés surtout

l'écorce (Ghestem et *al.*, 2001 ; Khanbabae et Ree ,2001). Les tanins sont présents dans une variété de plantes utilisées dans l'alimentation notamment les céréales, les légumineuses et les fruits (sorgho, millet, orge, haricots secs, petits pois, caroube, pomme, mûre, canneberge, datte, raisin, aubépine, pêche poire, kaki, prune, framboise et fraise) (Peronny,2005).

2.3. Activités biologiques et thérapeutiques des tanins

Les tanins sont des molécules biologiquement actives, douées d'activités pharmacologiques remarquables et des effets caractéristiques sur la santé humaine (Chavan et *al.*, 2001 ; Okuda, 2005). Comme anti-inflammatoire, anticancérogénique, son potentiel peut être lié au propriété antioxydante qui apparaît importante dans la protection cellulaire des dommages oxydatifs (Yang et *al.*, 2000 ; Chung et Wei, 2001).

Les tanins dimères procyanidoliques, considérés comme responsables de l'activité inotrope cardiaque positive et coronarodilatatrice des sommités fleuries de l'aubépine ont aussi des propriétés proches de celles des flavonoïdes : augmentation de la résistance capillaire, diminution de la perméabilité capillaire, augmentation du tonus veineux, stabilisation du collagène, etc. (Bruneton, 1999).

Les tanins présentent une activité antiulcéreuse et antiparasitaire, en effet, la consommation des plantes à tanins peut affecter la biologie de certaines espèces de parasites intestinaux (Peronny, 2005).

2.3.1. Activité antioxydante des tanins

Les tanins ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation (Perret, 2001). Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples (Peronny, 2005).

De même, il a été démontré *in vitro* que les tanins sont plus actifs que les vitamines et que les procyanidines B-1 et B-3 étant des antioxydants pour l'acide linoléique, ils ont une activité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique et l' -tocophérol (De Bruyne et *al.*, 1999). Dans une autre étude faite sur la propriété du piégeage radicalaire, il a été remarqué que les procyanidines dimériques peuvent emprisonner 8 radicaux pyroxyles alors que l'acide ascorbique emprisonne un seul radical, et l' -tocophérol emprisonne deux radicaux (De Bruyne et *al.*, 1999).

Plusieurs propriétés structurales des tanins augmentent leur activité antioxydante:

- . La galloylation, préférentiellement en position 3' augmente la capacité du piégeage pour l'O₂' et OH'.
- . Le piégeage de O₂' est plus important pour les dimères procyanidines couplés par une liaison (4-8) que les dimères liés par une liaison (4-6) (De Bruyne et al., 1999).

2.3.2. Inhibition enzymatique

La fixation des tanins avec les protéines peut engendrer l'inhibition de plusieurs enzymes. Le blocage de la 5-lipoxygénase par la géraniine et la corilagine ; l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, de l'activation de la hyaluronidase, des glucosyltransférases des microorganismes impliqués dans la cariogenèse ; inhibition des topoisomérases par la sanguine H6 ou l'acide chébulagique ; inhibition de la protéines kinase C par les tanins éllagiques et les tanins complexes, les dimères procyanidoliques ont une activité inhibitrice sur l'histidine décarboxylase et l'élastase (Bruneton,1999) ; inhibition de l' -amylase salivaire humaine (Kandra et al., 2004).

2.3.3. Activité thérapeutique due à l'astringence

Par voie interne, ils exercent un effet antidiarrhéique (Bruneton, 1999), qui est du à l'inhibition de la motilité intestinale (De Bruyne et al. 1999).

Par voie externe, les tanins imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; ils ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. En limitant les pertes en fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlure (Bruneton, 1999). Sur les blessures, les tanins induisent la cicatrisation par différents mécanismes cellulaires, en favorisant la contraction de blessure, l'augmentation de la formation des vaisseaux capillaires et des fibroblastes, induisant la prolifération des kératinocytes (Lopes et al, 2005).

2.3.4. Activités antimicrobiennes des tanins

De nombreuses études ont montré l'activité antibactérienne des tanins. Ces molécules ont été rapportées comme bactériostatique ou bactéricide sur plusieurs souches bactériennes (Chung et Wei, 2001).

Chung et Wei (2001) ont trouvé que l'acide tannique a inhibé la croissance des bactéries des aliments et des bactéries intestinales humaines comme : *Alealigenes faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *K pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Pseud fluorescens*, *Salmonella enteritidis*, *S paratyphi*, *S typhimurium*, *Staph aureus*, *Strept faecalis*, *Strept pyogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium clostridiiforme*, *C perfringens*, *C paraputrificum*, *Enterobacter cloacae*, et *Salmonella typhimurium*.

L'activité antivirale des tanins est due à la fixation des molécules des tanins à l'enveloppe protéique du virus ou la membrane de la cellule hôte et par conséquent l'inhibition de l'adsorption et la pénétration virale. Cependant, dans certains cas la fixation cause seulement des changements mineurs à la surface virale, la pénétration reste mais l'enlèvement de l'enveloppe virale est inhibé. Plusieurs types de virus sont inactivés par les tanins, le virus herpes simplex (HSV-1, HSV-2) est inhibé par les tanins hydrolysables et les tanins condensés galloylés de plusieurs extraits des plantes (De Bruyne et *al.*, 1999).

L'acide tannique est capable d'inhiber la réplication du virus d'influenza, *Coxsackievirus*, *echovirus*, *reovirus* et du virus d'herpes (Chung et Wei, 2001).

Les oligomères proanthocyanidins présentent une activité antivirale contre le virus respiratoire syncytial, virus d'influenza A et le virus para influenza, en outre l'hépatite A et B. Les tanins ont un autre effet inhibiteur de la réplication virale, c'est l'inhibition de la transcriptase inverse des rétrovirus comme virus (HIV) ; cette inhibition est influencée par la galloylation, l'étendue de l'oligomérisation, la différence de la liaison inter-flavan, la stéréochimie de la fonction 3 hydroxyle (De Bruyne et *al.*, 1999).

Plusieurs types de champignons sont inhibés par les tanins. Les champignons filamenteux comme *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium cupreum*, *Collectotrichum graminicola*, *Coniphora olivacea*, *Coriolus versicolor*, *Crinepellis perniciososa*, *Fomes annosus*, *Gloeophyllum trabeum*, *Merulius lacrymans*, *Penicillium*, *Poria monticola*, *Trametes hirsuta* et *Trichaderma viride* sont inhibés par des différentes préparations de tanins.

De même, différentes levures incluant *Saccharomyces crevisiae* sont aussi sensibles aux tanins (Chung et Wei, 2001).

III. Stress oxydatif et antioxydants

Plusieurs réactions biologiques impliquent l'oxydation de substrats où l'accepteur d'électrons est l'oxygène moléculaire (O_2). Ces types de réactions sont catalysés par un groupe d'enzymes métalloprotéines appelées "oxydases". Plus de 90% d'oxygène consommé par les cellules des mammifères est catalytiquement réduit par quatre électrons pour produire deux molécules d'eau. Cependant, l' O_2 peut être réduit par moins de quatre électrons, en présence de certaines oxydases, donnant ainsi naissance à des espèces oxygénées partiellement réduites et hautement réactives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou espèces oxygénées réactives (EOR) (Grisham et McCord, 1986).

1. Les radicaux libres

1.2. Définition

Un radical libre peut être une molécule ou un atome neutre ou chargé, ayant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataire), ce qui le rend extrêmement réactif. Exemple : l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$, d'où le symbole \bullet indique la présence d'un électron célibataire, le signe $-$ une charge électronique négative (Dacosta, 2003 ; Vansant, 2004).

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres primaires de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, radical alkoxyde, etc....) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires (radicaux secondaires) dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote (Bartosz, 2003 ; Halliwell et Whiteman 2004). Le tableau V, résume les divers EOR.

Tableau V. Espèces réactives de l'oxygène (Kohen et Nyska, 2002)

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2
Radical hydroxyle OH^{\bullet}	Peroxyde organique $ROOH$
Radical peroxyde ROO^{\bullet}	Acide hypochlorique $HOCl$
Radical alkoxyde RO^{\bullet}	Oxygène singulet 1O_2
Monoxyde d'azote NO^{\bullet}	Peroxyde d'azote $ONOO^-$

1.2. Principaux espèces oxygénées réactives

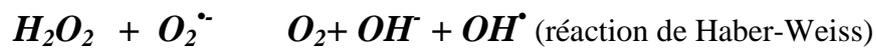
- **L'anion superoxyde:** la molécule d'oxygène, en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde. Cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions (Hadi, 2004).



Ce radical est peu réactif mais représente le précurseur d'espèces plus agressives. Avec l'apport d'un autre électron, il devient un ion peroxyde ($O_2^{\bullet 2-}$) qui avec l'ajout de deux ions hydrogène ($2H^+$) produit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Dacosta, 2003).

- **Le radical hydroxyle:** est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de $O_2^{\bullet -}$ et de métaux de transition sous la forme réduite, comme le présente la réaction de Haber-Weiss, ou par des voies qui ne font pas appel à l'anion superoxyde (réaction de Fenton) (Grisham et Gramger, 1988; Sorg, 2004).

Fe(III)/Cu(II)



Le (OH^{\bullet}) est très réactif vis-à-vis des structures organiques (protéine, lipide, ADN) entraînant ainsi de multiples dommages, il joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique (Hadi, 2004).

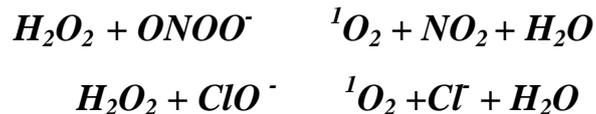
- **Le monoxyde d'azote:** est produit chez les organismes supérieurs par l'oxydation d'un des atomes N terminal de la L-arginine, selon la réaction catalysée par l'enzyme nitrique oxyde synthase (NOS) (Sorg, 2004).



Cette production physiologique joue un rôle majeur dans la neurotransmission. Mais à forte concentration, le NO^{\bullet} devient néfaste pour les cellules notamment en réaction avec le $O_2^{\bullet -}$ qui donne naissance à un puissant oxydant le peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$). Ce dernier peut, secondairement, se décomposer en d'autres oxydants comme le NO_2 et le OH^{\bullet} (Donsiov et Afanas'ev, 2005).

- **L'oxygène singulet:** une forme excitée de l'oxygène moléculaire, souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Hadi, 2004).

L' 1O_2 provient de l'oxygène triplet par une activation photochimique que favorisent des photosensibilisateurs tels que la porphyrine. Comme il peut être produit par plusieurs réactions d'oxydation biochimiques ou par la réaction entre divers EOR (Sorg, 2004).



- **Peroxyde d'hydrogène:** c'est un oxydant faible, sa demi durée de vie se chiffre en heures. Le H_2O_2 est le résultat d'une dismutation spontanée ou enzymatique (superoxyde dismutase "SOD") du radical superoxyde (Dacosta, 2003).



L'absence de charge à la surface de cette EOR le rend très lipophile, ce qui explique sa capacité de traverser les membranes biologiques, fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse où il participe à la biosynthèse des radicaux les plus réactifs; radical hydroxyle et l'acide hypochlorique, ce dernier est un oxydant puissant et agent antimicrobien efficace (Dacosta, 2003; Cash et al., 2007).

1.3. Origine des radicaux

L'origine des radicaux libres est diverse:

De source exogène; tout d'abord, la pollution peut générer la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Une bouffée de cigarette contient environ 10^{14} radicaux et des traces d'ions métalliques qui peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former des radicaux hydroxyles. Les rayonnements (UV, X,) sont capables de générer des radicaux libres. Les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources des radicaux libres (Favier, 2003).

L'ingestion d'alcool, d'antibiotiques et d'anticancéreux est suivie de formation des radicaux libres selon divers mécanismes métaboliques *in vivo* (Hadi, 2004). Une grande partie des aliments qu'on consomme est oxydée et contient différents types d'oxydants tels que les peroxydes, les aldéhydes, les acides gras oxydés et les métaux de transition (Ames, 1986).

De source endogène; à côté des sources non métaboliques (exogènes) d'EOR, les systèmes intracellulaires (endogènes) sont plus importants du fait que les EOR sont produits en continu durant toute la vie de chaque cellule dans l'organisme.

La chaîne respiratoire mitochondriale constitue une source majeure des EOR dans les systèmes biologiques (Chen *et al.*, 2003). Dans les conditions physiologiques normales, 1 à 2% d'oxygène réduit dans la mitochondrie est converti en $O_2^{\cdot-}$ par la NADH déshydrogénase et l'ubisemiquinone de la chaîne respiratoire (Bai et Cederbaum, 2001). Cette quantité d' $O_2^{\cdot-}$ produite peut être amplifiée dans le cas d'effort physique ou lorsque la fraction d'oxygène inspiré augmente (au cours de certaines modalités de ventilation artificielle utilisant un mélange hyperoxique) ou lors des désordres mitochondriaux génétiques, inflammatoires ou nutritionnels (carence en ubiquinone) (Favier, 2003).

Autres chaînes de transport d'électrons (ex. peroxyosomes et microsomes) contribuent également à la production d' $O_2^{\cdot-}$ dans les cellules en aérobiose. Les cytochromes P_{450} et b_5 de la chaîne de transport d'électrons des microsomes peuvent produire des EOR quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers l' O_2 (Sevanian *et al.*, 1990). Les cytochromes réductases impliquées dans les réactions redox des cytochromes P_{450} et b_5 peuvent, à leur tour, produire l' $O_2^{\cdot-}$ et le OH^{\cdot} suite à leur auto-oxydation (Sevanian *et al.*, 1990 ; Bernhardt, 1996).

L'activité de quelques enzymes cytoplasmiques conduit également à la formation des EOR comme produit de leur cycle catalytique; la xanthine oxydase et l'aldéhyde déshydrogénase forment l'exemple le plus important (Fridovich, 1970 ; Rajagopalan, 1980). Dans les érythrocytes, une source importante de production des EOR est l'auto oxydation de l'hémoglobine qui conduit à la formation de l'anion radical $O_2^{\cdot-}$. En présence de donneurs d'électrons, une réduction bivalente de l' O_2 lié à l'hémoglobine prend place résultant en la formation du H_2O_2 (Bartosz, 2003).

Le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) est synthétisé à partir de l'arginine par les différentes (NOS) à des fins de médiation au niveau des cellules nerveuses, endothéliales et des macrophages (Bredt, 2003).

La source majeure du $O_2^{\cdot-}$ est sans doute la "flambée respiratoire" ou "respiratory burst" des cellules phagocytaires activées (neutrophiles, éosinophiles et macrophages) en

réponse aux stimuli inflammatoires. Cette flambée respiratoire est caractérisée par une augmentation intense de consommation d'oxygène où son acteur principal est le complexe enzymatique NADPH oxydase (Babior *et al.*, 2002). La contribution de l'enzyme NADPH oxydase des neutrophiles est capitale dans la lutte anti-infectieuse car elle permet la destruction des bactéries et des corps étrangers phagocytés (Babior *et al.*, 2002). De même, la myéloperoxydase lysosomiale des phagocytes participe dans ce processus par sa production du HOCl à partir du H₂O₂ et du Cl⁻ (Rodrigues *et al.*, 2002).

2. Stress oxydatif

2.1. Définition

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des espèces oxygénées réactives (EOR) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Morel et Barouki, 1999).

2.2. Origine du stress

Les EOR sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils ont des rôles vitaux très importants en agissant à faibles concentrations, dans la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation. Elles améliorent les fonctions immunologiques par amplification du signal intracellulaire, dans les lymphocytes T suite à une faible stimulation antigénique donnant lieu à une réponse immunitaire spécifique (Dröge, 2002). Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par les systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit nutritionnel en antioxydants ou par suite d'une surproduction exagérée des EOR, elle présente des effets néfastes en induisant l'apoptose des cellules saines ou en activant l'expression de divers gènes codant pour des cytokines ou protéines d'adhésion, ce qui conduit à l'amplification de la réponse inflammatoire (Conner et Grisham, 1996). Les EOR instables sont particulièrement réactionnelles et seront capables de provoquer des dégâts cellulaires importants.

2.3. Les conséquences du stress oxydatif

L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell et Whiteman., 2004; Valko et al., 2006) (figure12).

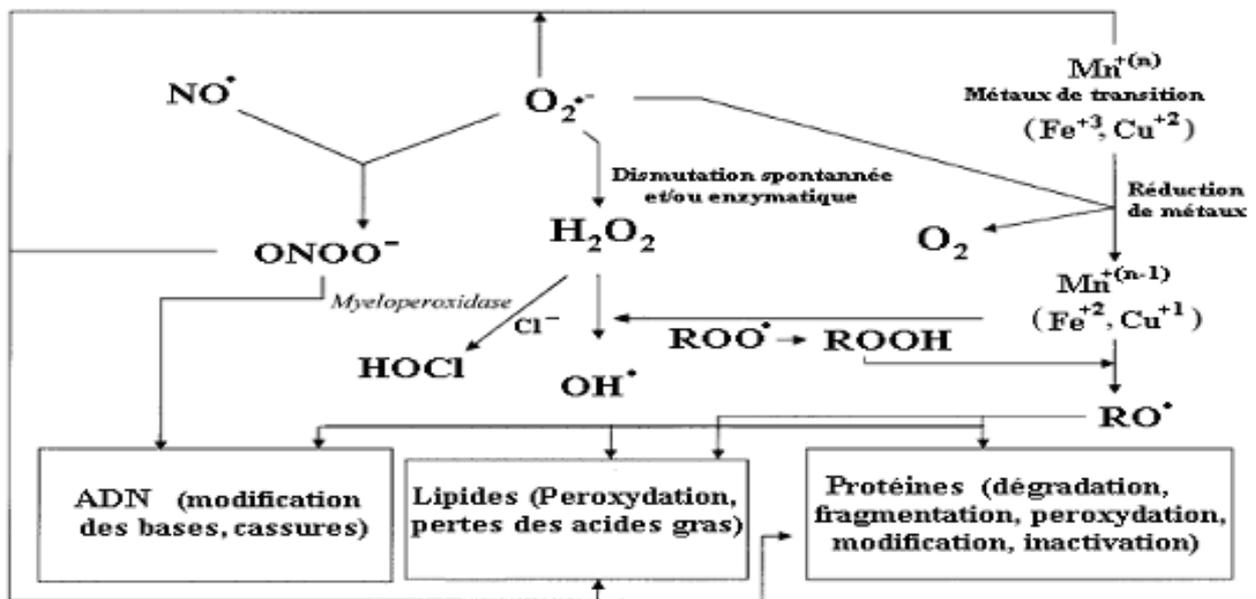


Figure 11. Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR

(Kohen et Nyska, 2002).

Les lipides et précisément leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par les EOR, réaction appelée peroxydation lipidique. Ses conséquences seront différentes:

- L'attaque des lipides circulants aboutit à la formation des LDL oxydées, qui captées par des macrophages forment le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires.
- L'attaque des phospholipides membranaires entraîne la perte d'acides gras polyinsaturés, modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Favier, 2003).

Si la majorité des acides aminés des protéines peuvent être oxydés par les EOR, les acides aminés soufrés (méthionine, cystéine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles. L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carboxyles sur les protéines, mais peut également induire des modifications structurales plus

importantes comme la fragmentation des chaînes, formation des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements et leurs activités (Martinez-Cayuela, 1995; Leucher-Michel et *al.*, 2001 ; Valko et *al.*, 2007). Les protéines ainsi modifiées deviennent plus sensibles à l'action des protéases et alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Jung et *al.*, 2007).

Les radicaux libres peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des modifications et des altérations des bases nucléiques, des adduits intra-caténaire, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de chaîne simple ou double brin (Favier, 2003 ; Hadi, 2004).

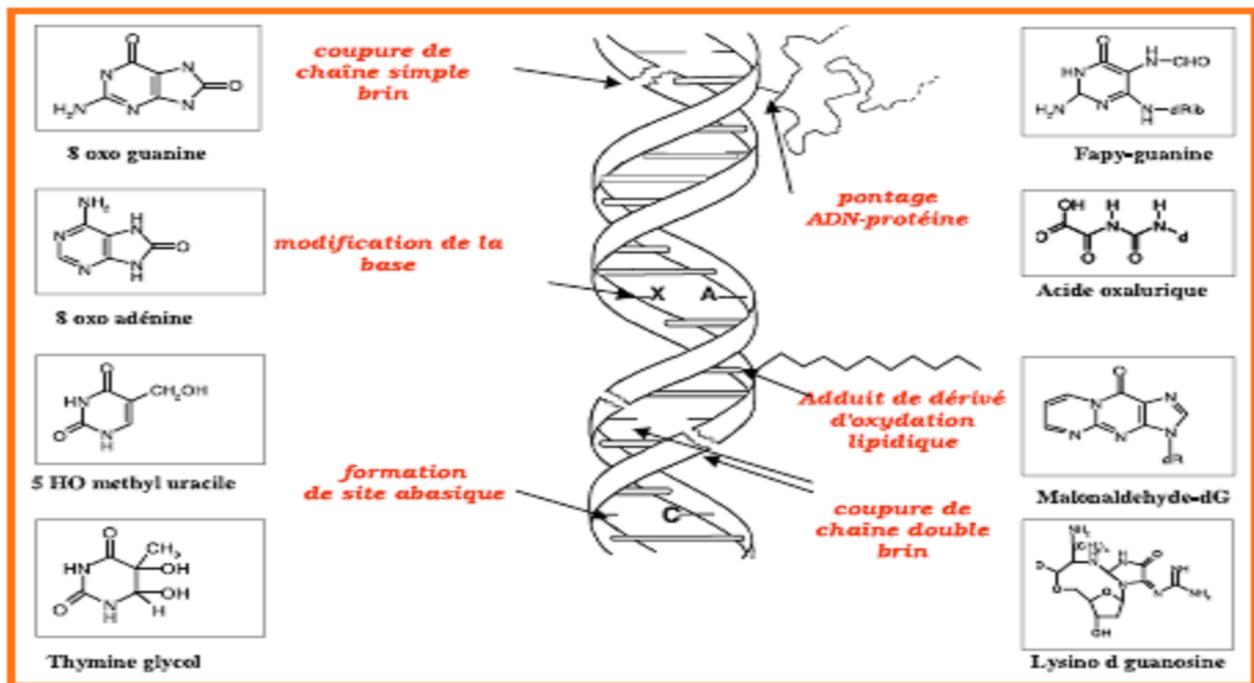


Figure 12. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites est à l'origine du phénomène de stress oxydant dont l'importance, dans de nombreuses pathologies (allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, le diabète et le vieillissement) et comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution, est maintenant largement démontré (Favier, 2003).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale

de radicaux accompagnés d'une diminution de l'efficacité des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés (Sohal et *al.*, 2002).

3. les antioxydants

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des EOR est particulièrement fragile. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ces derniers est assuré par des systèmes d'antioxydants.

3.1. Définition

Un antioxydant est défini comme étant toute molécule, à concentration relativement faible, capable d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et peut retarder, inhiber ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (Boyd et *al.*, 2003; Berger, 2006), ce sont des composés qui réagissent avec les EOR et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant, 2004).

3.2. Les systèmes antioxydants

La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydants de notre organisme peuvent se diviser en deux systèmes : enzymatiques et non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

a. antioxydants enzymatiques

Représentés principalement par trois enzymes; la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

- **La superoxyde dismutase (SOD):** accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène en diminuant sa durée de vie (Sorg, 2004).
- **La catalase:** agit en synergie avec les SOD, son rôle est de transformer le peroxyde d'hydrogène en simples molécules d'eau et oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

- **La glutathion peroxydase (GPx)**: détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques. La réduction de ces dérivés réactifs est couplée avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR) a pour rôle la régénération de GSH à partir du GSSG tout en présence du cofacteur NADPH (Martinez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004).

A côté de ces enzymes qui présentent un système de défense primaire contre les EOR, les composés d'enzymes ; protéolytiques, phospholipases, ADN endonuclease et ligase, macroxyprotéinases, présentent un système de défense secondaire (Pincemail et *al.*, 1998)

b. antioxydants non enzymatiques

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les EOR. Le mécanisme indirecte implique la chélation des métaux de transition ce qui empêche la production du radical hydroxyle, hautement toxique. Les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, l'empêchant ainsi d'attaquer les structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs capables de passer leurs électrons aux EOR et les éliminer (Kohen et Nyska, 2002).

Ces agents piégeurs (ou scavengers selon la terminologie anglo-saxonne) possèdent plusieurs avantages par rapport aux antioxydants enzymatiques, en particulier par leur petite taille qui leur permet de traverser la membrane cellulaire et d'atteindre facilement leurs cibles (Kohen et Nyska, 2002). Ces molécules renferment plusieurs substances endogènes synthétisées par les cellules, les plus importantes sont le glutathion, les protéines à groupements thiols, la bilirubine, l'acide lipoïque, l'acide urique,...etc. (Favier, 2003).

Des substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérols), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), -carotène, les oligo-éléments (sélénium, cuivre, zinc, manganèse), les caroténoïdes (Pincemail et *al.*, 2002), les flavonoïdes (Pietta, 2000 ; Cotelle, 2001), les alcaloïdes, les polyphénols et les huiles essentielles (Bruneton, 1999), jouent le rôle de piégeurs de radicaux libres (Favier, 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

IV. Les antimicrobiens

1. Définition

Le terme antimicrobien désigne les différents agents et substances qui tuent (microbicide), ou arrêtent (microbiostatique) la croissance des microorganismes, telles les bactéries (activité antibactérienne), les mycètes ou les champignons (activité antimycosique ou antifongique), les virus (activité antivirale) et les parasites (activité antiparasitaire). Ils sont partagés en deux groupes (Frobisher et Fuerst. 1976 ; Prescott et *al.*, 2003).

Les agents physiques

- La température : chaleur humide, chaleur sèche et pasteurisation.
- Les rayonnements électromagnétiques : UV (260 nm), X et gamma.
- Les moyens mécaniques : filtration.

Les agents chimiques

- Les oxydants : l'eau oxygénée (H₂O₂), le chlore et l'iode.
- Les alcools : l'éthanol et l'isopropanol.
- les aldéhydes : le formaldéhyde et le glutaraldéhyde.
- Les métaux lourds et leurs sels : l'arsenic, le zinc, le nitrate d'argent et le sulfate de cuivre.
- Les détergents : anioniques (les ammoniums quaternaires) et cationiques (le chlorure de binzalkonium).
- Les gaz : le formol, l'oxyde d'éthylène, la γ -propiolactone et l'ozone.
- Les agents chimiothérapeutiques : les sulfamides, les antibiotiques, les antifongiques et les antivirales.

Parmi ces agents antimicrobiens, on s'intéresse au dernier type des agents chimiques, qui font l'objet de notre étude : l'activité antimicrobienne en relation avec l'hôte.

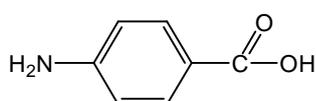
2. Les agents chimiothérapeutiques

Présentent l'ensemble des substances chimiques utilisées pour le traitement des maladies dues aux infections microbiennes, à des concentrations suffisamment faibles pour éviter d'occasionner des dommages et des toxicités chez l'hôte (Prescott et *al.*, 2003).

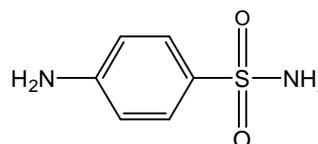
2.1. Les sulfamides

Ces substances obtenues par pure voie de synthèse à partir des «goudrons de houille». Pour cette raison, elles sont souvent classées à part. Ce groupe inclut des substances comme le sulfathiazole, la sulfadiazine, la sulfamérazine et bien d'autres. Tous sont des dérivés de la sulfanilamide. En général, les sulfamides sont plus efficaces contre les bactéries gram-positives (sauf deux exceptions ; *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*). Ils sont totalement inefficaces contre les virus, les rickettsies, les champignons et les protozoaires (Frobisher et Fuerst. 1976).

Les sulfamides agissent comme des inhibiteurs compétitifs (*antimétabolites*) de la synthèse de l'acide folique ; vitamine essentiel à la croissance bactérienne. Ce mode d'action est du à la ressemblance structurale de l'acide paraaminobenzoïque (PABA ; précurseur de l'acide folique) aux sulfamides, ces substances peuvent remplacer PABA sur son enzyme en produisant l'acide ptéroyl glutamique analogue de l'acide folique. La figure 15 nous montre la ressemblance frappante entre la sulfanilamide et l'PABA (Frobisher et Fuerst. 1976).



Acide paraaminobenzoïque



Sulfanilamide

Figure 13. L'acide paraaminobenzoïque et son antagoniste 'sulfanilamide'

(Frobisher et Fuerst. 1976).

2.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des microbes (bactéries, champignons, protozoaires) à très faibles doses, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieures. Cette propriété les distingue des antiseptiques. Les antibiotiques, au sens strict, sont des produits élaborés par des microorganismes (moisissures : *Penicillium* et *Aspergillus* ou bactéries : des genres *Streptomyces* et *Bacillus*), mais en inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et entièrement synthétiques (Frobisher et Fuerst. 1976 ; Nauciel, 2000).

L'activité des antibiotiques *in vitro* peut être mesurée en déterminant leur capacité d'inhiber, d'arrêter la croissance microbienne *microbiostatique* ou de les tuer *microbicide*. Ces deux termes s'appliquent aussi aux bactéries (*bactériostatique*, *bactéricide*), c'est la concentration minimale inhibitrice 'CMI' (Nauciel, 2000). Chacun des antibiotiques a son spectre d'action propre : certains à *spectre restreint* ne sont efficaces que contre un groupe limité de microorganismes, certains n'attaquent que les bactéries gram-négatives, d'autres n'attaquent que les gram-positives, d'autre enfin sont à *large spectre*, c'est-à-dire qu'ils sont efficaces contre un très grand nombre de microorganismes différents. L'action des antibiotiques est influencée par de nombreux facteurs : concentration microbienne, milieu, interaction avec un autre antibiotique, ...etc. En outre, l'activité *in vivo* est influencée par des données pharmacologiques et des conditions locales particulières (Nauciel, 2000).

Principales familles d'antibiotiques et leur mode d'action

La plupart des antibiotiques inhibent des voies métaboliques ciblent des agents infectieux, certains agissent comme antagonistes métaboliques ou *antimétabolites*, ou *inhibiteurs compétitifs*, d'autre substances agissent en endommageant ou en entravant les fonctionnements normaux des microorganismes. Chaque famille d'antibiotiques possède son propre mode d'action.

- les antibiotiques agissant sur la synthèse des peptidoglycanes (paroi cellulaire) comprennent les β -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine.
- les antibiotiques agissant sur la synthèse protéique comprennent les aminosides, les tétracyclines, les macrolides et l'acide fusidique.
- Les antibiotiques agissant sur les acides nucléiques comprenant le triméthoprime, les quinolones, les nitro-imidazoles et les rifamycines.
- Les polymyxines agissant au niveau des membranes plasmique (Carbon *et al.*, 1994 ; Bergogne *et al.*, 1995).

2.3. Les antifongiques

De nombreuses substances inhibent ou tuent les mycètes sont assez toxiques pour les êtres humains, principalement parce que les cellules eucaryotes des mycètes sont très semblables aux cellules animales, ce qui fait du traitement des mycoses souvent plus difficile que celui des infections bactériennes. En outre, la plupart des mycètes ont un système de détoxification qui modifie de nombreux antibiotiques, probablement par hydroxylation. En conséquence, les antibiotiques utilisés sont fongistatiques pour autant que des applications répétées maintiennent des quantités élevées d'antibiotique inaltéré. Malgré leur indice thérapeutique relativement faible, quelques substances sont utiles dans le traitement de nombreuses mycoses importantes (Prescott et *al.*, 2003).

Les mycoses sont généralement subdivisées en mycoses superficielles et mycoses systémiques. Les agents antifongiques employés contre le premier type sont souvent :

- les dérivés d'imidazole à large spectre, inhibent la synthèse des stérols membranaires.
- la nystatine est un antibiotique de type polyène, produit par les *Streptomyces*, agit sur la membrane fongique, permet de contrôler les infections à *Candida albicans*.
- la griséofulvine, antibiotique semble agir en inhibant la division cellulaire par la perturbation du fuseau mitotique, ou en inhibant la synthèse des protéines et des acides nucléiques.

Les infections systémiques sont très difficiles à contrôler et peuvent être fatales. Les substances les plus communément utilisées sont :

- l'amphotéricine B, de même origine que la nystatine, perturbe la perméabilité membranaire, elle est assez toxique, utilisée uniquement en cas d'infections graves.
- la 5-flucytosine, antifongique synthétique, il se convertit en 5-fluorouracile par les mycètes, incorporé dans l'ARN au lieu de l'uracile, elle perturbe son fonctionnement mais elle a plusieurs effets secondaires.

Des agents comme la polyoxine D et la nikkomycine, ciblent la chitine synthétase, sont très efficaces, vu l'absence de paroi cellulaire chez les animaux.

Comme pour les antibiotiques, l'utilisation abusive des antifongiques conduit à une augmentation de la résistance, on rencontre plus souvent des infections à *Candida* résistants (Prescott et *al.*, 2003).

2.4. Les antivirales

L'usage des antivirales est relativement récent, il a semblé peu probable de pouvoir toucher les virus par des substances chimiothérapeutiques sans avoir une toxicité chez l'hôte, dans la mesure où ils sont des parasites intracellulaires utilisant largement les enzymes et les constituants cellulaires de l'hôte (Prescott et *al.*, 2003).

La plupart des substances antivirales inhibent des étapes critiques du cycle du virus ou la synthèse des acides nucléiques spécifiques du virus (Prescott et *al.*, 2003).

- L'amantadine et la rimantadine, produits dérivés de l'adamantane, inhibent la pénétration et la décapsidation des particules du virus.
- La vidarabine ou adénine arabinoside, nucléoside de synthèse, analogue structural de l'adénosine, perturbe l'activité de l'ADN polymérase et de plusieurs autres enzymes impliquées dans la synthèse et le fonctionnement de l'ADN et de l'ARN.
- L'acyclovir, du même type de la vidarabine, après sa phosphorylation, l'acyclovir ressemble au désoxy-GTP et inhibe l'ADN polymérase virale.

La recherche des anti-HIV (virus d'immunodéficience humaine) a été particulièrement active. Les premières drogues développées furent pour beaucoup, des inhibiteurs de la transcription inverse et ainsi bloquent la multiplication d'HIV, telles L'azidothymidine (AZT), la lamivudine (3TC), la didanosine (ddI)...etc. Plus récemment, des inhibiteurs de protéase ont été développés, les plus employés sont la saquinvir, l'indinavir et le ritonavir. Ces substances imitent la liaison peptidique normalement attaquée par la protéase d'HIV (Girard and *al.*, 1994 ; Prescott et *al.*, 2003).

Pour prévenir l'apparition de la résistance du virus à la monothérapie comme celle observée au AZT, on applique des associations ou des cocktails d'agents ; bithérapie (AZT+3TC) et trithérapie (AZT+ddI+ritonavir) chacun à doses élevées, qui se sont montrées très efficaces (Girard and *al.*, 1994 ; Prescott et *al.*, 2003).

Les interférons, agents antiviraux les plus connus, sont des petites protéines produites par l'hôte, spécifiques des espèces productrices mais ne sont pas spécifiques du virus. Elles inhibent la réplication virale par une régulation immunitaire cellulaire et humorale. Plusieurs gènes codent ont été clonés dans des bactéries ou des levures ainsi reprogrammées pour

produire les interférons correspondant en grande quantité, utiles en clinique dans le traitement de plusieurs maladies virales ; l'influenza, l'hépatite, l'herpès et des rhumes (Cantell and *al.*, 1986 ; Prescott et *al.*, 2003).

3. Mécanismes de résistances microbiennes

La résistance aux antimicrobiens peut être naturelle ou acquise ; la résistance naturelle est présente chez tous les membres d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Elle est liée à son patrimoine génétique, ex : l'ampicilline à large spectre, est valide contre presque tous les gram-positifs (sauf pour *Staphylococcus aureus*) et contre un grand nombre de gram-négatifs en excluant les *Pseudomonas* (Pequignot, 1975 ; Nauciel, 2000).

La résistance acquise résulte d'une *mutation* ; modification du patrimoine génétique. Le plus souvent, il s'agit de l'acquisition d'un ADN étranger pouvant provenir de la même espèce ou d'espèces bactériennes différentes. L'acquisition d'ADN se fait le plus souvent par conjugaison, elle se fait alors par l'intermédiaire de plasmides ou de transposons conjugatifs, qui peuvent porter un ou plusieurs gènes de résistance. Dans certaines espèces comme le *pneumocoque* et les *Neisseria*, l'acquisition d'ADN peut se faire par transformation, le transfert de gène de résistance par l'intermédiaire d'un bactériophage (transduction) est rare (Pequignot, 1975 ; Nauciel, 2000).

L'acquisition de mécanismes de résistance aux antibiotiques a une expression phénotypique variable. Dans la majorité des cas, elle est détectable par des épreuves de sensibilité (antibiogramme), les méthodes habituelles de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques sont souvent : -la méthode de dilution en éprouvette, -la méthode des disques et la méthode de dilution en gélose (Frobisher et Fuerst. 1976). Lorsque le niveau de résistance est faible, la bactérie peut apparaître sensible par les critères habituels. La lecture interprétative de l'antibiogramme permet de corriger la réponse. On peut classer les mécanismes de résistances des microbes en 4 groupes (Nauciel, 2000) :

- L'inactivation de l'antibiotique ;
- La modification de la cible ;
- La diminution de la perméabilité membranaire ;
- L'excrétion de l'antibiotique.

Chapitre II

Partie expérimentale

I. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Le matériel végétal étudié est le fruit (drupe), seulement la partie charnue dénoyautée du fruit de l'azérolier, comestible par l'être humain, provenant de la région de N'gaous dans la wilaya de Batna et identifiée au département d'agronomie. La récolte du fruit a été réalisée en Septembre-Octobre 2007. La **figure 14** représente les caractères morphologiques du fruit étudié (*Crataegus azarolus* L.).

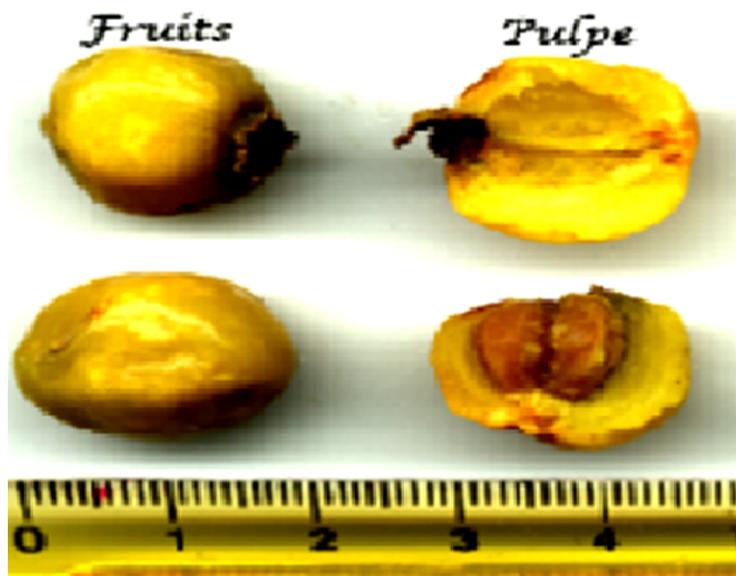


Figure 14. Différentes parties du fruit (*Crataegus azarolus* L.).

2. Méthodes

2.1. Conservation du fruit

Après détermination de la teneur en humidité et les différents paramètres physiques du fruit, la partie charnue dénoyautée a été séchée à l'ombre et à l'abri de la lumière, dans un endroit sec et aéré à température ambiante. Devenu sec, le fruit est ramassé dans des sacs en papier et stocké dans un endroit sec et aéré pour d'éventuelles utilisations.

2.2. Paramètres physiques du Fruit

L'échantillonnage se fait aléatoirement et permet de déterminer les différents rapports entre (partie comestible / fruit) ou (noyau / fruit), pour avoir une idée sur le rendement exploité de ce produit. À l'aide d'une balance de précision de type SARTORIUS, on a pesé le fruit entier, sa partie charnue et son noyau.

Détermination des rapports: le rapport est une moyenne de N=30 pesées d'échantillons.

Considérons:

CF% : rapport partie comestible fruit.

MC : masse de la partie comestible.

MF : masse de fruit.

N : nombre total des échantillons.

$$CF\% = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n \frac{MC_i}{MF_i} \times 100$$

$$D'où \quad NF\% = 100 - CF\% = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n \frac{MN_i}{MF_i} \times 100$$

NF% : rapport noyau fruit.

MN : masse de noyau.

2.3. Détermination du taux d'humidité

La teneur en humidité a été déterminée par le procédé de dessiccation à une température de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ dans une étuve ventilée à la pression atmosphérique de type MEMMERT, jusqu'à ce que le poids de l'échantillon devienne pratiquement constant.

La teneur en humidité est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation (Audigié et *al.*, 1978; Lindon et Lorient, 1994 ; AFNOR-DGCCRF, 1995).

Considérons ;

H% : taux d'humidité exprimé en pourcentage.

M1 : poids en gramme de l'échantillon frais.

M2 : poids en gramme de l'échantillon sec.

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

D'où la matière sèche (**MS**):

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

2.4. Détermination du taux de matière organique

La teneur en matière minérale d'une substance alimentaire est conventionnellement le résidu de la substance après minéralisation de la matière sèche des échantillons. Elle est obtenue par incinération à 500-600°C de l'échantillon dans un four à moufle, après stabilisation de la température pendant une heure de temps, le four ne doit pas être ouvert avant 24 heures, l'échantillon devient gris blanchâtre (cendre).

La teneur en matière organique est définie comme étant la perte de poids subit lors de la calcination (Pinta, 1961; AOAC, 1984).

Considérons ;

MO% : taux de la matière organique exprimé en pourcentage.

M1 : poids en gramme de l'échantillon sec.

M2 : poids en gramme de l'échantillon calciné.

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

D'où la teneur en matière minérale (**MM**):

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

2.5. Procédés d'extraction

Des extractions de type solide liquide ont été préparées à partir du fruit sec broyé en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique.

2.5.1. Extractions organiques avec des solvants à polarité croissante

L'extraction est effectuée par épuisement successif du matériel végétal pulvérisé selon la méthode de Drissa et *al.*, (2004) et Aberkane, (2006). En utilisant des solvants à polarité croissante, la poudre végétale (250 g) est initialement extraite avec l'éther de pétrole (2 litres), le mélange est soumis à une agitation électrique pendant une nuit (24 heures) à

température ambiante. Après décantation, le surnageant est filtré ensuite concentré par évaporation rotative dans un Rotavapeur de type BÜCHI à 40°C. Le marc résiduel va subir une deuxième et une troisième extraction avec le dichlorométhane, puis le méthanol suivant les mêmes étapes et dans les mêmes conditions, concentrés à 35°C et à 50°C respectivement, comme présente la **figure 15**. Les extraits sont directement conservés à 4°C pour des analyses éventuelles.

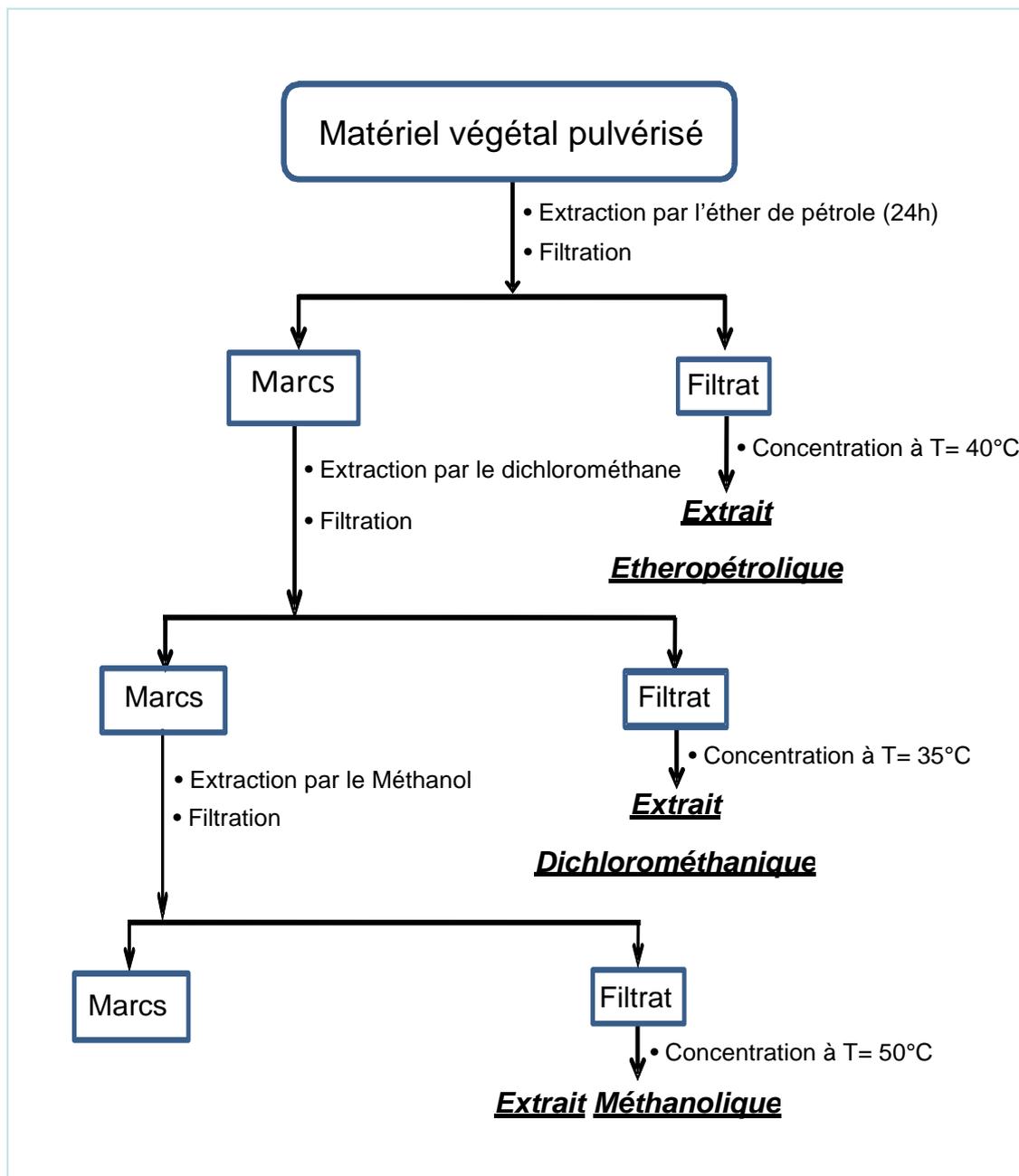


Figure 15. Différentes étapes d'extraction par épuisement successif du matériel végétal.

2.5.2. Extrait aqueux

Une macération aqueuse de 10% a également été effectuée sur 50 g de poudre végétale avec de l'eau distillée et placée sous agitation électromagnétique pendant 24 heures. Après filtration, l'extrait est lyophilisé (**figure 16**) et conservé dans un dessiccateur chimique contenant l'agent déshydratant (gel de silice) (Drissa et *al.*, 2004).

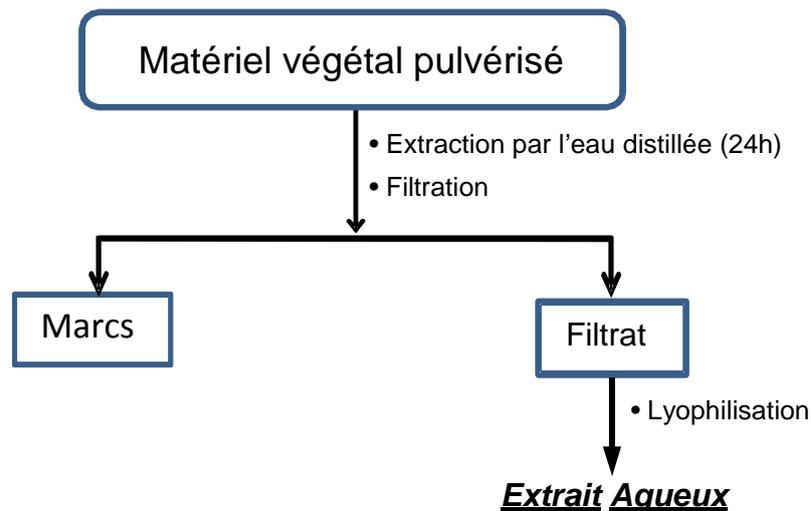


Figure 16. Extraction par macération aqueuse

Détermination du rendement

C'est la quantité des composés ou substances pouvant être extraites par un solvant typique dans des conditions spécifiques (Diallo., 2005).

Considérons ;

R% : rendement par rapport au poids de la matière végétale utilisée.

Me : poids en gramme de l'extrait sec.

Mv : poids en gramme de la poudre végétale utilisée.

$$R\% = \frac{Me}{Mv} \times 100$$

2.6. Analyse des extraits

2.6.1. Tests préliminaires

Les réactifs de caractérisation classique ont permis par des tests simples et rapides, en tubes de mettre en évidence les groupes chimiques suivants :

- Les Flavonoïdes : par la réaction de cyanidine, elle est appliqué sur les différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L., préparés dans l'eau distillée concernant les extraits polaires (aqueux E.Aqe et méthanolique E.Met) et dans le méthanol à propos des extraits apolaires (dichlorométhanique E.Dic, éthéropétrolique E.Eth) par une proportion de (1g/3ml), à cette solution, on ajoute 5ml de HCl concentré et quelques fragments de magnésium, on laisse réagir 3 minutes. La coloration rouge (cerise) indique la présence des flavonoïdes (Ciulei, 1982; Dohou et *al.*, 2003; Aminata, 2004).
- Les Tanins : on utilise le chlorure ferrique, aux mêmes solutions préparées des différents extraits utilisés pour le test des flavonoïdes, on ajoute quelque goutte de $FeCl_3$ à 1%. La couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques, et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (Ciulei, 1982; Dohou et *al.*, 2003; Aminata, 2004).
- Les Alcaloïdes : par le réactif de Dragendorff ou de Mayer, aux extraits précédents préparés dans l'eau distillée et dans le méthanol, on ajoute quelques gouttes de réactif de Dragendorff, en présence d'alcaloïdes, on remarque un précipité orange. En remplaçant le réactif de Dragendorff par celui de Mayer, on constate la formation d'un précipité blanc-jaunâtre témoin de la présence d'alcaloïdes (Dohou et *al.*, 2003; Aminata, 2004).

2.6.2. Chromatographie sur couches minces CCM

La chromatographie sur couches minces est une technique analytique simple utilisée dans le but de séparer les différents constituants d'un mélange complexe en se basant sur les phénomènes d'adsorption et de partage (Vernin, 1970; Randerath, 1971; Rouessac et *al.*, 2006).

Des plaques de gel de silice avec indicateur fluorescent (20×20 cm, 60 F₂₅₄) sont utilisées pour analyser les quatre extraits ; E.Eth, E.Dic, E.Met et E.Aqe du fruit de

Crataegus azarolus L. La phase mobile pour les extraits apolaires ; on a utilisé deux systèmes, le premier est constitué d'hexane : éther diéthylique (50 :50 V/V) le second éther de pétrole : acétate d'éthyle (80 : 20 V/V) (Hennebelle, 2006). Pour les extraits polaires, le meilleur système de séparation choisi est le BAW (n-Butanol : Acetic acid : water) (60 : 15 : 35 V/V) (Drissa et *al.*, 2004). Ces compositions (des systèmes de migration) ne sont bien sur qu'indicatives et peuvent être adaptées aux besoins spécifiques d'une analyse.

De chaque extrait (100 mg/ml) et standard (2 mg/ml), 5 µl sont déposés sur la ligne de départ tracé au pied des plaques, ces dernières sont ensuite introduites dans des cuves de migration préalablement saturées par la phase mobile.

Après développement, les plaques sont séchées sous hotte, observées sous lampes UV à 254 nm et à 366 nm, puis pulvérisées par un mélange vanilline sulfurique (acide sulfurique : éthanol : vanilline ; 20 :80 :1 V/V/P) (Ciulei ,1982), séchées à 105°C pendant 10 minutes afin de révéler les spots issus de la séparation. Les rapports frontaux sont calculés et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants de différents extraits.

Considérons ;

RF : rapport frontal.

d : distance parcourue par l'échantillon.

D : distance parcourue par la phase mobile.

$$\mathbf{RF} = \frac{\mathbf{d}}{\mathbf{D}}$$

2.6.3. Chromatographie liquide à haute performance HPLC

Elle repose sur les mêmes principes de base que la CCM, mais d'utilisation plus complexe, nécessite d'avantage de précautions et coûte nettement plus chère. Cependant, elle permet une amélioration très importante concernant le seuil de détection et la résolution (Rouessac et *al.*, 2006).

Pour le présent travail, les analyses HPLC ont été menées au laboratoire d'HPLC de la Faculté des sciences de l'université El Hadj-Lakhdar Batna, suivant le protocole de Kuntie et *al.*, (2007), proposé pour la détection des composées phénoliques. Les analyses sont

effectuées à l'aide d'une chaîne HPLC marque Shimadzu munie d'une pompe Shimadzu 7100 et d'un détecteur UV Shimadzu (DAD-UV) piloté par le logiciel D.7000 HSM (Shimadzu).

En utilisant une phase inverse 'RP' phase stationnaire composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 18 atomes de carbone, cette phase est apolaire nécessite donc un éluant polaire, généralement composé de l'Acétonitril HCN, MeOH, H₂O, dans ce cas, les composés polaires seront élués en premiers. La colonne HPLC de type LiChrospher RP-C18 (Shimadzu) (5 µm, 125 × 4.6 mm).

Pour toutes les analyses, les conditions chromatographiques sont en isocratique où la phase mobile est d'une composition constante, d'un mélange MeOH de qualité HPLC et de l'eau ultra pure (40 :60 V/V), le débit est fixé à 1 ml/min, la détection se fait à 254 nm. En général, tous les extraits du fruit en solutions de 1 à 4 mg/ml dans le méthanol sont injectés, le volume d'injection fixé à 20 µl.

2.6.4. Spectrophotométrie UV-Visible

Méthode physico-chimique dépend de la structure de la molécule. L'absorption d'énergie est quantifiée et résulte du passage des électrons orbitaux de l'état fondamental vers des orbitales d'un état excité d'énergie supérieur. La structure particulière des molécules est liée à une absorption plus ou moins importante à chaque longueur d'onde observable (UV de 200 à 400 nm ; Visible de 400 à 800 nm) ce qui peut se traduire par l'établissement d'un spectre d'absorption. L'absorption dans le domaine du visible est courante et se traduit par une coloration de l'échantillon. La spectrométrie UV se limite généralement aux systèmes conjugués (Silverstein et *al.*, 1998; Rouessac et *al.*, 2006).

Les différents dosages ont été réalisés à l'aide d'un appareil de type BECKMAN, modèle 34.

2.6.4.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques des différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon Rebéreau-Gayon, (1968) de (Li et *al.*, 2007), qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue (oxyde de tungstène et de molybdène). Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des phénols présents dans l'échantillon (Georgé et *al.*, 2005).

Un volume de 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 μ l d'échantillon ou standard (dissous dans le méthanol et dans l'eau distillée concernant l'E.Aqe) avec des dilutions convenables. À la dernière étape, 400 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante et en abri de la lumière, l'absorbance est lue à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 μ g/ml) est exprimée en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg_{d'extrait}).

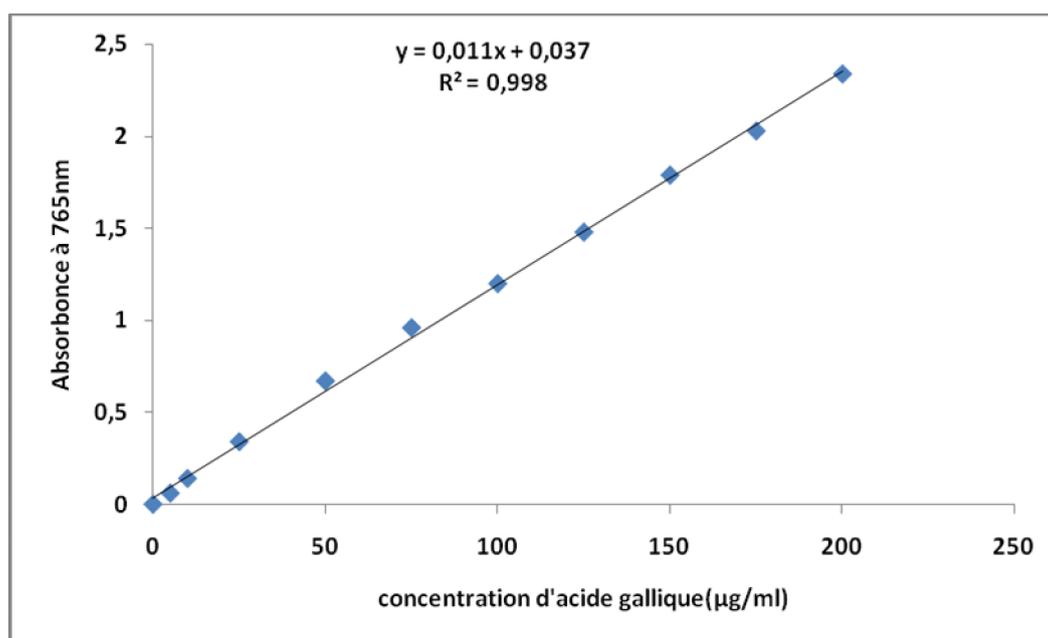


Figure 17. Courbe d'étalonnage des polyphénols (moyenne \pm SD de trois essais).

2.6.4.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996), est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. Ce réactif entraîne la formation de complexes acido-résistants, entre les hydroxyles et les fonctions cétones voisines et des complexes acido-labiles, avec les groupes O-dihydroxyles. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 430 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'échantillon.

A 1 ml de chaque échantillon et du standard (préparés dans le méthanol et dans l'eau distillée concernant l'E.Aqe) avec dilutions convenables, on ajoute 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}_{\text{d'extrait}}$).

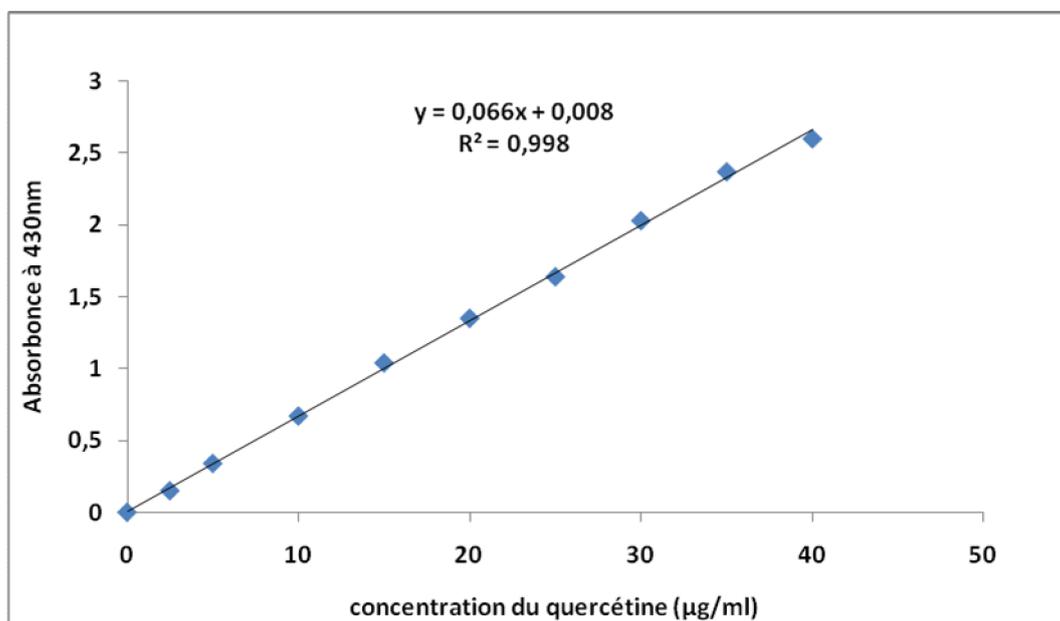


Figure 18. Courbe d'étalonnage des flavonoïdes (moyenne \pm SD de trois essais).

2.6.4.3. Dosage des tanins

Le dosage des tanins condensés est réalisé pour les différents extraits de notre fruit étudié selon la méthode de Broadhurst et Jones, (1978) de (Heimler et *al.*, (2006) modifiée dans notre laboratoire. Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm (Schofield et *al.*, 2001).

À 400 µl de chaque échantillon ou standard (préparés dans le méthanol et dans l'eau distillée concernant l'E.Aqe) avec des dilutions convenables, on ajoute 3 ml de la solution de vanilline (4% dans le méthanol) et 1,5 ml de HCl concentré. Après 15 minutes de réaction, l'absorption est lue à 500 nm. Les concentrations des tanins sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (0-300 µg/ml) et sont exprimées en microgramme d'équivalent de catéchine par milligramme d'extrait (µg EC/mg_{d'extrait}).

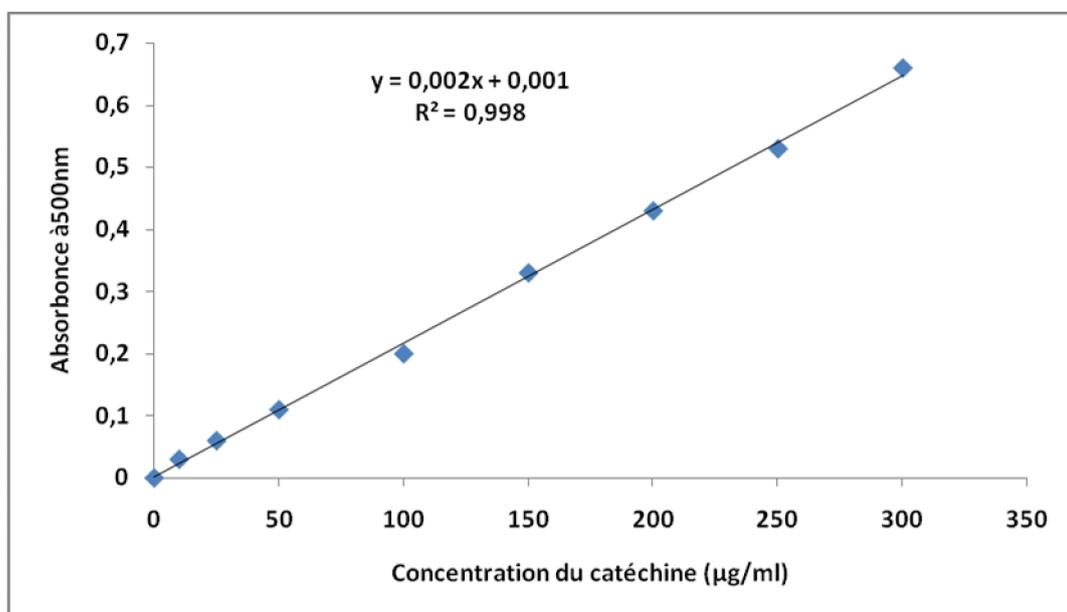


Figure 19. Courbe d'étalonnage des tanins (moyenne ± SD de trois essais).

2.7. Test de l'activité antimicrobienne

2.7.1. Les Microorganismes

Les souches testées sont :

- ✓ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ; des cocci *Gram+*, bactéries très répandues dans la nature peuvent être:

Saprophytes : retrouvés dans le sol, l'air et l'eau. Commensaux : retrouvés sur la peau et les muqueuses de nombreux mammifères. Pathogènes : responsables d'infections diverses ; dermites, métrites, vaginites, arthrites, mammites ..., infections généralisées ; septicémies, méningites... chez l'homme et les animaux.

Il est, en particulier, fréquemment capable de produire une 'entérotoxine' dans les aliments, cause des troubles digestif dominés par des vomissements chez le consommateur (Frobisher et Fuerst. 1976 ; Paullarpent. 1997).

- ✓ *Escherichia coli* (ATCC 25922) ; appartient au *Enterobacteriaceae* (où la plupart des espèces faisant partie habitent de façon constante l'intestin de l'homme ou de l'animal), bacilles à *Gram⁻*, anaérobies facultatifs. Dans plusieurs cas de diarrhée infantile, on pouvait mettre en cause certaines souches *E. coli* pathogènes, comme pour les infections urinaires (Frobisher et Fuerst. 1976 ; Paullarpent. 1997).
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); bâtonnets droits ou incurvés à extrémités assez effilées, aérobies stricts, *Gram⁻* largement répandus dans la nature, ils sont souvent psychrotrophes. Responsables de l'infection du tractus urogénital et de l'altération de nombreux produits (Frobisher et Fuerst. 1976 ; Paullarpent. 1997).
- ✓ *Salmonella typhimurium* ; appartient à la famille des entérobactéries, bacilles à *Gram⁻*, responsables de la paratyphoïde ; infections entériques à point de départ alimentaire (viande de bétail et particulièrement la volaille et les œufs) (Paullarpent. 1997). Des animaux comme le chien, le rat et la souris sont souvent porteurs des bacilles de la paratyphoïde (Frobisher et Fuerst. 1976).
- ✓ *Candida albicans* ; connue sous le nom de *Monilia albicans*, c'est un champignon microscopique levuriforme saprophyte, inoffensive chez l'homme sain ce retrouve fréquemment à l'état commensal (voies digestives, rhinopharynx, muqueuses

génitales), peu pathogène lors de déficiences du système immunitaire (HIV, chimiothérapie, transplantation d'organes), de diabète et de certains déséquilibres endocriniens (grossesse). C'est un microorganisme opportuniste qui engendre une maladie du nom de candidose ou moniliose (Frobisher et Fuerst. 1976 ; Paullarpen. 1997).

Ces souches de référence proviennent du centre hospitalier universitaire (CHU) de Batna.

2.7.2. Test antimicrobien

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits obtenus du fruit de *Crataegus azarolus* L., on a utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé (Bauer et al., 1966).

Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de papier Whatman de 6mm de diamètre, les disques sont imprégnés de différentes solutions (1g /ml) des extraits dissous dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) pour les extraits organiques et dans l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux (ces solvants sont choisis après un test préliminaire de toxicité vis-à-vis les souches microbiennes). Puis, déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension microbienne d'une densité optique de 0,5McFarland. Le milieu MULLER-HINTON pour les souches bactériennes, et le milieu SABOUROUD spécifique pour la levure. A la fin de la durée d'incubation (18-24h) pour les souches bactériennes et (48h) pour la levure *Candida albicans* à 37°C. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés en millimètre en utilisant un pied à coulisse électronique.

2.8. Test de l'activité antioxydante

2.8.1. Méthode chromatographique CCM (au DPPH)

Une chromatographie sur couches minces est similaire à celle utilisée pour l'analyse des différents extraits, on utilise les mêmes systèmes de migration. Pour les extraits apolaires on a utilisé le système éther de pétrole : acétate d'éthyle (80 : 20 V/V), pour les extraits polaires, le système BAW (60 : 15 : 35 V/V).

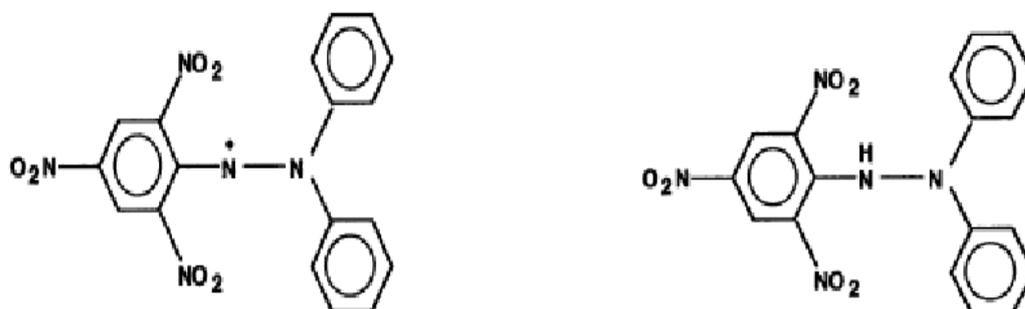
Ce test chimique est employé pour évaluer l'activité antioxydante des différents extraits. Il est basé sur la technique mise au point par Takao et al., (1994). La détection de cette activité est basée sur le principe de la capture des radicaux libres fournis par le DPPH

(1,1diphényl-2picryl-hydrazyl). Lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres, sa couleur pourpre disparaît en présence de composés antioxydants, le temps optimal de la réaction est de 30 minutes (Cuendet et *al.*, 1997). Après développement de la chromatographie, les plaques sont séchées sous hotte et révélées par les giclées dans une solution méthanolique de DPPH (2%).

2.8.2. Méthode spectrophotométrique

2.8.2.1. Test antiradicalaire au DPPH

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons choisi la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri et *al.*, (2005). Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrazyl (DPPH) ayant une couleur violette en un composé jaune, le DPPH, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-Moreno, 2002).



1: Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)

Pourpre

2: Diphenylpicrylhydrazyl (non radicalaire)

Jaune

Figure 20. Forme radicalaire et réduite du DPPH

On prépare une solution de DPPH (3mg/ 100m) dans le méthanol. On prend 25µl des solutions d'extraits ou standards (quercitine, rutine, acide ascorbique, BHT) additionnées à 975 µl de la solution de DPPH ultérieurement cité. Après agitation avec un vortex, les tubes sont laissés dans l'obscurité pendant 30 minutes, la décoloration de ces derniers par rapport au contrôle négatif (contiennent uniquement la solution de DPPH) est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

Considérons ; **Abs(c)** : absorption du contrôle à 517nm.

Abs(e) : absorption de l'échantillon à 517nm.

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{\text{Abs}(c) - \text{Abs}(e)}{\text{Abs}(c)} \times 100$$

Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre (0-1 mg/ml), (0-2mg/ml) et (0-12mg/ml) pour les extraits Dic, Met et Aqe, Eth respectivement. Alors que celle des antioxydants standards (quercitine, rutine, acide ascorbique, BHT) sont comprises entre 0 à 12 µg/ml.

2.8.2.2. Test de blanchissement du β -carotène

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

L'émulsion β -carotène / acide linoléique est préparée par solubilisation de 0,5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, 25 µl de l'acide linoléique et 200 mg de Tween-40 sont additionnés. Le chloroforme est complètement évaporé au Rotavapeur, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. A 350 µl de solution d'extraits ou d'antioxydants de référence (BHT) solubilisé dans le méthanol (2 mg/ml), on additionne 2,5 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350 ml de méthanol), est suivie par la lecture de l'absorption à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures.

L'activité antioxydante relative (**AAR**) des extraits est calculée selon l'équation suivante :

Considérons ; **Abs(e)** : absorption de l'échantillon à 490 nm, t=48h.

Abs(BHT) : absorption de l'antioxydant de référence à 490 nm, t=48h.

$$\text{AAR} = \frac{\text{Abs}(e)}{\text{Abs}(\text{BHT})} \times 100$$

2.9. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe (% d'inhibition en fonction de la concentration). La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par le test de Student pour les comparaisons simples, ou ANOVA univariée suivie du test de Dunnet/Tukey pour les comparaisons multiples. Le logiciel (Graph pad. Prism. V 5.00) est utilisé pour la détermination des taux de signification, les valeurs de $p < 0,05$ sont considérées statistiquement significatives.

II. Résultats et discussions

1. Paramètre physique

Les résultats obtenus pour les rapports (partie comestible / fruit et noyau / fruit) du fruit de *Crataegus azarolus* L. sont la moyenne de 30 répétitions de pesée (**tableau VI**).

Tableau VI. Rapports (partie comestible / fruit et noyau / fruit) du fruit de *Crataegus azarolus* L.

partie comestible/fruit(%)	noyau/fruit(%)
77,51 ± 3,37	22,65 ± 2.60

Les valeurs représentent la moyenne de 30 essais ±SD

Ces résultats montrent que le rapport pulpe/fruit de *Crataegus azarolus* L. dépasse les 70%, il est de 77,51%. Ce rapport s'approche des résultats de Koyuncu et *al.*, (2007) qui montrent que ce rapport pour les *Crataegus se* situe entre 64,35 et 84,69% .

Cette valeur est comprise dans le large intervalle des fruits pulpeux décrite par Bretaudeau et Faure, (1992) signale que les rapports pulpe/fruit concernant les fruits pulpeux dépassent les 50%.

Comme les substances nutritionnelles et actives consommables se concentrent dans la pulpe, plus le rapport pulpe/fruit est important plus le taux des substances consommées est importante.

2. Détermination du taux d'humidité

Afin de déterminer le taux d'humidité dans les fruits de *Crataegus azarolus* L., on a utilisé la méthode d'Audigie et *al.*, (1987), dont l'objectif est d'exprimer les résultats des constituants biochimiques par rapport à la matière sèche, utilisé par la suite dans l'extraction.

Le **tableau VII** présente les valeurs en pourcentage du taux d'humidité et de matière sèche du fruit de *Crataegus azarolus* L.

Tableau VII. Le taux d'humidité et de matière sèche du fruit de *Crataegus azarolus* L.

Teneur en eau (g/100g)	Teneur en matière sèche (g/100g)
66,86 ± 0,33	33,54 ± 0.33

Les valeurs représentent la moyenne de 30 essais ±SD

La pulpe de *Crataegus azarolus* L. présente une teneur élevée en eau 66,86%, cette dernière est assez proche de celle trouvée par Oscane et *al.*, (2005), soit 64,24% pour des variétés de fruit de Crataegus.

Par ailleurs, Sparks et Martin (1999) rapportent une teneur en matière sèche des azéroles de 46,5%, qui est relativement élevée par rapport à la notre (33,54%).

La variation de la teneur en eau peut être attribuée au facteur variétal, à l'époque de maturation et de récolte et aux caractéristiques pédoclimatiques.

Ce fruit, selon sa teneur en eau, peut être classé comme fruit intermédiaire entre les fruits charnus (pomme, poire, pêche, ...) qui contiennent de 80 à 90% d'eau et les fruits secs d'un taux d'humidité qui varie entre 20 à 40%.

3. Détermination du taux de matière organique

La teneur en cendre du *Crataegus azarolus* L. a été déterminée après incinération, qui permet d'obtenir une cendre grisâtre représente les diverses substances minérales.

Le taux de cendre nous permet d'exprimer le taux de matière organique par rapport au poids sec et par la suite au poids frais de la partie comestible du fruit (Linden, 1994).

Tableau VIII. Le taux de cendre et de matière organique des fruits du *Crataegus azarolus* L.

Teneur en cendre (g/100g)	Teneur en matière organique (g/100g)
3,52 ± 0,1	96,92 ± 0,1

Les valeurs représentent la moyenne de 30 essais ±SD

Selon Bretaudeau et Fauré (1992), les diverses substances minérales représentent 0,3 à 3% environ du poids frais d'origine végétale. La pulpe de *Crataegus azarolus* L. présente une teneur en cendre de 3,52% de matière sèche, qui est de 1,18% par rapport à la matière fraîche.

En comparant avec la valeur donnée par Oscane et *al.*, (2005) soit 2,28% de matière minérale est inférieure à la notre (3,52%), cette dernière est proche de la valeur donnée par Herrera (1984) soit 4,3% pour des fruit de *Crataegus*.

4. Procédés d'extraction

La préparation des extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. a été effectuée selon la méthode proposé par Aberkane, (2006). Cette extraction est réalisée par l'utilisation d'une série de solvants à polarité croissante (Éther de pétrole → Dichlorométhane → Méthanol) permettant ainsi la séparation des composés selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation (composé aglycones, mono, di et tri-glycosylés) (Markham, 1982). Pour l'extrait aqueux, c'est le résultat d'une simple macération à froid suivant la méthode de Drissa et *al.*, (2004).

Ces procédés d'extraction ont permis d'obtenir quatre extraits : l'extrait Ethéropétrolique (E.Eth), l'extrait Dichlorométhanique (E.Dic), l'extrait Méthanolique

(E.Met) et l'extrait aqueux (E.Aqe). D'après Ciulei (1982) Le **tableau IX** résume la composition probable de chaque extrait.

Tableau IX. Les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés.

(D'après Ciulei, 1982).

Extrait	Constituants probables
Eth	huiles volatiles, lipides, acide gras, stérols, triterpènes, caroténoïdes, alcaloïdes basiques, flavonoïdes aglycones, coumarines, chlorophylles.
Dic	terpénoïdes, polyphénols aglycones, flavonoïdes aglycones.
Met	polyphénols glycosylés (flavonosides, tanins, anthocyanosides coumarines), sels d'alcaloïdes, triterpènes glycosylés, stérols glycosylés.
Aqe	tanins, Flavonoïdes di et tri glycosylés, sels d'alcaloïdes, coumarines, acides aminés, acides phénoliques et glucides.

La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids du fruit sec pulvérisé sont représentés dans le **tableau X** ci-dessous.

Tableau X. Aspects, couleurs et rendement des divers extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement
Eth	Huileux	Marron brunâtre	0,55%
Dic	poudre	Vert acrai	0,65%
Met	visqueux	Marron foncé (miel)	39.14%
Aqe	visqueux	Marron clair	22.80%

Les résultats obtenus montrent que parmi les quatre extraits, l'extrait (Met) représente le rendement le plus élevé de 39,14%, suivi par l'extrait (Aqe) de 22,80%, alors que les

extraits apolaires possèdent des rendements plus bas, dont l'extrait (Dic) par 0,65% suivi par l'extrait (Eth) avec un rendement de 0,55%.

5. Analyse des extraits

5.1. Tests préliminaires

Les tests préliminaires effectués ont permis d'effectuer le tableau suivant :

Tableau XI. Résultats des tests préliminaires des flavonoïdes, des tanins et des alcaloïdes sur les différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L.

Teste Extrait	Couleur du témoin	Flavonoïde	Tanins	Alcaloïdes
Eth	jaune	Jaune orange ±	Jaune -	Absence de précipité -
Dic	vert clair	Marron clair ±	Vert olive +++	Absence de précipité -
Met	jaune pâle	Rouge cerise +++	Vert olive +++	Précipité orange ++
Aqe	jaune pâle	Rouge cerise +++	Vert olive +++	Précipité orange ±

- Réaction négative, ± Réaction louche, ++ Réaction positive, +++ Réaction très positive.

A l'égard des résultats obtenus, la présence des flavonoïdes et des tanins dans les fruits du *Crataegus azarolus* L. est évidente, ils présentent les substances secondaires principales de ce fruit, ce qui est confirmé depuis une dizaine d'année (Brunetone, 1999) et reste un sujet de plusieurs études récentes et intéressantes comme celles de Chang et *al.*, (2006), Kao et *al.*, (2007), Rita Bila et *al.*, (2007), Zbynek et *al.*, (2008a) et Zbynek et *al.*, (2008b).

Les extraits polaires montrent une présence des flavonoïdes plus importante que les extraits apolaires, ceci peut être attribué à la différence du degré de polarité des flavonoïdes, dont les flavonoïdes polaires représentent la fraction la plus élevée.

L'apparition de la couleur verdâtre reflète la présence des tanins catéchiques (condensés) dans les extraits polaires (E.Aqe, E.Met) et moyennement polaire E.Dic, alors son absence totale dans l'extrait Eth apolaire.

Concernant le test des alcaloïdes, par le réactif de Dragendorff donne des résultats moyens ou minimes qu'avec les extraits polaires E.Met et E.Aqe, alors que les résultats du test par le réactif de Mayer sont généralement négatifs.

5.2. Chromatographie sur couche mince CCM

Pour une caractérisation partielle des différents extraits du *fruit de Crataegus azarolus* L., une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée. Les standards (témoins) utilisés sont des composés phénoliques, d'où la rutine, la quercétine et la catéchine sont des flavonoïdes, l'acide tannique est un tanin hydrolysable et l'acide gallique est un acide phénolique. Le tableau ci dessous présente les valeurs des rapports frontaux (RF), ainsi que les couleurs des standards après révélation par l'acide sulfurique.

Tableau XII. Rapports frontaux et couleurs des standards après révélation

Standards	symbole	Couleur après révélation	RF
Catéchine	Cat	Rouge	0,87
Quercétine	Que	Jaune orange	0,93
Rutine	Rut	orange	0,52
Acide gallique	Ag	Mauve	0,86
Acide tannique	At	Mauve	0,83

Le système de migration utilisé pour les extraits polaires est le BAW (n-Butanol : Acide acétique : Eau ; 60 :15 :35 V/V), permet la migration des standards ainsi que la séparation des extraits Met et Aqe (**figure 21**).

Système (BAW): n-Butanol: Acetic acid : Water (60 : 15 : 35 V/V)



E.Met Ag Que At Rut Cat E.Aqe

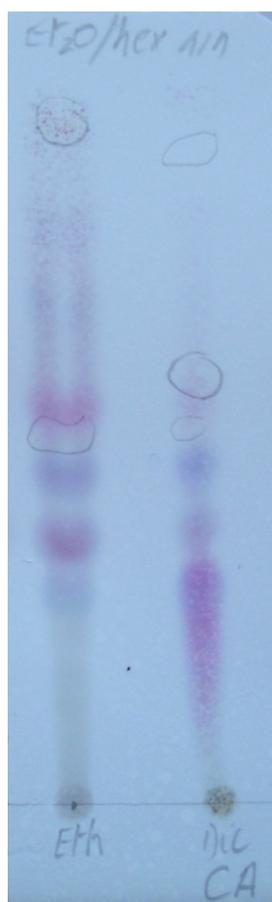
Figure 21. Chromatographie sur couche mince des extraits polaires des fruits de *Crataegus azarolus* L. et des standards (révéler par la vanilline sulfurique)

Après révélation de la plaque CCM, on utilise la vanilline sulfurique. Cinq taches apparaissent visibles pour l'extrait Met et deux taches pour l'extrait Aqe, la mesure des rapports frontaux de chacune des taches révèle que l'une des taches de l'extrait Met est peut-être correspond à la rutine (RF=0,52).

Tandis que pour les extraits apolaires et moyennement polaire Eth, Dic deux systèmes de migration (hexane : éther diéthylique (V/V) et Ether de pétrole : acétate d'éthyle (8 : 2 V/V)) ont été employés en absence des standards polaires par rapport aux systèmes de migration (figure 22).

Hexane : Ether diéthylique (V/V)

Ether de pétrole : Acétate d'éthyle (8 :2 V/V)



E.Eth

E.Dic



E.Eth

E.Dic

Figure 22. Chromatographie sur couche mince des extraits apolaires des fruits du *Crataegus azarolus* L. (révéler par la vanilline sulfurique)

Les deux systèmes révèlent l'apparition de plusieurs taches pour les extraits apolaire et moyennement polaire (Eth, Dic) avec des couleurs variantes entre mauve, rose et bleu témoignant probablement la présence des stérols et des terpènes.

5.3. Chromatographie à haute performance HPLC–RP-C18

La Chromatographie à haute performance RP-C18 permet d'identifier la présence de quelques substances dans chacun des quatre extraits étudiés, par comparaison entre le temps de rétention (TR) des standards et les chromatogrammes des extraits.

L'analyse des différents extraits par l'HPLC permet d'identifier la présence de la catéchine dans les extraits (Eth et Dic) (**figure 23, 24**), l'extrait Dic est révélé le plus riche en acides phénoliques et en tanins.

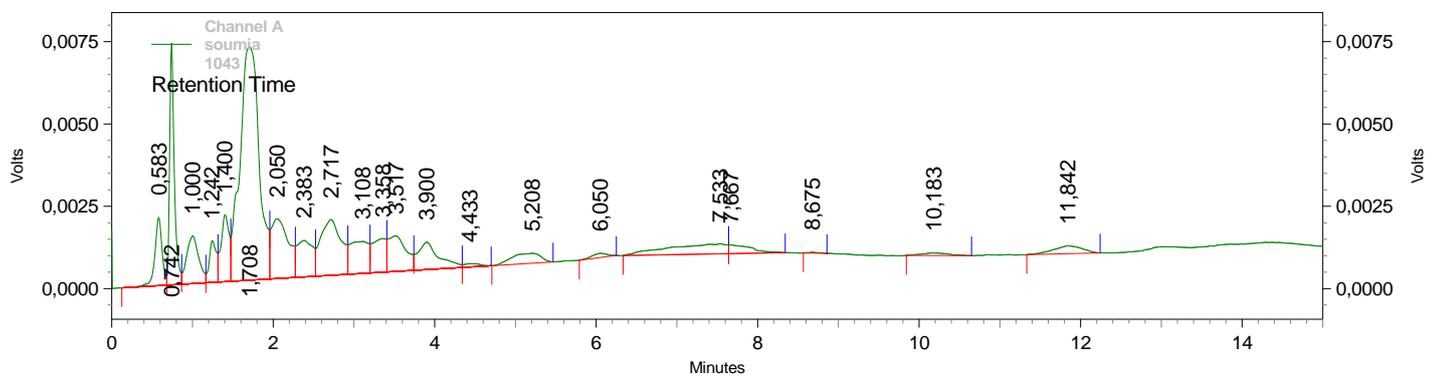


Figure 23. Chromatogramme de l'extrait éthérique du *Crataegus azarolus* L.

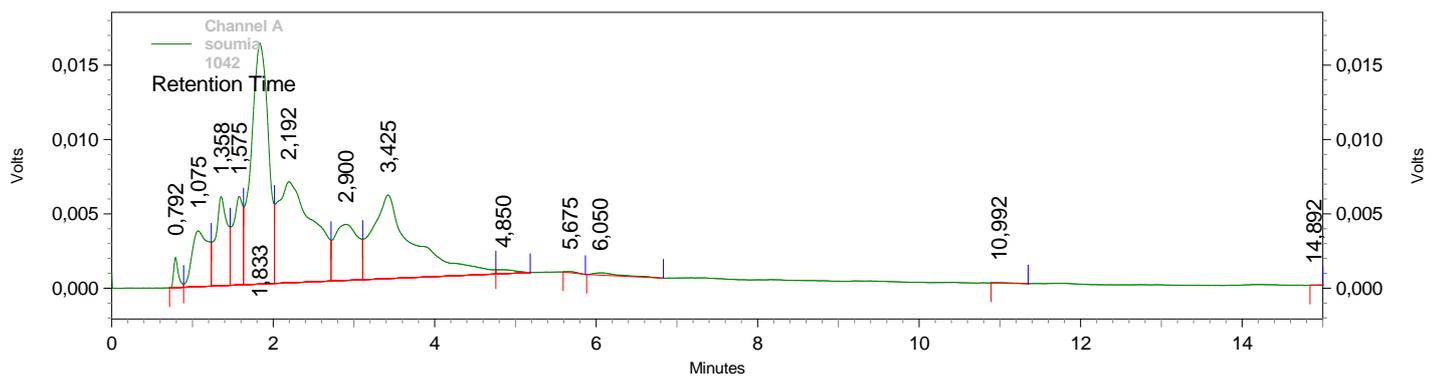


Figure 24. Chromatogramme de l'extrait dichlorométhane du *Crataegus azarolus* L.

Alors que pour l'extrait Met (**figure 25**), la rutine, l'acide caféique sont les deux composants détectés et sont communs avec l'E.Dic.

Pour l'extrait aqueux (**figure 26**), son chromatogramme paraît très coïncidant avec celui de l'E.Met, mais on a pu seulement détecter la présence de l'acide caféique en comparant les temps de rétention.

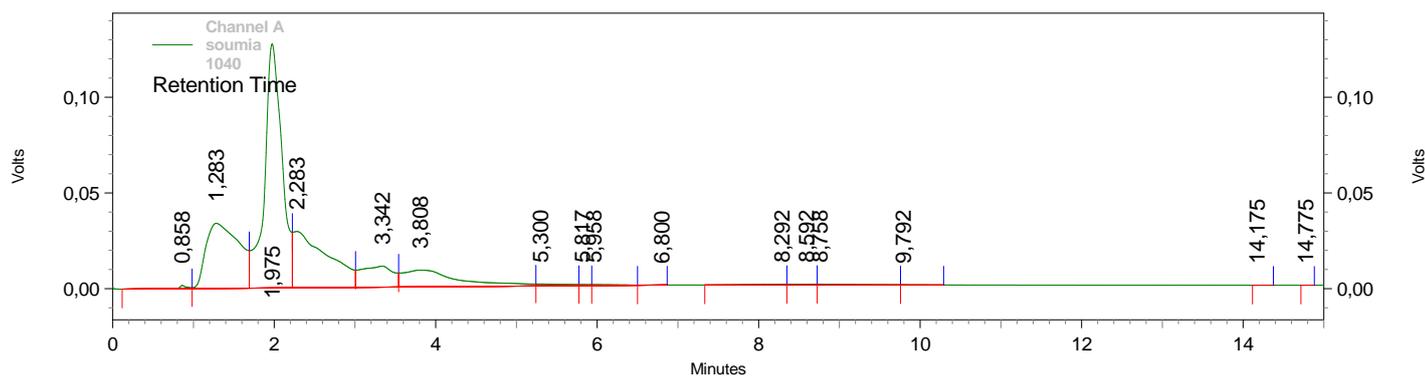


Figure 25. Chromatogramme de l'extrait méthanolique du *Crataegus azarolus* L.

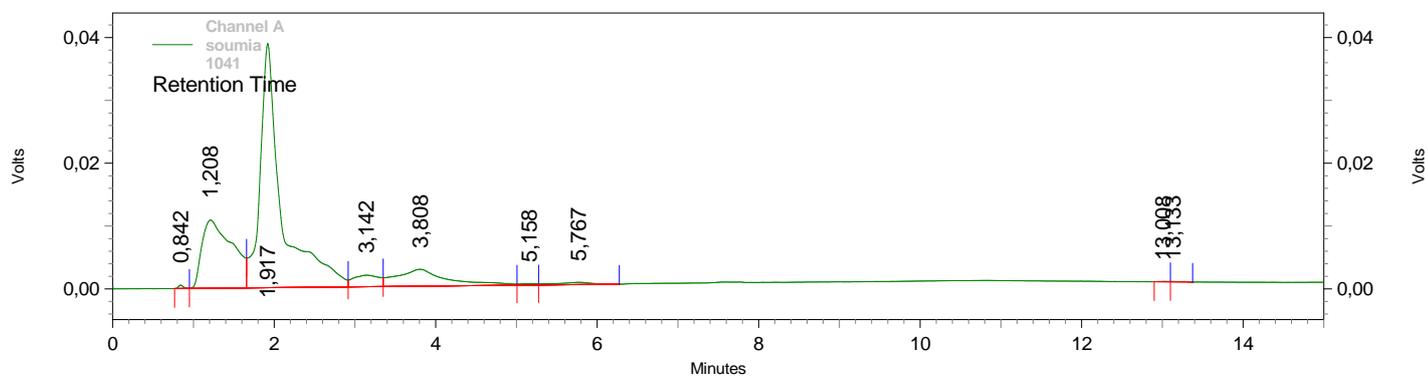


Figure 26. Chromatogramme de l'extrait aqueux du *Crataegus azarolus* L.

Le **tableau XIII** résume Les résultats obtenus pour chaque extrait:

Tableau XIII. Temps de rétention des standards testés et détectés dans les différents extraits des fruits de *Crataegus azarolus* L.

Standards	(TR) min	E.Eth	E.Dic	E.Met	E.Aqe
Quercétine	6,57	-	-	-	-
Rutine	3,33	-	+	+	-
Catéchine	1,74	+	+	-	-
Acide caféique	1,99	-	+	+	+
Acide tannique	1,64	-	-	-	-
Acide gallique	1,67	-	-	-	-
Caféine	2.51	-	-	-	-

A partir de ce tableau, on remarque l'absence totale de la quercitine dans le fruit de *Crataegus azarolus* L. L'étude faite par Zbynek et ses collaborateurs (2008a) en utilisant l'HPLC-ED a montré la présence de l'acide gallique et la rutine et l'absence de la quercitine dans l'extrait du fruit de *Crataegus pinnatifida*.

5.4. Dosage des différentes substances phénoliques

Au moyen spectrophotométrique UV-Vis, en mesurant à une longueur d'onde précise (la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) de la molécule ou du complexe qu'elle forme avec un réactif), l'intensité d'absorption (densité optique, DO) par rapport à un témoin de concentration connue, permettra de déterminer la quantité de la molécule présente dans un échantillon.

Afin de caractériser les différents extraits préparés à partir des fruits de *Crataegus azarolus* L., un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins a été effectué. Le choix du dosage de ces substances réside dans les résultats obtenus des tests

préliminaires et dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes sont attribuées à ces molécules.

La méthode du dosage des polyphénols totaux est celle de Folin –Ciocalteu (Rebéreau-Gayon, 1968) où l'acide gallique a été utilisé comme standard. Tandis que celui des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (Bahorun et *al.*, 1996), en utilisant comme standard la quercétine, enfin celui des tanins condensés a été effectué selon la méthode de Broadhurst et Jones (1978) modifiée, en utilisant la vanilline comme réactif et la catéchine comme standard. Les résultats sont représentés dans le **tableau XIV**.

Tableau XIV. Dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés dans les extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L.

Dosage Extrait	phénols totaux ($\mu\text{g EAG/mg}_{\text{ext}}$)	Flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg}_{\text{ext}}$)	Tanins ($\mu\text{g EC/mg}_{\text{ext}}$)
Eth	7,590 \pm 2,262	1,399 \pm 0,290	-
Dic	50,115 \pm 9,190	2,327 \pm 0,389	109,000 \pm 4,00
Met	18,649 \pm 2,293	1,182 \pm 0,739	31,000 \pm 4,57
Aqe	10,347 \pm 1,613	0,321 \pm 0,085	5,166 \pm 0,288

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais \pm SD

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que l'extrait Dic est le plus riche en polyphénols (50.115 \pm 9.190 $\mu\text{g EAG/mg}_{\text{ext}}$) suivi par l'E. Met avec une valeur moyenne (18.649 \pm 2.293 $\mu\text{g EAG/mg}_{\text{ext}}$). Tandis que les extraits (Eth et Aqe) ont montré des valeurs inférieures et voisines (7.59 \pm 2.262 et 10,347 \pm 1,613 $\mu\text{g EAG/mg}_{\text{ext}}$).

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux révèle que l'extrait Dic est en premier ordre avec une teneur de (2,327 \pm 0,389 $\mu\text{g EQ/mg}_{\text{ext}}$), suivi par l'extrait Eth (1,399 \pm 0,290 $\mu\text{g EQ/mg}_{\text{ext}}$). Par la suite viennent les extraits polaires (Met et Aqe) avec les teneurs suivantes 1,182 \pm 0,739 et 0,321 \pm 0,085 $\mu\text{g EQ/mg}_{\text{ext}}$ successivement.

Le dosage des tanins condensés montre la haute teneur de ces molécules dans l'extrait Dic ($109,00 \pm 4,00 \mu\text{g EC}/\text{mg}_{\text{ext}}$) et leur absence dans l'extrait Eth. L'extrait méthanolique contient une valeur moyenne ($31,00 \pm 4,57 \mu\text{g EC}/\text{mg}_{\text{ext}}$) suivie par l'E.Aqe ($5.166 \pm 0.288 \mu\text{g EC}/\text{mg}_{\text{ext}}$).

L'examen statistique de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation linéaire hautement significative ($R^2 = 0,998$ p 0,001) entre la teneur des extraits en tanins condensés et en composés phénoliques (**figure 27**). De même, une corrélation non significative ($R^2 = 0,661$, $p < 1$) entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques.

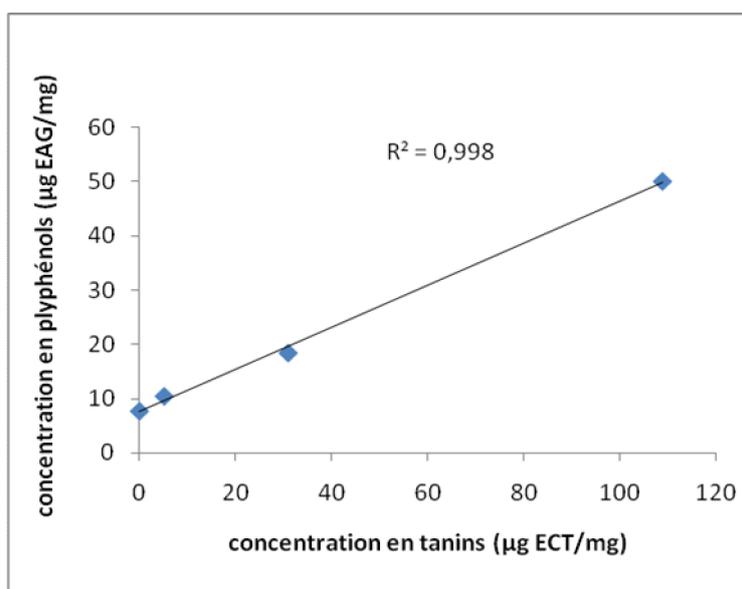


Figure 27. Corrélation linéaire entre la teneur en polyphénols totaux et la concentration des tanins condensés des différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L.

6. Test de l'activité antimicrobienne

La méthode de diffusion en milieu gélosé (Bauer et *al.*, 1966) utilisée est une méthode simple qui donne des résultats, mais il est difficile d'utiliser cette méthode avec des quantités importantes d'échantillons car le disque est petit et le papier filtre utilisé ne permet pas d'imprégner une grande quantité au risque de déborder l'échantillon étudié (la quantité maximale imprégnée est de 25 à 30 μ l). En réalité, ce test n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes des extraits, il nous permet de sélectionner pour chaque souche l'extrait qui a présenté le plus d'activité antimicrobienne. Ce teste doit être complété par un autre test qui permettra de déterminé la CMI (concentration minimale inhibitrice) des extraits actifs.

Selon Pessini et *al.*, (2003):

- pour une CMI < 100 μ g/ml, l'activité antibactérienne est bonne.
- pour une 100 < CMI < 500 μ g/ml, l'activité antibactérienne est moyenne.
- pour une 500 < CMI < 1000 μ g/ml, l'activité antibactérienne est faible.
- pour une CMI > 1000 μ g/ml, l'activité antibactérienne est nulle.

Pour la dissolution des extraits, un test préliminaire est effectué pour choisir un solvant approprié (qui ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes) ce qui a mené au choix du DMSO pour les extraits organiques et l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux. On a utilisé des dilutions d'une solution mère de 1g/ml où les disques contiennent au maximum 30mg de différents extraits appliqués sur un milieu gélosé écouvillonné par une suspension d'une souche microbienne. **Figure 28**, présente l'évaluation de la croissance bactérienne après 24h d'incubation.

Zones d'inhibition de l'extrait Dic sur *S. aureus***Figure 28.** Évaluer de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé

En mesurant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne au tour des disques, qui présentent l'activité antimicrobienne maximale illustrée par le **tableau XV**.

Tableau XV. Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne des différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L.

Les Les micro- organismes	Diamètre de zones d'inhibition en mm			
	Aqueux	Méthanolique	Diclorométhane	Ether de pétrole
<i>Staphylococcus aureus</i>	12 ± 0.52	7 ± 0.33	15 ± 0.45	11 ± 0.42
<i>Escherichia coli</i>	12 ± 0.38	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.00 ± 0.00	9.45 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Candida albicans</i>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 essais ± SD (les zones sont mesurées en mm)

Selon les résultats mentionnés dans le tableau, nous avons noté une résistance où aucune zone d'inhibition n'a été détectée avec :

- L'extrait (Eth) contre toutes les souches microbiennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*. La seule zone mesurée contre *Staphylococcus aureus* est extrêmement faible.
- L'extrait (Dic) contre toutes les souches microbiennes, sauf une activité antimicrobienne montrée avec *Staphylococcus aureus* d'un diamètre de 15 mm.
- L'extrait (Met) contre l'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et la levure *Candida albicans* de très faibles zones d'inhibition sont remarquées contre *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*.
- L'extrait (Aqe) contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* et *Candida albicans*. on a mesuré deux zones d'inhibition bactérienne qui reste toujours modeste contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

D'après les résultats, on constate que quelque soit la nature de l'extrait et de sa concentration, les souches *Pseudomonas aeruginosa* (gram négatif) et *Candida albicans* possèdent une forte résistance et leur croissance est similaire aux témoins. Ainsi Il apparaît que *Staphylococcus aureus* (gram positif) est la bactérie la plus susceptible; ceci peut être attribué à la différence dans la structure des parois cellulaires. Les bactéries gram positives ont une seule couche alors que les bactéries gram négatives ont une structure multicouche liée par une membrane cellulaire externe.

Finalement, ces résultats restent très loin d'être comparés avec des antibiogrammes, où la concentration des disques ne dépasse pas quelques centaines de µg d'antibiotique. Dans tous les cas, ces résultats sont en accord avec ceux de Mouhammedi, (2006) et Krisch et al., (2008), qui ont suggéré que les *Crataegus* étudiés (*C. oxyacantha*, *C. pinnatifida*) n'ont pas d'effet antimicrobien.

7. Test de l'activité antioxydante

7.1. Méthode chromatographique CCM (test au DPPH)

La révélation des plaques CCM par la solution méthanolique à (2%) de DPPH (réalisée par la même méthode précédemment décrite pour l'analyse des extraits) est une CCM de criblage qui permet l'obtention d'une vue préliminaire sur l'activité antioxydante des différents extraits testés. Les substances actives sont visualisées comme des taches jaunes sur un fond violet (**figure 29**).

n-Butanol : Acide acétique : eau (60 : 15 : 35 V/V)

Ether de pétrole : Acétate d'éthyle (8:2V/V)

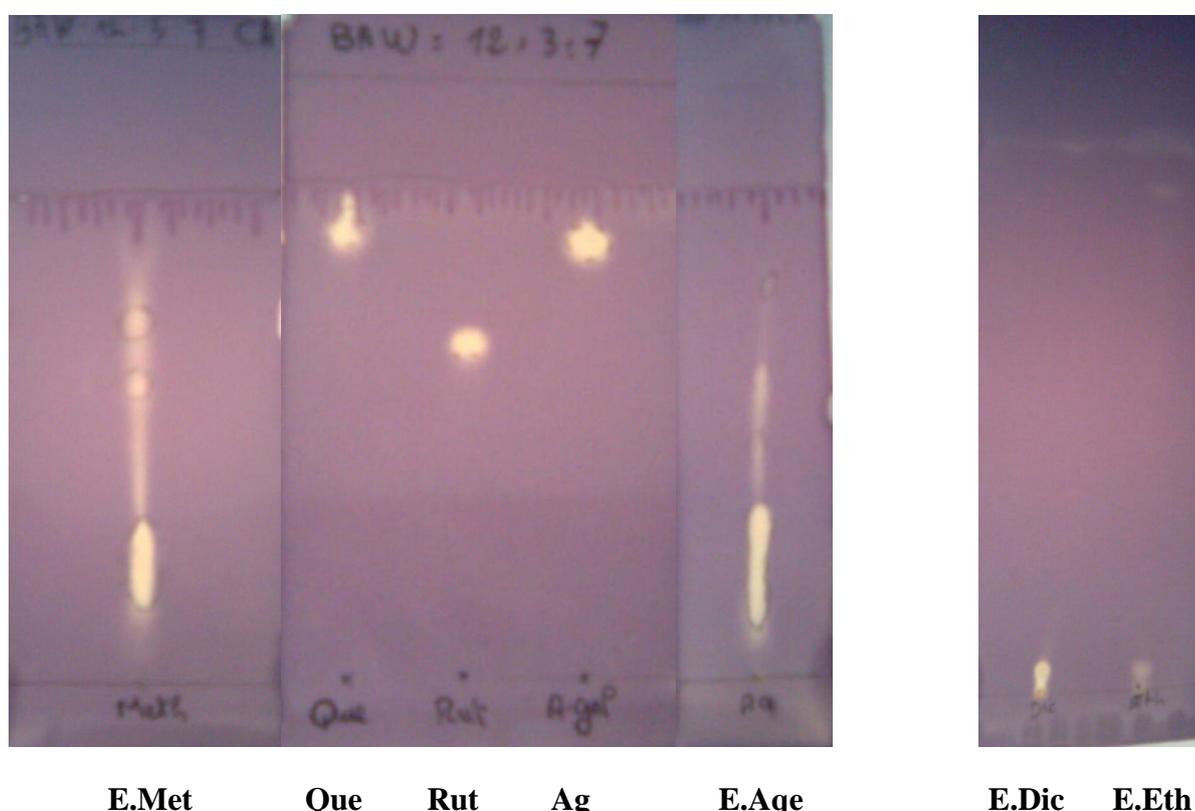


Figure 29. Chromatographie sur couche mince des extraits des fruits du *Crataegus azarolus* L. et des standards (révélation par le DPPH)

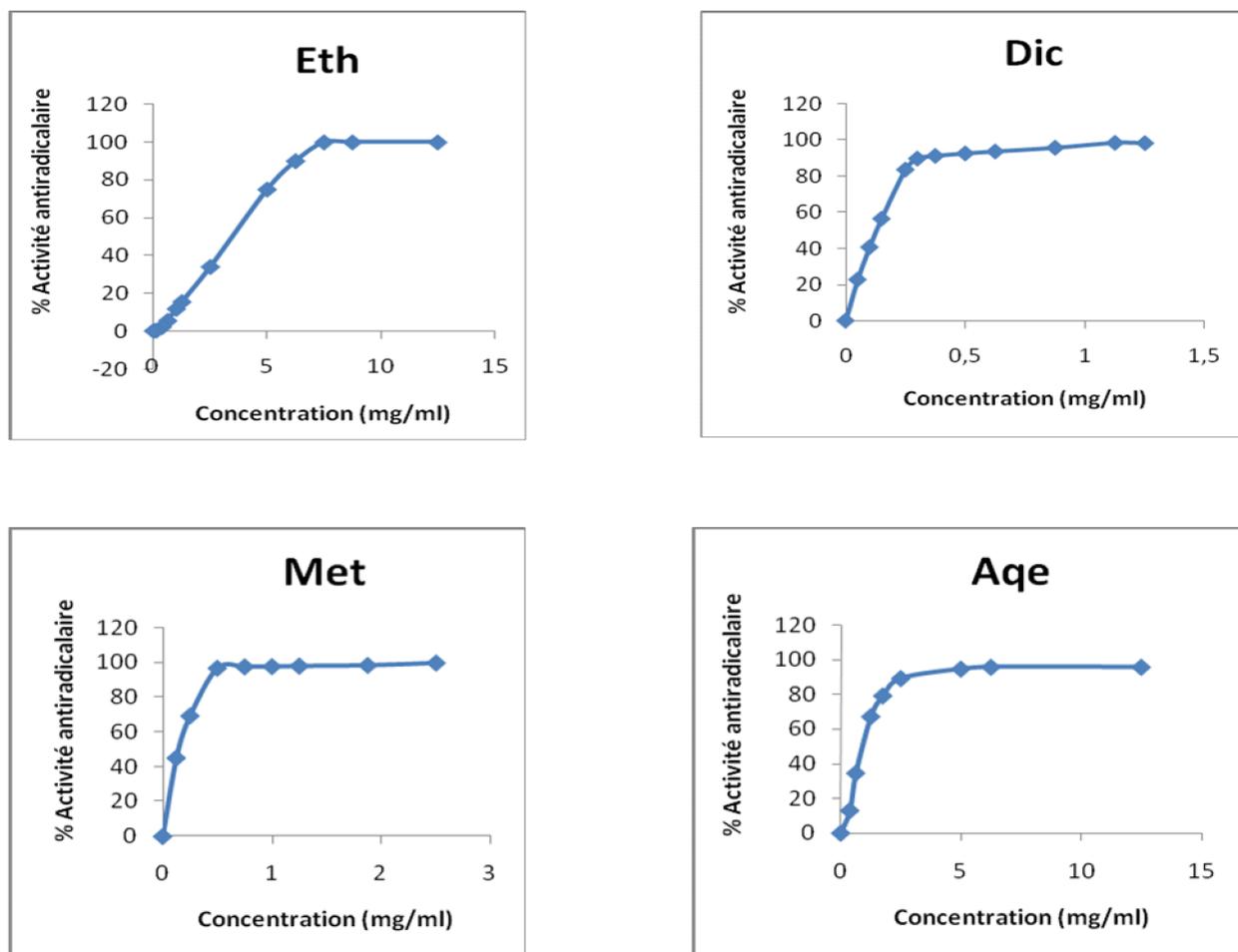
Globalement, les taches jaunes sont plus claires et denses dans les chromatogrammes des extraits polaires (Aqe, Met) par rapport aux extraits apolaires (Eth, Dic) où les substances actives sont très polaires, restent fixes au point de dépôt. L'une des taches apparait pour l'extrait Met correspondante à la rutine (RF=0,52), ce qui confirme le résultat obtenu lors de la révélation par la vanilline sulfurique.

7.2. Test au radical DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits du *Crataegus azarolus* L. vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par la déviation de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm.

Le DPPH est caractérisé par son adaptation à plusieurs échantillons dans une courte durée, aussi il est assez sensible pour détecter les ingrédients actifs à des basses concentrations, à cet effet, il a été employé pour le criblage des activités antiradicalaires des extraits végétaux (Yi et al., 2008).

Les profils des activités antiradicalaires obtenus (**figure 30**) révèlent que les extraits du *Crataegus azarolus* L. possèdent une activité antiradicalaire à dose dépendante.



(Chaque valeur représente la moyenne de deux essais)

Figure 30. Activité antiradicalaire des extraits du *Crataegus azarolus* L.

Les IC_{50} sont déterminées pour tous les extraits (**tableau XVI**). Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont introduits :

- ✓ **Calcul de l' EC_{50}** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%, $EC_{50} = (IC_{50}/\text{mg de DPPH/ml})$].
- ✓ **Calcul du pouvoir antiradicalaire (APR)** qui est inversement proportionnel à l' EC_{50} (Parakash et al., 2007).

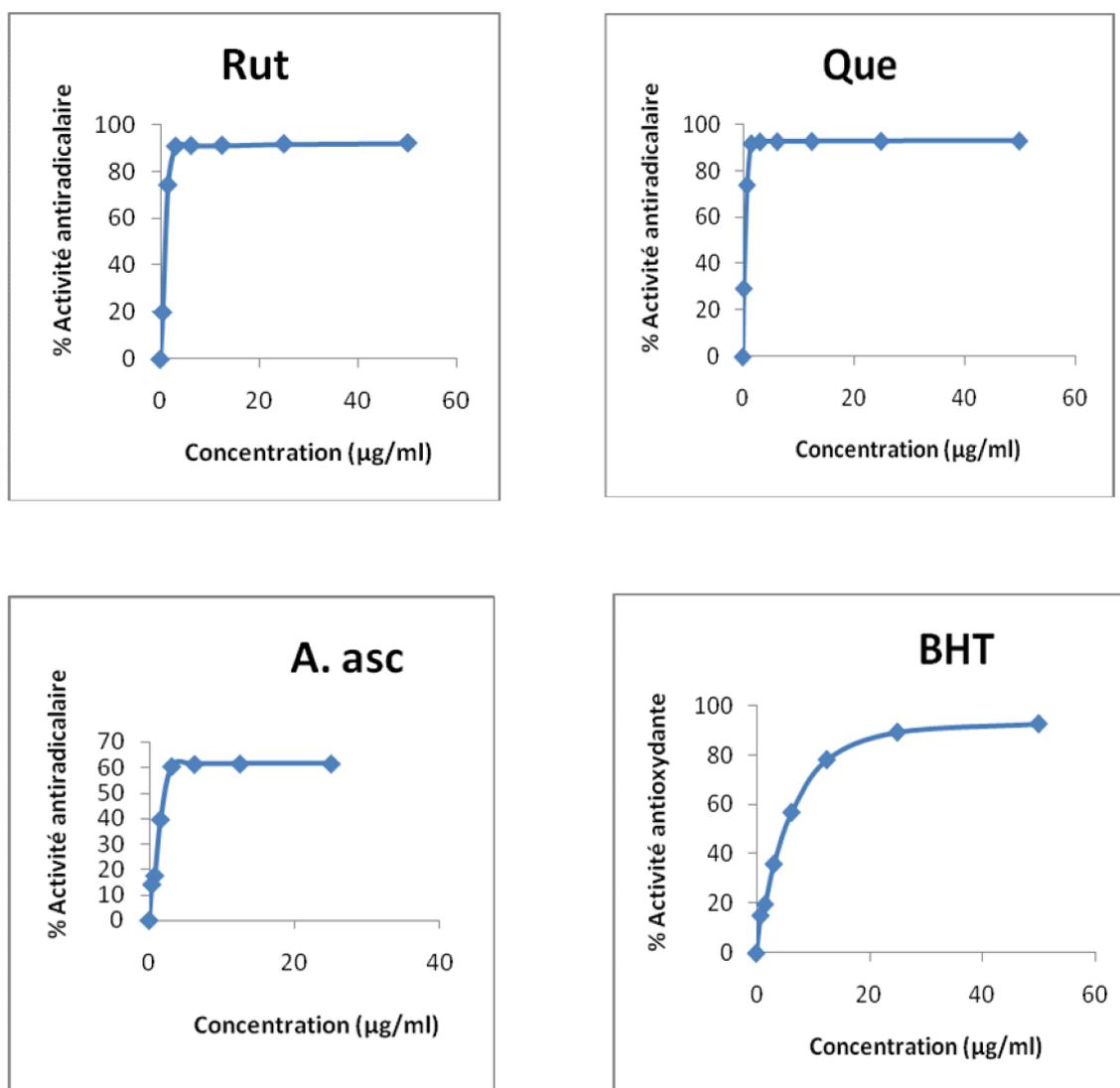
Tableau XVI. Les valeurs significatives de l'activité antiradicalaire des différents extraits du *Crataegus azarolus* L. et des standards testés.

Extrait+Standard	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	EC_{50} ($\mu\text{g}/\mu\text{g DPPH}$)	APR
Eth	3499.92 ± 2.08	119.655 ± 0.071	0.008 ± 0.000
Dic	137.33 ± 1.25	4.695 ± 0.042	0.212 ± 0.002
Met	202.75 ± 0.47	6.931 ± 0.016	0.144 ± 0.000
Aqe	1164.71 ± 9.79	39.819 ± 0.334	0.025 ± 0.000
BHT	$6.596 \pm 0,109$	0.225 ± 0.003	4.434 ± 0.073
A. ascorbique	2.430 ± 0.018	0.083 ± 0.000	12.036 ± 0.091
Rutine	1.419 ± 0.007	0.0485 ± 0.000	20.609 ± 0.104
Quercétine	$0,652 \pm 0,006$	$0.022 \pm 0,00$	44.826 ± 0.447

Les valeurs représentent la moyenne de deux essais \pm SD

A des fins comparatives, quatre antioxydants standards sont utilisés le BHT, l'acide ascorbique, la rutine et la quercétine (**figure 31**), ils ont montré une activité antiradicalaire puissante avec des IC_{50} de l'ordre de $6,596 \mu\text{g/ml}$ et $2,430 \mu\text{g/ml}$, $1,419 \mu\text{g/ml}$, $0,652 \mu\text{g/ml}$ et des APR de l'ordre de 4.434, 12, 20,609 et 44,826 respectivement.

La valeur de EC_{50} de l'acide ascorbique ($0.083 \mu\text{g}/\mu\text{g DPPH}$) est très proche à celle rapportée par Siddhurajuet et Manian (2007) ($EC_{50}=0,07 \mu\text{g}/\mu\text{g DPPH}$).



(Chaque valeur représente la moyenne de deux essais)

Figure 31. Activité antiradicalaire des standards

Baydar et *al.* (2007) ont rapporté que la rutine a montré une grande efficacité antiradicalaire vis-à-vis le radical DPPH par rapport au BHT, ce qui est en accord avec les résultats du présent travail où la rutine possède un pouvoir antiradicalaire cinq fois supérieur à celui du BHT.

Parmi les quatre extraits du *Crataegus azarolus* L., l'extrait Dic représente l'extrait le plus actif avec une IC_{50} de l'ordre $137,33\mu\text{g/ml}$ et un APR de 0,212 suivi par l'extrait Met avec une IC_{50} $202,75\mu\text{g/ml}$ et un APR de 0.144 suivi par l'extrait Aqe (IC_{50} $1164,71$ et APR de 0,025). Par contre, l'extrait apolaire Eth présente une très faible

activité antiradicalaire, ce qui montre que les antioxydants apolaires sont inactifs vis-à-vis du DPPH.

Globalement ces résultats confirment les résultats de la CCM de criblage où les extraits polaires apparaissent les plus actifs.

En comparaison avec les antioxydants standards, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs. Le BHT ayant l'APR le plus faible entre les standards est 20 fois plus actif que l'extrait Dic, 30 fois plus actif que l'extrait méthanolique.

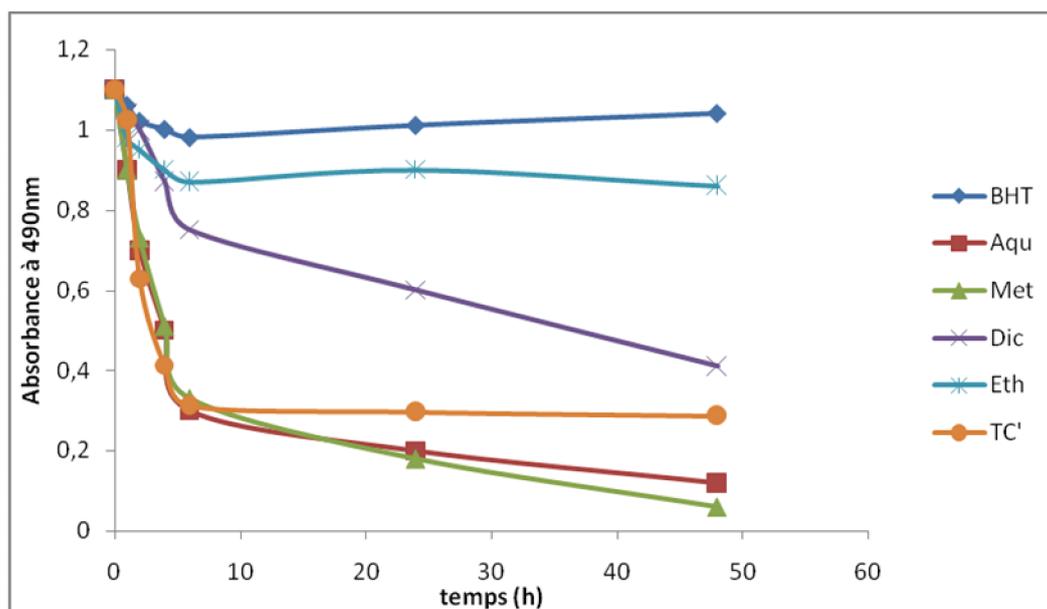
L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence des corrélations linéaires non significatives ($R^2=0,821$ $p<0,1$), ($R^2=0,522$ $p<0,3$) et ($R^2=0,851$ $p<0,1$) respectivement entre la teneur des extraits en composés phénoliques, en flavonoïdes et en tanins avec le pouvoir antiradicalaire (APR). En effet, les flavonoïdes et les tanins sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène.

Il est évident que la forte activité des extraits Dic et Met est attribuée à leur richesse en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins. L'extrait Dic possède la plus forte teneur en molécules dosées (polyphénols, flavonoïdes et tanins), suivi par l'extrait Met. Une étude faite par Kang et *al.* (2003) a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire. Aussi les études faites par Zbynek et *al.*, (2008b) concernant l'activité antioxydante du fruit de *Crataegus pinnatifida* testé par le DPPH et mesuré par l'HPLC –ED, ont montré l'activité antioxydante élevée de ce fruit.

7.3. Test de blanchissement du β -carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces radicaux libres vont par la suite oxyder la β -carotène hautement insaturée entraînant ainsi la disparition de sa couleur orange, qui est suivie par un spectre UV-VIS 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.

La cinétique du blanchissement du β -carotène en absence et en présence des extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L., et de l'antioxydant standard (BHT) ainsi que leurs activités antioxydantes relatives (AAR) suivies pendant 48 heures sont représentées dans les deux figures 32 et 33.



(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais)

Figure 32. Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits du *Crataegus azarolus* L., du BHT

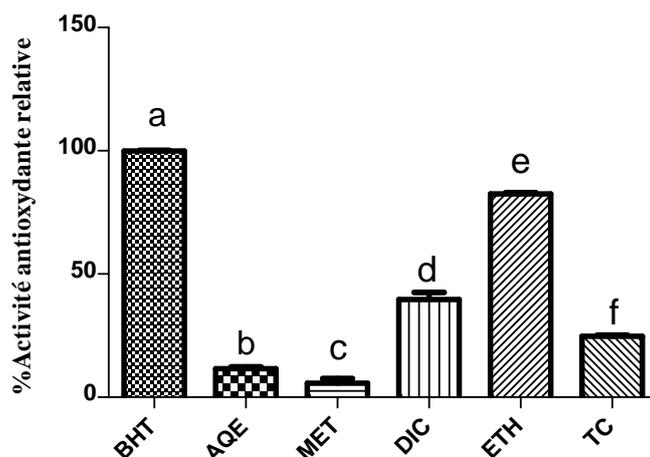


Figure 33. Activité antioxydante relative des extraits du fruit du *Crataegus azarolus* L., du BHT et du test contrôle dans le système β -carotène / acide linoléique (les valeurs sont la moyenne de trois mesures \pm SD), les barres avec des lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ($p < 0,01$).

D'après ces résultats, à l'exception des extraits polaires, il est évident que le BHT et l'extrait apolaire Eth, inhibent d'une manière hautement significative ($p < 0,01$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène par rapport au contrôle négatif qui représente (100%) de la peroxydation.

L'extrait éthéropétrolique (Eht) montre la plus grande activité inhibitrice dont l'activité antioxydante relative est de 82,457%, mais cette activité reste significativement inférieure ($p < 0,001$) à celle du BHT (100%) utilisé comme contrôle positif. Une activité antioxydante intermédiaire a été obtenue avec l'extrait dichlorométhanique (Dic) (39,668%) qui est une activité significative ($p < 0,001$) aussi inférieure à celle du BHT. En comparaison avec le BHT l'extrait éthéropétrolique (Eth) est 1,2 fois moins actif que le BHT, l'extrait dichlorométhanique (Dic) est 2,25 fois moins actif que le BHT.

On peut donc résumer l'ordre décroissant des extraits testés en terme d'activité antioxydante relative comme suivant : Eth > Dic > Aqe > Met. On constate que les extraits apolaires (Eth) ou moyennement apolaires (Dic) sont plus actives que les extraits polaires (Aqe, Met). Ces résultats peuvent être expliqués selon Chang et *al.*, (2006) d'où les principaux composés phénoliques (épicatéchine, procyanidol B₂ et acide chlorogénique) des extraits polaires des *Crataegus* sont totalement dégradés à une température ambiante de 23°C au bout de 2 jours.

D'une manière générale, ces résultats sont en accord avec la littérature qui suggère que l'activité antioxydante des extraits végétaux dépend du type du solvant d'extraction et de sa polarité dont la distribution des substances à activité antioxydante entre les différents extraits dépend de la polarité des extraits (Kang et *al.*, 2003). On peut donc expliquer l'activité des extraits apolaires de notre fruit par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par Frankel et ses collaborateurs (1994). Etant donné que le test de blanchissement du β -carotène est similaire à un système d'émulsion des lipides dans l'eau, Frankel et Meyer (2000) ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation des radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur des radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana et *al.*, 2006). Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplé à celle du β -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria et *al.*, 2006).

Conclusion Générale

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs. Leur utilisation en phytothérapie connaît de nos jours un intérêt sans précédent. Une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

L'étude des propriétés microbiologiques et antioxydantes des extraits du fruit saisonnier de *Crataegus azarolus* L., espèce appartenant à la famille des Rosacées, localisée surtout dans le Tell Algéro-Constantinois d'une façon spontanée, a permis d'obtenir des résultats intéressants.

Dans un premier temps, l'analyse des quatre extraits obtenus du fruit de *Crataegus azarolus* L., a mis en évidence la présence des flavonoïdes et des tanins dans les extraits polaires et moyennement polaires (Met, Aqe et Dic) et l'absence des tanins de l'extrait apolaire (Eth). Alors que l'analyse effectuée par chromatographie sur couche mince a montré la présence de la rutine dans l'extrait méthanolique.

L'analyse des différents extraits du *Crataegus azarolus* L. par HPLC a révélé la présence de quelques composés phénoliques dans les extraits, tels que dans l'extrait (Eth), la catéchine. Dans l'extrait (Dic) en plus de la catéchine, on remarque la présence de la rutine et de l'acide caféique. Alors que dans l'extrait méthanolique la rutine et l'acide caféique sont présents, dans l'extrait aqueux la présence de l'acide caféique.

L'analyse quantitative des extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. est représentée par le dosage spectral des trois substances bioactives : les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins révélant :

L'extrait (Dic) est le plus riche en métabolites dosés, les extraits méthanolique et aqueux ont une teneur considérable, alors que (Eth) est l'extrait en teneur moindre.

Le test de l'activité antimicrobienne des différents extraits a montré que les extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. ont une activité généralement modeste. D'ailleurs, la majorité des souches microbiennes testées (bactéries et levures) sont résistantes aux différents extraits.

Le criblage préliminaire des extraits par la CCM a permis de localiser le pouvoir piégeur du DPPH dans les extraits (Aqe, Met et Dic) les extraits de teneur considérable et élevée en composés phénoliques. Effectivement, le test au DPPH révèle que ces trois extraits sont les plus actifs comme piégeurs du radical DPPH dont l'extrait (Dic) qui est le plus riche en composés phénoliques, a l'effet antiradicalaire le plus puissant, suivi par l'extrait méthanolique puis l'extrait aqueux, alors que l'extrait apolaire (Eth) a montré une activité antiradicalaire faible.

La deuxième technique utilisée pour étudier l'activité antioxydante des différents extraits est la méthode du blanchissement du β -carotène a révélé que : l'extrait apolaire (Eth) est le plus actif, suivi par l'extrait (Dic). Alors que les extraits polaires sont les moins actifs dans ce test. Ce qui peut être rendu à la contribution d'autres composés dans cette activité.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in-vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche des substances et sources naturelles biologiquement actives. Des études complémentaires, précises et approfondies restent nécessaires pour pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

Références bibliographiques

Abdelguerfi A., 2003. Evaluation des besoins en matières de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante par l'agriculture "Bilans des Expertises". *Plan d'Action et Stratégie Nationale sur la Biodiversité*.

Aberkane M.C., 2006. Etude phytochimique de la plante *Pulicaria laciniata*. Thèse Doctoral. Faculté des sciences Département de chimie. Batna, 135p.

AFNOR-DGCCRF, 1995. Contrôle de qualité des produits alimentaires, méthodes d'analyses officielles. Paris, 416p.

Ames B. N., 1986. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res.*, **206**: 3-32.

Aminata k., 2004. Etude de trois plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère gastroduodéal dans le district de Bamako. Thèse Doctoral. Faculté de Médecine et de pharmacie et d'Odontostomatologie. Bamako, 161p.

Amiot M. J., 1990. Les composés phénoliques de la pomme, intérêts agronomiques et conséquences technologiques. *9ème colloque sur les recherches fruitières, Avignon, 4-6 décembre, Eds INRA, 279-289.*

Ammon H. P. and Handel M., 1981. *Crataegus*, Toxicology and Pharmacology, Part I: Toxicity. *Planta Med.* **43**: 105-322.

Ammon H.P.T. and Kaul R., 1994a. *Crataegus*. Herz-Kreislauf- Wirkungen von Crataegus extrakten, Flavonoide and procyanidunen. Teil 2: Wikungen auf das Herz. *Detsche Apotheker Zeitung*, **134**: 2521-2535.

Ammon H.P.T. and Kaul R., 1994b. *Crataegus*. Herz-Kreislauf- Wirkungen von Crataegus extrakten, Flavonoide and procyanidunen. Teil 3: Wikungen auf den Kreislauf. *Detsche Apotheker Zeitung*, **134**: 2631-2636.

Audigié C.L., figarella J. et Zonszain F., 1978. Manipulation d'analyses biochimique. Doin (Ed). Paris, 274p.

Awad M. A., De Jager A., Van Westeng L. M., 2000. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia horticulturae*, **83**: 249-263.

Aymonin G.G., 1993. Guide des arbres et des arbustes. Sélection du Reader's Digest (Ed). Paris, 351p.

Baba Aissa F., 1999. Les plantes médicinales en Algérie. Bouchène et Addiwen (Ed). Alger, 181p.

Babior B. M., Lambeth J. D., Nauseef W., 2002. The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys.* **397**: 342-344.

Bahorun T., 1997. Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne. Une source d'approvisionnement potentielle. *Food and Agricultural Research council Mauritiass.* pp 83-94.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzeimittel-Forschung,* **46**: 1086-1089.

Bai J., Cederbaum A. I., 2001. Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signal recept.,* **10**: 189-199.

Balasundram N., Sundram K., Samman S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food chemistry,* **9**: 191-203.

Bartosz G., 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comm Toxicol.,* **9**: 5-21.

Baydar N-G., Ozkan G., Yasar S. 2007 Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control,* **18**: 1131-1136.

Beloued A., 2003. Plantes médicinales d'Algérie. Département de botanique INA. OPU (Ed). Algérie, 227p.

Berger M. M., 2006. Manipulation nutritionnelles du stress oxydant: état de connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme,* **20** : 48-53.

Bergogne E., Dellamonica P., 1995. Antibiothérapie en pratique Clinique. Masson (Ed). Paris. 486p.

Bernhardt R., 1996. Cytochrome P₄₅₀: Structure, function and generation of reactive oxygen species. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.,* **127**: 137-221.

Bignami C., Poalocci A., Scossa A., Bertazza G., 2000. Preliminary evaluation of nutritional and medicinal component of *Crataegus azarolus* fruits. *Journal of food Enginerring,* **5**: 241-247.

Birt D. F., Hendrich S., Wang W., 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and iso flavonoids. *Pharmacology & therapeutics.* **90**: 157-177.

Boizot N., Charpontier J. P., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénolique des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra.* pp : 79-82.

- Boudraa S., 2008.** Etude de la fraction minérale et vitaminique des fruits de : *Celtis australis* L., *Crataegus zarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq. , *Elaeagnus angustifolia* L et *Ziziphus lotus* L. Mémoire de Magister. Université El Hadj-Lakhder. Batna, 137p.
- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B., 2003.** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition*. **4**(6), 7p.
- Brest Dùmù. S., 2003.** Nitric oxide signalling specificity – the heart of the problem. *J Cell Sci.*, **116**: 9-15.
- Bretraudeau J., Faure Y., 1992.** Atlas d'arboriculture fruitière. Tec & Doc (Ed). Paris, 289p.
- Broadhurst R. B., Jones W. T., 1978.** Analyses of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of food and Agriculture*, **29**: 788-794.
- Brosse J., 2000.** Larousse des arbres et des arbustes. Larousse (Ed). Canada, 576p.
- Brothers L, 1917.** *Crataegus*. NO. XI. Cincinnati (Ed). Ohio, pp 2-7.
- Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales, (3^e éd). Tec & Doc (Ed). Paris, 1120 p.
- Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales, (2^e éd). Tec & Doc (Ed). Paris, 520 p.
- Cantell K., Schellekens H., 1986.** Biology of the interferon. Kluwer academic Publ., Norwell (Mass.)
- Carbon C., Regnier B., Saimot G., 1994.** Médicaments anti-infectieux. Flammarion (Ed) Paris. 501p.
- Cash T., Pan Y., Simon M.C., 2007.** Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free radical biology medicine*, **43**: 1219-1225.
- Cetkovic G., Canadanovic-Brunet J., Djilas S., Savatovic S., Mandic A., Tumbas V., 2008.** Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, **109**: 340-347.
- Chang P., Xub S., 2003.** -C-glucoside flavonoids from the leaves of *Crataegus pinnatifida* bge. var. major n.e.br. *Journal of Asian Natural Products Research*, **5**(2): 131-136.
- Chang Q., Zuo Z., Chow M.S.S. and Ho W. K. K., 2006.** Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. *major*) fruits and a hawthorn drink. *Food chemistry*, **98**: 426-430.

Chang Q., Zuo Z., Harrison F. and Chow M.S.S., 2002. HAWTHORN. *Journal of clinical pharmacology*, **42**: 605-612.

Chavan U-D., Shahidi F., Naczk M., 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, **75**: 509-512.

Chen Q., Vazquez E. J., Moghaddas S., Hoppel, C. L., 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria. Central role of complex III. *J Biol Chem.*, **278**: 36027-36031.

Chevallier A., 1996. Encyclopedia of Medicinal Plants. Dorling Kindersley Pty Limited, St Leonards, NSW.

Chung K-T. and Wei C-I., 2001. Are tannins a double edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology*, **9**: 168-175.

Ciulei I., 1982. Methodology for analysis of vegetable drugs. Design and make up (Ed). Romania, 67p.

Conner E. M., Grisham M. B., 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, **12**: 274-277.

Corbin D., Bourad P., Charon Y., Michaut L., Ruetschamannvades S., Veron G., 1992. Le guide: Traite pratique du jardinage. Clause jardin (Ed). Paris, 854p.

Couplan F., 2000. Dictionnaire Etymologique de Botanique. Delachaux et Nestlé(Ed). Paris, 283p.

Croxton P. J., Sparks T.H., 2002. Afarm-scale evaluation of the influence of bedgerow cutting freconcy on hawthorn (*Crataegus monogyna*) berry yields. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **93**: 437-439.

Cuendet M., Hotettman K., Potterat O., 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica chimica Acta*, **80**: 1144-1151.

Dacosta Y., 2003. Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris. 317 p.

Davies J. R., 2000. Hawthorn. *Element Books Limited*, Boston, MA.

De Bruyne T., Pieters., Deelstra H., Vlietink A., 1999. Condensed vegetable tannins: Biodiversity and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, **27**: 445-459.

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

Densiov E. T., Afanas'ev I. B., 2005. IN: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group. (USA), Pp: 703-861.

- Diallo A., 2005.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *syzygium guineens* WILLD (*MYRTACEAE*). Thèse Doctoral en pharmacie. Université de Bamako, Mali. 80p.
- Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassane L.M., Badoc A., Gmira N., 2003.** Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymilaea lythroides*. *Bull. Soc. Pharm. Baurdeaux*, **142**: 61-68.
- Drissa D., Rokia S., Hansétou Y., Aminata T., Kassoum C., Ababacar M., 2004.** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritania* Lam (*Rhamnaceae*), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R chimie*, **7** : 1073-1080.
- Dröge, W., 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*, **82**: 47-95.
- Dubois G.A., Grosby G.F., Safron p., 1977.** Non nutritive sweeteners: Taste structure relation ships with for some new simple dihydrochalcones. *Science*, **195**: 397-399.
- Dzhangaliev A. O., Salova T. N. AND Turekhannova P. M., 2002.** The wild fruit and nut plants of Kazakhstan. Horticultural Reviews, *Jules Janick Kazakhstan*, **29**, 306p.
- Ercisili S., 2004.** Short review of the fruits germplasm resources of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **51**: 419-435.
- Espiard E., 2002.** Introduction à la transformation industrielle des fruits. Tec &Doc (Ed). Paris, 360p.
- Favier A., 2003.** Le stress oxydant .Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Ferhat R., 2008.** Etude de la fraction lipidique et la composition en acides gras des fruits de : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Cratagus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L et *Ziziphus lotus* L. Mémoire de Magister. Université El Hadj-Lakhder. Batna, 102p.
- Fernandez M., 2003.** De quelques plantes dites médicinales et de leur fonction. Aenigma (Ed). Paris, 63p.
- Ferreria A., Proenca C., Serralheiro M. L. M., Araujo M. E. M., 2006.** The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxydant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*, **108**: 31-37.
- Fong Harry H.S. and Bouman J.L., 2002.** Hawthorn. *Journal of cardiovascular nursing*, **16**(4): 1-8.
- Formica J-V and Regelson W., 1995.** Review of the Biology of quercétin and related Bioflavonoids. *Fd Chem.Toxic*, **33**: 1061-1080

- Foster S. and Duke J.A; 1990.** A Field Guide to Medicinal Plants Eastern and Central N. Houghton Mifflin (Ed). America, 366p.
- Fournier P., 1952.** Arbres, arbustes et fleurs de pleine terre. Tome II. Dicotyl2dones. Paule le chevalier (Ed). Paris, 549p.
- Frankel E. N., Huang S. W., Kanner J., Garmen J.B., 1994.** Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs. emulsion. *Journal of Agricultural and food chemistry*, **42**: 1054-1059.
- Frankel E.N., Meyer A.S., 2000.** The problems of using one- dimensional methods to evaluation multi functional food and biological antioxydant. *Journal of 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.
- Frobisher M., Fuerst R., 1976.** Microbiologie clinique. HRW(Ed). Paris, 507p.
- Galeotti F., Barile E., Curir P., Dolci M., Lanzotti V., 2008.** Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Photochemistry Letters*, **1**: 44-48.
- Galle T., 2005.** Gal encyclopedia of alternative medicine. Second edition. 64 volumes, 229p.
- Gamlin L., 1993.** Les arbres, guide de terrain. Grund (Ed). Espagne, 137p.
- Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot J.M., 2005.** Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry*, **53**: 1370-1373.
- Ghedira K., 2006.** La nigelle cultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, **4**: 1-7.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A-M., 2001.** Le préparateur en pharmacie. Dossier 2. (Ed) Tec & Doc, Paris. 275p.
- Girard P-M., Katlama C., Pialoux G., Saimot A-G., 1994.** S.I.D.A. Doin(Ed). Paris.
- Gloaguen J.C., 1982.** Connaitre et reconnaitre les arbres est les arbustes des forêts et compagnes. Ouest Frans (Ed). Paris, 222p.
- Goudable J., Favier A., 1997.** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **11**: 115-120.
- Grieve A., 2003.** A Modern Herbl. Vol 1. Jonathan (Ed). Great, Britain, 566p.
- Grisham M. B., Granger D. N., 1988.** Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci.*, **33**: 6S-15S.

- Grisham M. B., McCord J. M., 1986.** Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In "Physiology and oxygen radical" AE Taylor, S Matalon, Ed PA Ward. Bethesda. American Physiology Society. 1-18.
- Gruenewold J., 1998.** PDR for herbal Medicines. st 1. Montvale (Ed), MJ. Medical Economics Company. Inc.
- Hadi M., 2004.** La quercitine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; étude et application thérapeutiques. Thèse Doctoral Pharmaco chimie. Université Louis Pasteur, Paris. 155p.
- Hadjimitsi E., Zabitakis I., 2005.** The Aroma of jam prepared from fruits of masphilla (*Crataegus azarolus* L.). *Favour and Fragrance journal*, **20**(5): 507-511.
- Halliwell B., Whiteman M., 2004.** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology*, **142**: 231-255.
- Heim E. k., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**: 572-584.
- Heimler D., Vignolini P., Dini M. G., Vincieri F. F., Romani A., 2006.** Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food chemistry*, 99: 464-469.
- Hennebelle T., 2006.** Investigation chimique, chimio taxonomique et pharmacologique de Lamiales pnoductrices d'antioxydants. Thèse Doctoral. Université des sciences et Technologie. Lille, 115p.
- Herrera C.M., 1984.** Seed dispersal and fitness determinants in wild rose: combined effects of hawthorn, birds, mice and browsing ungulates. Spain, **63**: 386-393.
- Huxley A., 1974.** The New RHS Dictionary of Gardening. Mac Millan (Ed). London, 400p.
- Iserin P., 2001.** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. VUEF (Ed). Paris, 335p.
- Jacamon M., 1992.** Guide de dendrology. ENGEEF (Ed). Nancy, 174p.
- Javanovic S. V., Steenken S., Tosic M., Marganovic B., Simic M. J., 1994.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. **116**: 4846-4851.
- Jung T., Bader N., Grune T., 2007.** Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archive of biochemistry and biophysics*, **462**: 231-237.
- Kandra L., Guémant G., Zajacz A., Batta G., 2004.** Inhibitory effects of tannin on human salivary -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **319**: 1265-1271.

Kang D-G., Yun C-K., Lee H-S. 2003. Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, **87**: 231-236.

Kao E-S., Wang C-J., Lin W-L., Chu C-Y., Tseng T-H., 2007. Effects of polyphenols derived from fruit of *Crataegus pinnatifida* on cell transformation, dermal edema and skin tumor formation by phorbol ester application. *Food and Chemical Toxicology*, **03**. 016.

Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A., 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula Orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food chemistry*, **100**: 584-589.

Ken F., 2000. Notes from observation, tasting etc at plants For a Futer and fiel trips.

Khanbaba K. and Ree T.R., 2001. Tannins:Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*, **18**: 641-649.

King A and Young G., 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, **99**: 213-218.

Kjaer C., Strandberg M. and Erlandsen M., 2006. Metsulfuron spray drift reduces fruit yield of hawthorn. *Science of the Total Environment*, **356**: 228-234.

Koehlin-Ramonatxo C., 2006. Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20**: 165-177.

Kohen R., Nyska A., 2002. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicolo Pathol.*, **30**: 620-650.

Koyuncu T., Pina Y., Lute F., 2007. Convective drying characteristics of azarole red (*Crataegus monogyna* Jacq.) and yellow (*crataegus aronia* Bosc) fruits. *Journal of Food Engenering*, **78**(4): 1471-1475.

Krisch J., Galgoczy L., Tolgyesi M., Papp T., Vagrolgyi C., 2008. Effect of fruits juices and pomace extracts on the growth of Gram –positive and Gram- negative bacteria *Acta Biologica Szegediensis*, **52**(2): 267-270.

Kroll M., Ring C., Gaus W. and Hempel B., 2005. A randomized trial of Kordin® Herz-Kreislauf-Tropfen as add-on treatment in older patients with orthostatic hypotontion. *Phytomedicine*, **12**: 395-402.

Kunkel G., 1984. Plants of Human Consumption. Lubrecht &Cramer (Ed). London, 393p.

Kuntie V., Pejje N., Ivkovie B., Vugie Z., Ilie K., Micie S., Vukojevie V. 2007. Isocratic R-P-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **43**: 718-721.

Lacoste S., 2006. Les plantes qui Guirissent. LEDUC.s (Ed). Paris, 399p.

Landolf R., Mower R. L., Steiner M., 1984. Modification of plateletfunction and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids structure activity relation. *Biochem Pharmacol.*, **269**: 2971-2979.

Larousse agricole, 1992. Mathile Majorel (Ed). Paris, 767p.

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. Wang .C., Fan K.W., Chen F., Jiang Y., 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food chemistry*, **102**: 771-776.

Lijuan Z., Jianguo L., Yongkang P., Guohua Ch and Mujumdar A., 2005. Thermal Dehydration Methods for Fruits and Vegetables. *Drying Technology*, **23** (9): 2249-2260.

Lindon G., Lorient D., 1994. Biochimie agro-industrielle (Valorisation alimentaire et la production agricole). Masson (Ed). Paris, 360p.

Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F., 2006. Antioxidant proprieties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivium* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**: 477-485.

Ljubuncic P., Portnaya I., Cogan U., Azaizeh H., Bomzon A., 2005. Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**: 153-161.

Lopes G-C ., Sanches A-C-C., Nakamura C-V., Dias Filho B-P., Hernandez L., Carlos P and Mello J., 2005. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. On the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**: 265-272.

Lugasi A., Hovari J., Sagi K. V. and Biro L., 2003. The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*. **47**(1-4): 119-125.

Lust J., 1983. The Herb Book. Gras Pub (Ed). London, 349p.

Mahmood N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A., Hay A. J., 1993. Inhibition of HIV infection by flavonoids. *Antivir. Res.*, **46**(7): 1257-1271.

Mansouri A., Embarek G., Kakkalou E., Kefales P., 2005. Phenolic profile and antioxydant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*phoenix davtylifera*). *Food chemistry*, **89**: 411-420.

Marfak A., 2003. Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 187 p.

Markham K. R., 1982. Techniques of flavonoids identification. *Academic Press*, London. 133p.

Martínez-Cayuela, M., 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.*, **77**: 147-161.

Mazzocchi J., Dalioche G., Frenot U., 1999. Glaner dans le midi. Tetrass (Ed). Paris, 169p.

McGuffin M., Hobbs C., Upton R. and Goldberg A. 1997. Botanical Safety Handbook. New York: CRC Press. 37.

Messaili B., 1995. Botanique, Systématique des spermaphytes. OPU (Ed). Alger, 91p.

Middleton E., Kandaswami C., Thioharidies T. C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews.* **52**: 673-751.

Mila I., Scalbert A., 1994. Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: a new hypothesis. *International Symposium on Natural phenols in Plant Resistance*, **381**(2): 749-755.

Milouane p., 2000. Le Truffaut "Encyclopédie pratique illustré du jardin". Bordas (Ed). Paris, 800p.

Morel Y and Barouki R., 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.*, **342**(3), 481-496.

Mouhammedi Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de magister. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, 103p.

Mucsi I., Pragai B. M., 1985. Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Expriencia*, **41**(7): 930-1.

Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., Krishina D. R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, **33**: 2-16.

Nauciel C., 2000. Bactériologie medicale. Masson (Ed). Paris, 275.

Ody P., 1995. Les plantes médicinales "Encyclopédie Pratique". Sélection du Reader's Digest (Ed). Paris, 192p.

Okuda T., 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, **66**: 2012-2031.

Olegpal U., Huxley A., 1974. Flowers of mediterranean. Chohoand Widneur (Ed). Paris, 122p.

Ozcan M., Haciseferogullari H., Maracoglu T., Arslan D., 2005. Hawthorn (*crataegus spp.*) fruit: some phesical and chemical properties. *Journal of food Enginnering*, **68**: 409-413.

Parakash D., Upadhyay G., Brahma N., Singh H-B. 2007. Singh antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wostes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry*, **104**: 783-790.

Paullarpent J., 1997. Microbiologie Alimentaire. Lavoisier Tec & Doc (Ed). Paris, 1041p.

Pelloti A., 1987. Fleurs et plantes médicinales. Delachaux et Nestle (Eds). Paris, 191.

Pequignot H., 1975. Pathologies médicale. Masson (Ed). Paris. 1658.

Peronny S., 2005. La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. Discipline Eco-Ethologie. 151p.

Perret C., 2001. Analyses de tannins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par *Btrytis cinerea* Pers.:FR. Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel. 173p.

Pessini G. L., Dias Filho B. P., Nakamura C. V., Garcia Cortez D. A., 2003. Antibacterial activity of extracts and nrolignans from *pieper regnelli* (Miq.) C. DC.Var. *pallescens* (C.DC.)Yunk. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**: 1115-1120.

Picman A. K., Schneder E. F., Picman J., 1995. Effect of flavonoids on mycelial growth of verticilium. *Albo Atrum Biochem Sys and Eco.* **23**: 683-693.

Pietta P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products.*, **63**: 1035-1042.

Pinta M., 1961. Recherche et dosage des éléments traces. DUNOD (Ed). Paris, pp37-43.

Pokorny J., 1975. Les arbres les arbustes et buissons, Marabou (Ed). Paris 182p.

Prescott L., Harley J., Klein D., 2003. Microbiologie. De boeck (Ed). Bruxelles. 1135p.

Quezel P. et Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. Tome1. Centre National de la Recherche scientifique (Ed). Paris, 566p.

Rajagopalan K. V., 1980. Xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *In*: "Enzymatic basis of detoxification". Jacoby W (Ed) Press. New York.

Rajendran S., Deepalakshmi P. D., Parasakthy K., Devaraj H. and Niranjali Devaraj S., 1996. Effect of tincture of *Crataegus* on the LDL-receptor activity of hepatic plasma membrane of rats fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis*, **123**(1-2): 235-241.

Randerath K., 1971. Chromatographie sur couches minces. Gauthier-Villers (Ed). Paris, 370p.

Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regeat F., 1996. Intérêt nutritionnelle des flavonoïdes. *Méd & Nut.* **32**(1): 17-27.

Ribéreau-Gayon P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod (Ed). Paris. 254 Pp.

Rita Bilia A., Eterno F., Bergorizi M. C., Mazzi G., Vencieri F. F., 2007. Evaluation of the content and stability of the constituents of mother tinctures and tinctures: the case of *Crataegus oxyacantha* L. and *Hieracium pilosella* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedicinal analysis*, **44**: 70-78.

Rodrigues M. R., Rodriguez D., Russo M., Campa A., 2002. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **292**: 869-873.

Rose J. and Treadway S., 1999. Herbal Support for a Healthy Cardiovascular System. *Adv. Nutrition Pub*, **16**(6): 16-19.

Rouessac F., Rouessac A., 2006. Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes. DUNOD(Ed). Paris, 462p.

Saadoudi M., 2008. Etude de la fraction glucidique des fruits de : *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Cratagus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L et *Ziziphus lotus* L. Mémoire de Magister. Université El Hadj-Lakhder, Batna, 80p.

Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F., 1995. Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes. *Free radical biology & medicine*, **19**: 481-486.

Sanchez-Moreno C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*, **8**: 121-137.

Schofield P., Mbugua D-M., Pell A N., 2001. Analyses of condensed tannins: a review. *Animal Food and Technology*, **91**: 21-40.

Serhane K., 2005. Journée d'Etude et d'Information sur l'Azerolier. Institut de Technologie Moyen Agricole Spécialisé de Sétif. Algérie.

Sevanian A., Nordenbrand K., Kim E., Ernester L., Hochstein P., 1990. Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P₄₅₀ reductase and cytochrome P₄₅₀. *Free Radic Biol Med.*, **8**: 145-152.

Seyoum A., Asres K., El-Fiky F. K., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of phytochemistry*. **67**: 2058-2070.

Siddhuraju P. 2007 Antioxydant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *LWT*, **40**: 982-990.

- Silverstein R., Basler G-C., Morill T. C., 1998.** Identification spectrométriques de composées organiques. De Boeck (Ed). Bruxelles, 411p.
- Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rizner Hars A., Smonic M., Knez Z., 2005.** Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, **89**: 191-198.
- Sohal R. S., Mockett R. J. and Orr W. C., 2002.** Mechanisms of aging: an appraisal of oxidative stress hypothesis. *Free radical biology & medicine*, **33**: 575-586.
- Sokol-Letowska A., Oszmianski J., Wojdylo A., 2007.** Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chemistry*, **103**: 853-859.
- Sorge O., 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality, *Comptes Rendus Biologies*, **327**: 649-662.
- Sparks T.H. and Martin T., 1999.** Yields of Hawthorn *Crataegus monogyna* berries under different hedgerow management. *Agriculture Ecosystems and Environment*, **72**: 107-110.
- Spedding G., Ratty A., Middleton E.J., 1989.** Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. *Antivir. Res.*, **12(2)**: 99-110.
- Spignoli G., Mercati V., Boncampagni E., 1999.** Guida Bibliografica più notion fitoterapici. ABOCA (Ed). Italie, 317p.
- Sun J., Khtan B., Huang S-H., Whiteman M. and Zhu Y-Z., 2002.** Effect of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta pharmaco*, **23(12)**: 1142-1151.
- Svedström U., Vuorela H., Kostianen R., Laakso I., Hiltunen R., 2006.** Fractionation of polyphénols in hawthorn into polymeric procyanidines, phenolic acids and flavonoids prior to high performance liquid chromatographic analysis. *Journal of chromatography "A"*, **11(12)**: 103-111.
- Svedström U., Vuorela H., Kostianen R., Tuominen J., Kokkonene J., Rauha J-P, Laakso I., Hiltunen R., 2002a.** Isolation and identification of oligomeric procyanidines from *Crataegus* leaves and flowers. *Photochemistry*, **60(8)**: 821-825.
- Svedström U., Vuorela H., Kostianen R., Huovinen K., Laakso I., Hiltunen R., 2002b.** High performance liquid chromatographic determination of oligomeric procyanidines from dimers up to the hexamer in hawthorn. *Journal of chromatography "A"*, **968**: 53-60.
- Takao T., Kitatani F., Watanabe N., Yagi A., Sakata K., 1994.** A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **58**: 1780-1783.
- Tapiero H., Tew K.D., Nguyen B. G., Mathé G., 2002.** Poly phenol: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother*, **56**: 200-207.

- Theiss 2002.** Aubépine Tonicardiaque. Hubner. 1-4p.
- Treutter D., Feucht W., 1990.** The pattern of flavan-3-ols in resistance of apple cultivars. *Journal of Horticultural science*, **65**: 511-517.
- Uphof J.C.Th., 1959.** Dictionary of Economic Plants. *Taxon*, **17**(4) : 433-443 pp.
- Urbonavieitė V.J., Jakstas O., Karnisova O., Janulis V. and Maruska A., 2006.** Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* jacq.) ethanolic extracts. *Journal of chromatography "A"*, **11**(12): 339-344.
- ValKo M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J., 2007.** Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*, **39**: 44-84.
- ValKo M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006.** Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, **160**: 1-40.
- Valls J., Richard T., Trotin F., Monti J.-P., Mé rillon j.-M., Vitrac X., 2007.** Analytical, Nutritional and clinical Methods Carbon -14 biolabeling of flavonols and chlorogenic acids in *Crataegus monogyna* cell suspension cultures. *Food chemistry*, **105**: 879-882.
- Vansant G., 2004.** Radicaux libres et antioxydant : principe de base symposium. < Antioxydant et alimentation >. Institut Danone.
- Veireling W., Brand N., Gaedeke F., Sensch K.H., SCHENEIDER E. and Scholz M., 2003.** Investigation of the pharmaceutical and pharmacological equivalence of different hawthorn extracts. *Phytomedicine*, **10**: 8-16.
- Vernin G., 1970.** La chromatographie en couche mince technique et application en chimie organique. DUNOD (Ed). Paris, 156p.
- Veveris M., Koch E. and Chatterjee S.S., 2004.** *Crataegus* special extract WS®1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion. *Life Sciences*, **74**: 1945-1955.
- Vivar-Vera M.A., Salazar-Montoya J.A., Calva-Calva G. and Ramos-Ramirez E.G., 2007.** Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *LWT*, **40**(2): 278-284.
- Vivas N., Nonier M-F., Pianet I., Vivas de Gaulejac N., Fouquet E., 2006.** Proanthocyanidins from *Quercus petraea* and *Q. robur* heartwood: quantification and structures. *Comptes rendus chimie*, **9**: 120-126.
- Wang J. and Mazza G., 2002.** Effects of Anthocyanidins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 4183-4189.

Wichtel M. et Anton R., 1999. Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Tec&Doc (Ed). E M urter.

Yang L-L., Lee C-Y., Yen K-Y., 2000. Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukaemia cells. *Cancer Letters*, **157**: 65-75.

Yi Z., Yan Y., Liang Y., Zeng B. 2008. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoids. *LWT*, **41**: 597-603.

Yves-Marie A., 1988. Les pratiques du jardinage, Les Arbustes. Larousse (Ed). Paris, 128p.

Zapatero J. M., 1999. Selections from current literature effects of Hawthorn on the cardiovascular system. *Family Practice*, **16**(5): 534-538.

Zbynek G., Boris K., Vojtech A., Jan S., Tunde P., Vojtech R., Ales H and Rene K., 2008a. Electrochemical determination of the antioxidant potential of some less common fruit species. *OPEN ACCESS Sensor*, **8**: 7564-7570.

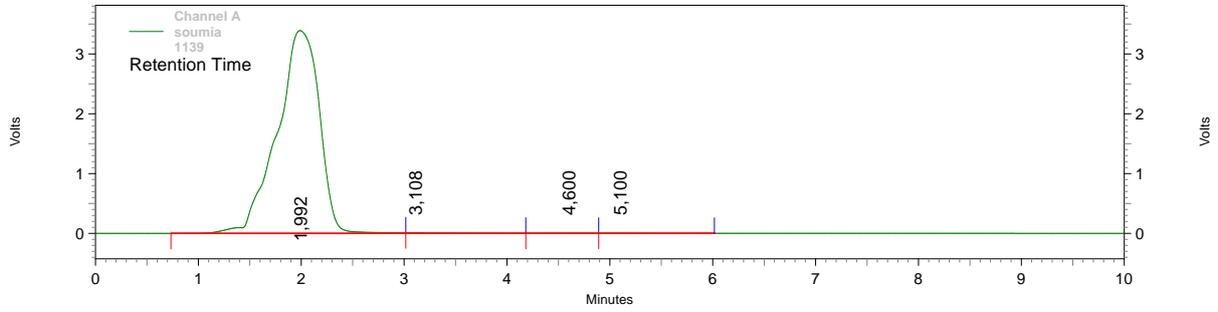
Zbynek G., Vojtech R., Vojtech A., Ondrej Z., Tunde J., Boris K., Jan M., Jan P., Jan S., Ales H. and Rene K., 2008b. Use of liquid chromatography with Electrochemical detection for the Determination of less Common Fruits. *OPEN ACCESS Moleculs*, **13**: 2823-2836.

Zhang Z., Ho W.K.K., Huang Y. and Chen Z.Y., 2002. Hypocholesterolemic activity of hawthorn fruit is mediated by regulation of cholesterol-7 -hydroxylase and acyl COA: cholesterol acyltransferase. *Food Research International*, **35**: 885-891.

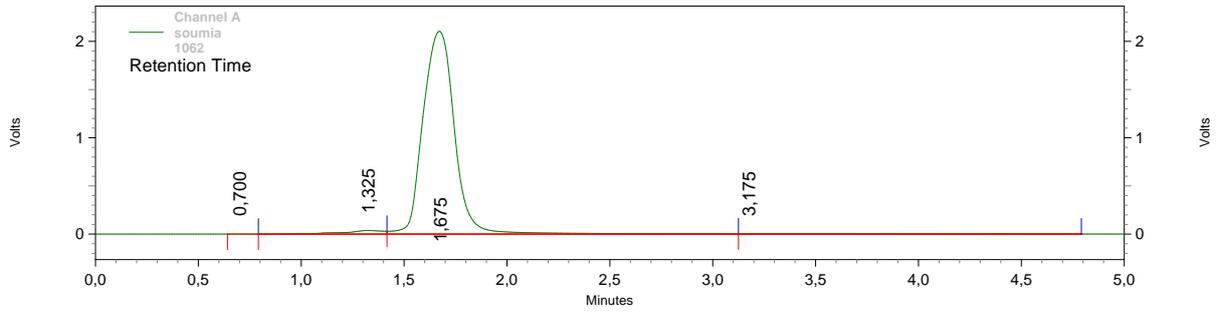
Zimmer N et Cordesse R. 1996. Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. (Ed) INRA Prod Anim, **9**: 167-179.

Annexes

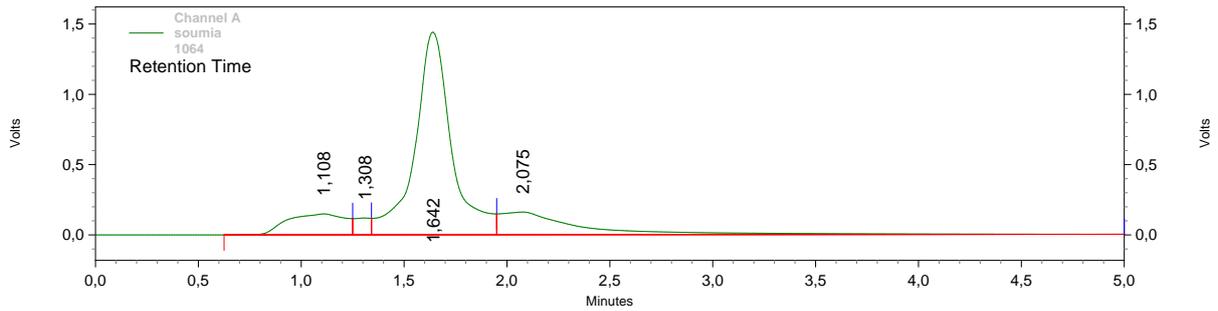
Annexe1. Chromatogrammes des différents standards testés par l'HPLC



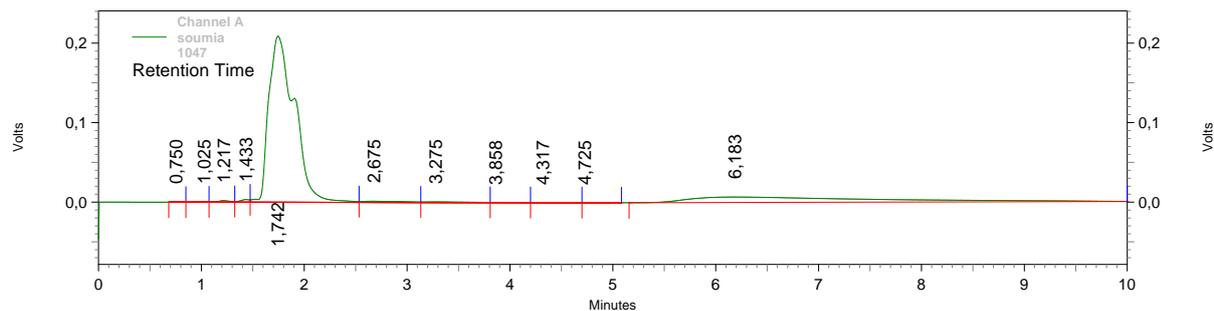
Acide Caféique



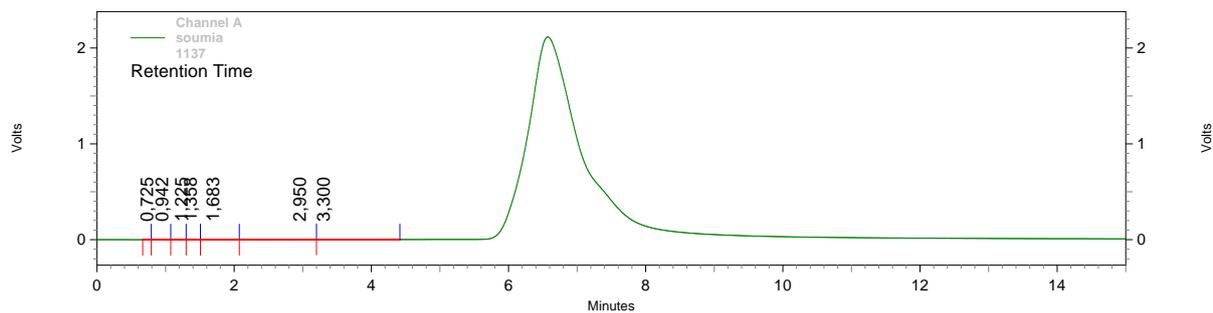
Acide Gallique



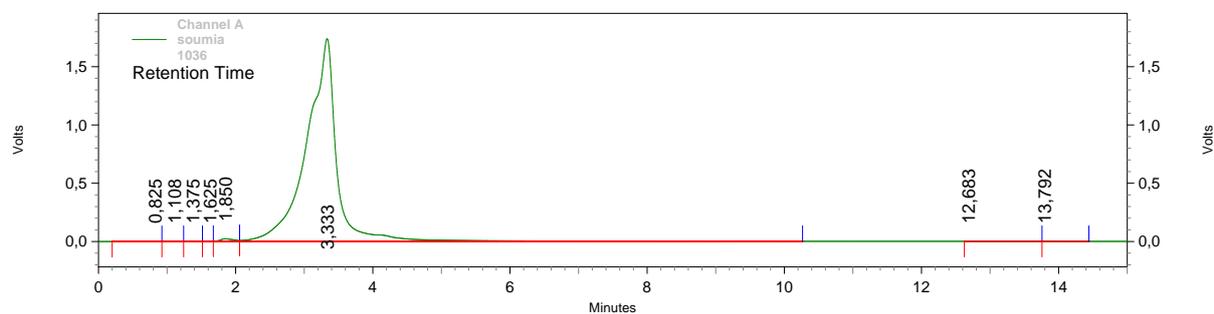
Acide Tannique



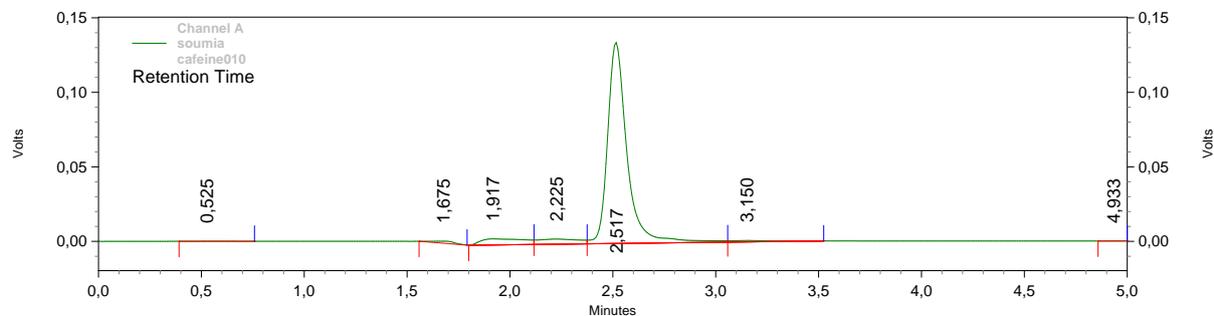
Catechine



Quercétine



Rutine



Caféine

Annexe 2. Les valeurs des Chromatogrammes des quatre extraits testés par l'HPLC

Table des Valeurs de Chromatogramme obtenus de l'extrait éthérique du *Crataegus azarolus* L. (Figure 23)

Detector A - 1 (254nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	0,583	12783	3,480	2072	6,640
2	0,742	29441	8,014	7338	23,516
3	1,000	15129	4,118	1447	4,637
4	1,242	7732	2,105	1267	4,060
5	1,400	14172	3,858	2025	6,490
6	1,708	117253	31,918	7088	22,715
7	2,050	26919	7,328	1815	5,817
8	2,383	14989	4,080	1107	3,548
9	2,717	30245	8,233	1693	5,426
10	3,108	15557	4,235	971	3,112
11	3,358	12111	3,297	1022	3,275
12	3,517	16623	4,525	1081	3,464
13	3,900	14870	4,048	831	2,663
14	4,433	1351	0,368	103	0,330
15	5,208	7748	2,109	301	0,965
16	6,050	1648	0,449	128	0,410
17	7,533	15673	4,266	310	0,993
18	7,667	5127	1,396	265	0,849
19	8,675	248	0,068	27	0,087
20	10,183	1852	0,504	78	0,250
21	11,842	5888	1,603	235	0,753
Totals		367359	100,000	31204	100,000

Table des Valeurs de Chromatogramme obtenus de l'extrait dichlorométhane du
Crataegus azarolus L. (Figure 24)

Detector A - 1 (254nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	0,792	8036	0,887	2033	4,017
2	1,075	51854	5,725	3752	7,414
3	1,358	60648	6,696	5976	11,808
4	1,575	49810	5,500	5947	11,751
5	1,833	241556	26,671	16212	32,033
6	2,192	205412	22,680	6796	13,428
7	2,900	77193	8,523	3760	7,429
8	3,425	202194	22,325	5620	11,105
9	4,850	4203	0,464	264	0,522
10	5,675	682	0,075	67	0,132
11	6,050	3563	0,393	148	0,292
12	10,992	503	0,056	27	0,053
13	14,892	40	0,004	8	0,016
Totals		905694	100,000	50610	100,000

Table des Valeurs de Chromatogramme obtenus de l'extrait méthanolique du
Crataegus azarolus L. (Figure 25)

Detector A - 1 (254nm)

Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	0,858	12884	0,282	1641	0,762
2	1,283	964577	21,117	33983	15,771
3	1,975	1912836	41,876	127545	59,190
4	2,283	879636	19,257	29395	13,641
5	3,342	304288	6,661	10985	5,098
6	3,808	418481	9,161	8732	4,052
7	5,300	26021	0,570	1017	0,472
8	5,817	5226	0,114	578	0,268
9	5,958	10913	0,239	505	0,234
10	6,800	1350	0,030	43	0,020
11	8,292	10457	0,229	302	0,140
12	8,592	6724	0,147	311	0,144
13	8,758	12401	0,271	299	0,139
14	9,792	1739	0,038	98	0,045
15	14,175	196	0,004	24	0,011
16	14,775	139	0,003	26	0,012
Totals		4567868	100,000	215484	100,000

Table des Valeurs de Chromatogramme obtenus de l'extrait aqueux du
Crataegus azarolus L. (Figure 26)

Detector A - 1 (254nm)					
Pk #	Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
1	0,842	2248	0,191	543	0,979
2	1,208	283052	24,038	10845	19,548
3	1,917	718851	61,047	38844	70,017
4	3,142	40824	3,467	1834	3,306
5	3,808	116179	9,866	2686	4,842
6	5,158	3392	0,288	237	0,427
7	5,767	11544	0,980	360	0,649
8	13,008	568	0,048	63	0,114
9	13,133	870	0,074	66	0,119
Totals		1177528	100,000	55478	100,000

Annexe 3. Zones d'inhibitions obtenues par différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L.



Zones d'inhibition de l'E. Aqe sur *E. coli*



Zones d'inhibition de l'E. Aqe sur *S. aureus*



Zones d'inhibition de l'E. Met sur *P. aerug.*



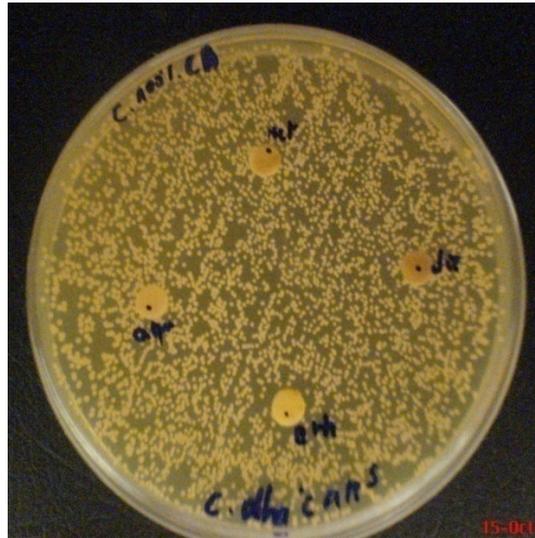
Zones d'inhibition de l'E. Met sur *S. aureus*



Zones d'inhibition de l'E. Dic sur *S. aureus*



Zones d'inhibition de l'E. Eth sur *S. aureus*



Test des quatre extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. sur *Candida albicans*

Résumé

L'étude de l'activité biologique des différents extraits du fruit de *Crataegus azarolus* L. nous a permis d'obtenir des résultats intéressants. L'analyse préliminaire a détecté la présence des flavonoïdes et des tanins dans la majorité des extraits ainsi que des traces d'alcaloïdes dans les extraits polaires.

Les chromatographies CCM et HPLC ont révélé la présence de quelques composés phénoliques (rutine, catéchine, acide caféique). En dosant les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tanins, l'extrait Dic se montre le plus riche en ces molécules, suivi par l'E.Met avec des teneurs en composés phénoliques de 50,115 et 18,649($\mu\text{g E AG}/\text{mg}_{\text{ext}}$) successivement.

Le test antimicrobien montre que les différents extraits ont une activité généralement modeste en vers toutes les souches microbiennes testées. Les résultats de l'activité antioxydante testée par le blanchissement du β -carotène ont révélé que l'E.Eth possède la plus grande activité avec une AAR de 82.45% suivi par l'E.Dic. Ce dernier apparait le plus actif en utilisant le test antiradicalaire au DPPH avec une IC_{50} de 137.33 (mg/ml) suivi par l'E.Met. Donc on peut dire que le fruit de *Crataegus azarolus* L. est caractérisé par une activité antioxydante vu sa contenance en composés phénoliques, surtout ceux extraits par le dichlorométhane.

Mots clés: *Crataegus azarolus* L., composés phénoliques, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

:

دراسة النشاط البيولوجي لمختلف مستخلصات ثمرة الزعرور البري *Crataegus azarolus* L. سمحت التوصل إلى نتائج جد مهمة حيث كشفت التحاليل الأولية عن وجود مركبات الفلافونويدات والديباغ (التنينات) في اغلب المستخلصات و آثار الكالويدات في المستخلصات القطبية.

وسائل الكروماتوغرافية (كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة "CCM" كروماتوغرافيا السائل ذات الفعالية المرتفعة "HPLC") تمكنا من كشف بعض المركبات الفينولية (الروتين، الكتشنين، حمض الكافيك). بالقياس الكمي لكل من المركبات الفينولية، الفلافونويدات و الديباغ بدأ أن مستخلص ثنائي كلور الميثان "E. Dic هو الأكثر غنا بهذه الجزيئات متبوعا بمستخلص الميثانول "E.Met" الفينولية مقدر 50.115 18.649 (مكروغ مكافئ حمض الغاليك/) على الترتيب.

اختبار المستخلصات كمضادات ميكروبية أبدت عموما فعالية متواضعة و بسيطة جدا ضد كل الميكروبية المختبرة. كاروتان أظهرت أن إيثير البترول "Eth" هو الأكثر قدرة بنشاط يقدر بـ 82.45% متبوعا بمستخلص ثنائي كلور الميثان "Dic"، غير أن هذا الأخير بدأ هو الأكثر نشاطا باختبار مضاد الجذور الحرة "DPPH" و قدر نشاطه بـ "IC₅₀" 137.33 (/) متبوعا بمستخلص الميثانول "E.Met".

بهذا يمكننا القول أن ثمرة الزعرور البري تتميز بنشاط مضاد للأكسدة نظرا لاحتوائها على المركبات الفينولية خاصة المستخلصة بثاني كلور الميثان.

:

الزعرور البري، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للأكسدة.

Abstract

The study of the biological activity of different extracts of the hawthorn fruits "*Crataegus azarolus* L." allowed us to obtain very interesting results. The preliminary analysis revealed the presence of flavonoids and tannins in almost all the extracts and traces of alkaloids in polar extracts.

The chromatographic TLC and HPLC revealed some phenolic compounds (rutin, catéchin and cafeic acid). When dosing these phenolic compounds the Dic extract is the richest in these molecules, followed by the Met extract with 50.115 and 18.649($\mu\text{g E AG}/\text{mg}_{\text{ext}}$) successively.

Antimicrobial test shows that the different extracts have a modest activity vis a vis all the microbes strains tested. The results of the antioxydante activity tested by the β -carotene revealed that the Eth extract has the greatest activity with an AAR of 82.45% followed by the Dic extract. The latter seems to be the most active using the antiradicalaire test of DPPH with IC_{50} 137.33 (mg/ml) followed by the Met extract. Therefore we can say that the *Crataegus azarolus* L. is characterized by the antioxydante activity, taking into consideration its content in phenolic compounds, mainly those extracted with the dichlorométhane.

Key words: *Crataegus azarolus* L., phenolic compounds, antimicrobial activity, antioxydante activity.