

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

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI. CONSTANTINE 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale



N° d'ordre :29/Ds/2018

N° de série : 04/Eco/2018

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Filière : Biotechnologie végétale

Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème

Evaluation des propriétés biopharmacologiques, standardisation chimique et valorisation des agroressources fonctionnelles cas de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica*

Soutenue publiquement

Par

ZEGHAD NADIA ep BOUOUDEN

Devant le jury :

Président :	Baka Mebarek	Prof	Université Des Frères Mentouri-Constantine1
Encadreur :	Belkhiri Abdelmalik	Prof	Université Salah Boubnider-Constantine 3
Co-Encadreur :	Demeyer Kristiaan	Prof	Vrije universiteit-Brussel- Belgique
Examineurs :	Akkal Salah	Prof	Université Des Frères Mentouri-Constantine1
	Yahia Abdelouaheb	Prof	Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf- Mila
	Djerrou Zouhir	MCA	Université 20 Août 1955-Skikda

Année universitaire 2017/2018

Remerciements

Le présent travail a été effectué au sein du laboratoire de pharmacologie et toxicologie-institut National des Sciences Vétérinaire, Université des Frères Mentouri-Constantine 1, sous l'encadrement du professeur Abdelmalik Belkhiri, et en collaboration avec le professeur Kristiaan Demeyer de l'Université de Vrije de Bruxelles.

*Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de thèse, Mr **Abdelmalik Belkhiri**, professeur à la faculté de médecine-Université Salah Boubnidar-Constantine 3 pour la confiance qu'il m'a accordé en acceptant d'encadrer ce travail de thèse de doctorat et pour ses précieux conseils qui m'ont guidé tout au long de cette thèse.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à mon co-encadreur de thèse, Mr **Kristiaan Demeyer**, professeur à l'université libre de Bruxelles (Vrije Universiteit Brussel) pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'encadrer une partie de mes travaux de thèse de doctorat. Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe du département de chimie analytique, chimiométrie appliquée et modélisation moléculaire de l'université de Bruxelles. Je tiens particulièrement à remercier les Professeurs **Yvan Vander Heyden** et **Debby Mangelings** pour m'avoir facilité l'accès aux plateaux techniques de leurs laboratoires respectifs.*

*Je tiens à exprimer aussi mes vifs remerciements à Mr **Mebarek Baka**, professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et chef du département de Biologie et Ecologie Végétale, Université des Frères Mentouri-Constantine 1, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse de doctorat.*

*Je souhaite aussi exprimer ma gratitude et mes remerciements aux membres de jury pour avoir accepté de juger et d'examiner les travaux de recherche de cette thèse, en l'occurrence Mr **Salah Akkal**, Professeur à l' Université des frères Mentouri-Constantine 1, Mr **Zouhir Djerrou** Maître de Conférence Classe A à l'Université 20 Août 1955-Skikda et Mr **Abdelouahab Yahia**, Professeur au Centre universitaire Boussouf Abdelhafid-Mila.*

Je tiens à remercier le professeur Hamdi Pacha, directeur de laboratoire de pharmacologie et toxicologie pour m'avoir accueilli et permis de réaliser les travaux d'évaluation des activités biologiques. J'adresse mes remerciements à toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce travail du pré ou de loin.

Table des matières

Introduction

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur les plantes étudiées

1/ Description botanique des plantes sélectionnées.....	3
1-1/ <i>Vitis vinifera L</i> (Vigne).....	3
1-2/ <i>Punica granatum L</i> (Grenadier).....	5
1-3/ <i>Citrus aurantium L</i> "Bigarade" "orange amère".....	6
1-4/ <i>Opuntia ficus-indica L</i> "Le figuier de Barbarie".....	8
2/ Propriétés pharmacologiques des fruits étudiés.....	9
2-1/ Effets protecteurs des fruits vis-à-vis des maladies cardiovasculaires.....	9
2-2/ Effets protecteurs des fruits vis-à-vis du cancer.....	10
2-3/ Effets protecteurs des fruits au niveau anti-inflammatoire.....	10
2-4/ Effets protecteurs des fruits au niveau hépato-protecteur.....	11

Chapitre II : Stress oxydant et antioxydants

1/ Généralités.....	12
2/ Effets du stress oxydant sur les structures moléculaires.....	12
2-1/ ADN (acide désoxyribonucléique).....	12
2-2/ Lipides.....	13
2-3/ Protéines.....	13
3/ Maladies liées au stress oxydatif.....	14
4/ Antioxydants.....	15
5/ Mécanismes d'antioxydation.....	15
5-1/ Système de défense endogènes (enzymatique).....	15
5-1-1/ Superoxydes dismutases (SOD).....	15

5-1-2/ Glutathions peroxydases (GPxs).....	16
5-1-3/ Catalases.....	16
5-2/ Système de défenses exogènes (non enzymatiques).....	17
5-2-1/ Glutathion et les protéines-thiols.....	17
5-2-2/ Vitamine E (α -tocophérol).....	18
5-2-3/ Vitamine C (acide L-ascorbique).....	18
5-2-4/ Vitamine A (Caroténoïdes).....	19
5-2-5/ Acide urique.....	20
5-2-6/ Composés phénoliques.....	20

Chapitre III : Les polyphénols, structures et principales classes

1/ Introduction.....	22
2/Composés phénoliques.....	22
3/Biosynthèse des composés phénoliques	23
3-1/Voie de Shikimate	23
3-2/Voie d'acétate malonate.....	27
3-3/ Voie mixte de biosynthèse des flavonoïdes.....	28
4/ Classification des composés phénoliques.....	30
4-1/Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3).....	30
4-2/Stilbènes (C6-C2-C6).....	31
4-3/Flavonoïdes (C6-C3-C6).....	31
4-4/Tanins	33
4-4-1/Tanins hydrolysables	33
4-4-2/ Tanins condensés (C6-C3-C6) _n	34
4-5/ Lignanes (C6-C3) ₂ et lignines (C6-C3) _n	35

Partie II : Matériel et méthodes

1/ Matériel végétal.....	37
--------------------------	----

2/ Méthode d'extraction.....	37
3/ Caractérisation chimique des extraits.....	38
3-1/ Criblage phytochimique.....	38
3-2/ Analyse qualitative des ELF's par CLHP.....	39
3-3/ Analyses des ELF's par HPLC-UV-VIS-DAD/ESI-MS.....	40
3-4/ Analyses quantitatives par spectrophotométrie (UV-Visible).....	42
3--4-1/ Dosage des phénols totaux (PT)	42
3-4-2/ Dosage des flavonoïdes totaux	43
3-4-3/ Dosage des flavonols totaux.....	44
3-4-4/ Dosage des tanins condensés.....	44
3-4-5/ Dosage des tanins hydrolysables.....	44
4/ Evaluation des activités biologiques.....	45
4-1/ Activité antioxydante au DPPH.....	45
4-2/ Activité antioxydante à l'ABTS.....	46
4-3/ Activité antioxydante au FRAP.....	47
4-4/ Activité antioxydante ORAC.....	48
4-5/ Activité antioxydante au TBARS.....	49
4-6/ Activité antioxydante à l'oxyde nitrique (NO•).....	51
4-7/ Activité cytotoxique sur les larves d' <i>Artemia salina</i>	52
4-8/ Etude de la toxicité aiguë chez la souris.....	54
4-9/ Activité analgésique des extraits.....	55
4-9-1/ Test de torsion.....	55
4-9-2/ Test de la plaque chauffante.....	57
4-9-3/ Test d'immersion de la queue.....	58
4-10/ Activité cicatrisante.....	59
4-10-1/ Test d'excision.....	59

4-10-2/ Test de brûlures.....	60
4-11/ Evaluation de l'activité hyperlipidémiant des extraits.....	60
Partie III : Résultats et discussion	
1/ Rendement des ELF's (teneur en matière extractible).....	62
2/Caractérisation chimique des ELF's.....	62
2-1/ Criblage phytochimique	62
2-2/ Examen du profil chromatographique des ELF's par CLHP/UV-VIS.....	63
2-3/ Analyse des ELF's par HPLC/UV-VIS-DAD-ESI-MS	68
2-3-1/ Identification des molécules présentes dans l'ELF de <i>Vitis vinifera</i>	68
2-3-2/ Identification des molécules présentes dans l'ELF de <i>Punica granatum</i>	72
2-3-3/ Identification des molécules présentes dans l'ELF de <i>Citrus aurantium</i>	75
2-3-4/ Identification des molécules présentes dans l'ELF de <i>Opuntia ficus-indica</i>	78
2-4/ Estimation des contenus en composés phénoliques dans les ELF's.....	82
3/ Evaluation des activités biologiques.....	84
3-1/ Activité antioxydante au DPPH	84
3-2/ Activité antioxydante à l'ABTS	87
3-3/ Activité antioxydante au FRAP.....	89
3-4/ Activité antioxydante ORAC	91
3-5/ Activité antioxydante au TBARS.....	93
3-6/ Activité antioxydante à l'oxyde nitrique (NO•).....	96
3-7/ Test de toxicité larvaire	98
3-8/ Evaluation de la toxicité aiguë chez les souris.....	99
3-9/ Activité analgésique	100
3-9-1/ Test de Torsion.....	100
3-9-2/ Tests de plaque chauffante et immersion de la queue.....	101
3-10/ Evaluation de l'effet cicatrisant des ELF's.....	103
3-11/ Evaluation de l'activité antihyperlipidémiant des ELF's.....	108
Conclusion générale	110
Références bibliographiques	114
Annexes	135
Résumé	
Abstract	

Liste des figures

Figure 1 : Différents organes de <i>Vitis vinifera</i> L.....	3
Figure 2 : Différents organes de <i>Punica granatum</i> L.....	5
Figure 3 : Différents organes de <i>Citrus aurantium</i> L.....	7
Figure 4 : Différents organes d' <i>Opuntia ficus-indica</i> L.....	8
Figure 5 : Réactions de détoxification du radical anion superoxide et du peroxyde d'hydrogène.....	17
Figure 6 : Structure chimique d' α -tocophérol.....	18
Figure 7 : Mécanisme de régénération potentiel entre α -tocophérol (α -TOH), l'ascrobate (AscO ⁻) et les flavonoïdes (Fl) dans les systèmes membranaires.....	19
Figure 8 : Structure chimique de β carotène.....	19
Figure 9 : Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes.....	21
Figure 10 : mécanismes d'actions antioxydantes des composés phénoliques.....	21
Figure 11 : Voie de biosynthèse de Shikimate.....	24
Figure 12 : Voie de biosynthèse de phénylpropanoïde.....	25
Figure 13 : Représentation simplifiée du métabolisme des phénylpropanoïdes.....	26
Figure 14 : Condensation de la voie d'acide shikimique et de malonate.....	27
Figure 15 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	29
Figure 16 : Structure de base des flavonoïdes.....	32
Figure 17 : Structure des tanins hydrolysables (cas d'un tanin gallique).....	34
Figure 18 : Structure des tanins condensés (cas de tanins condensés à base de flavan-3-ols).....	35
Figure 19 : Structure chimique d'une unité de phénylpropanoïde (C6-C3) (A) et d'un lignane (B).....	35
Figure 20 : Principaux constituants de lignine.....	36
Figure 21 : Structure d'une lignine.....	36
Figure 22 : Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH).....	45

Figure 23 : Mécanisme réactionnel intervenant entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH).....	47
Figure 24 : Mécanisme réactionnel de la fluorescéine en présence des radicaux libres.....	48
Figure 25 : Principe de formation des produits de la peroxydation lipidique (TBARS).	50
Figure 26 : Principe de détection des radicaux d'oxyde nitrique par le réactif de Griess.....	51
Figure 27 : Plaque de 24 puits utilisée dans le test de toxicité larvaire.....	53
Figure 28 : Mouvements d'étirement de la patte postérieure et torsion de la musculature dorso-abdominale (crampes abdominales).....	56
Figure 29 : Activité analgésique centrale par le test de la plaque chauffante.....	57
Figure 30 : Activité analgésique centrale par le test d'immersion de la queue.....	58
Figure 31 : Tracé Chromatographique des principaux témoins détectés à 280nm (A) et 325nm (B).....	63
Figure 32 : Tracé Chromatographique des principaux acides phénoliques et des flavonoïdes d'ELF de <i>Vitis vinifera</i> détectés à 280nm (A) et 325nm (B).....	64
Figure 33 : Tracé Chromatographique des principaux acides phénoliques et des flavonoïdes d'ELF de <i>Punica granatum</i> détectés à 280nm (A) et 325nm (B).....	64
Figure 34 : Tracé Chromatographique des principaux acides phénoliques et des flavonoïdes d'ELF de <i>Citrus aurantium</i> détectés à 280nm (A) et 325nm (B).....	65
Figure 35 : Tracé Chromatographique des principaux acides phénoliques et des flavonoïdes d'ELF d' <i>Opuntia ficus indica</i> détectés à 280nm (A) et 325nm (B).....	65
Figure 36 : Chromatogramme HPLC-UV relatif à l'ELF de <i>Vitis vinifera</i>	69
Figure 37 : Chromatogramme HPLC-UV relatif à l'ELF de <i>Punica granatum</i>	72
Figure 38 : Chromatogramme HPLC-UV relatif à l'ELF de <i>Citrus aurantium</i>	75
Figure 39 : Chromatogramme HPLC-UV relatif à l'ELF d' <i>Opuntia ficus indica</i>	78
Figure 40 : Teneurs en composés phénoliques dans les ELF.....	83
Figure 41 : Evolution du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations des ELF.....	85
Figure 42 : Valeurs des IC ₅₀ des ELF et de Trolox.....	85

Figure 43: Evolution du pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction des concentrations des ELF's.....	87
Figure 44 : Concentrations inhibitrices (IC ₅₀) des ELF's par test d'ABTS.....	88
Figure 45: Cinétique de réduction du fer ferrique (Fe ⁺³) en fer ferreux (Fe ⁺²) par les ELF's.....	90
Figure 46: Concentration effective (EC ₅₀) des ELF et Trolox évaluée par test FRAP..	90
Figure 47 : Cinétique de la décroissance de la fluorescéine induite par AHHP, en présence des ELF's.....	92
Figure 48 : Activité antioxydante des ELF's par le test ORAC.....	92
Figure 49 : Evolution de l'inhibition de la peroxydation lipidique en fonction des concentrations des ELF's.....	94
Figure 50 : Concentration inhibitrice (IC ₅₀) des ELF's par test TBARS.....	94
Figure 51 : Cinétique de l'évolution de l'inhibition du radical azoté oxyde nitrique (NO•) en fonction de la concentration des ELF's.....	96
Figure 52 : Concentrations inhibitrices (IC ₅₀) des ELF's par test NO•.....	97
Figure 53 : Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision traitées et non traitées (contrôle) chez le lapin.....	104
Figure 54 : Chronologie de la cicatrisation des brûlures traitées et non traitées (contrôle) chez le lapin.....	106

Liste des tableaux

Tableau I: Classification de <i>Vitis vinifera</i> L.....	4
Tableau II: Classification de <i>Punica granatum</i> L.....	6
Tableau III: Classification de <i>Citrus aurantium</i> L.....	7
Tableau IV: Classification d' <i>Opuntia ficus-indica</i> L.....	9
Tableau V : Principaux dérivés d'acide benzoïque.....	30
Tableau VI : Principaux dérivés d'acide cinnamique.....	30
Tableau VII : Principaux dérivés de coumarines.....	31
Tableau VIII : Principaux dérivés de Stilbènes.....	31
Tableau IX : Principales classes des flavonoïdes.....	32
Tableau X : Caractérisation du matériel végétal d'étude.....	37
Tableau XI : Gradient de solvants utilisé en CLHP analytique.....	40
Tableau XII : Conditions d'analyse par la spectrométrie de masse.....	41
Tableau XIII : Conditions d'analyse chromatographique.....	42
Tableau XIV : Gradient d'éluion de la phase mobile.....	42
Tableau XV : Estimation de la toxicité.....	54
Tableau XVI : Rapports d'extraction des ELF.....	62
Tableau XVII : Résultats du criblage phytochimique des ELF.....	62
Tableau XVIII : Profil en acides phénoliques et flavonoïdes dans les ELF.....	66
Tableau XIX : Principales molécules détectées dans l'ELF de <i>Vitis vinifera</i>	70
Tableau XX : Principales molécules détectées dans l'ELF de <i>Punica granatum</i> ...	73
Tableau XXI : Principales molécules détectées dans l'ELF de <i>Citrus aurantium</i> ...	76
Tableau XXII : Principales molécules détectées dans l'ELF d' <i>Opuntia-ficus indica</i>	79
Tableau XXIII : Estimation des contenus en composés phénoliques dans les ELF.....	82
Tableau XXIV : Pourcentage de mortalité des larves de crevettes en fonction des concentrations des ELF.....	98
Tableau XXV : Concentrations létales (LC ₅₀) des ELF.....	98
Tableau XXVI : Présentation de la correspondance entre LC ₅₀ et la toxicité selon Mousseux (1995).....	99
Tableau XXVII : Echelle de toxicité des substances d'après Hodge et Sterner	

(1949).....	99
Tableau XXVIII : Réduction du nombre de crampes induites par l'acide acétique chez les lots traités en non traité (contrôle).....	100
Tableau XXIX : Temps de réaction à une excitation thermique pour les lots traités et non traité (contrôle).....	101
Tableau XXX : Evolution de la contraction des plaies d'excision chez le lapin traité et non traité.....	105
Tableau XXXI : Evolution du pourcentage de contraction des plaies de brûlure chez le lapin traité et non traité.....	107
Tableau XXXII : Influence des ELFs de <i>Vitis vinifera</i> et <i>Punica granatum</i> sur le profil lipidique des souris.....	108

Liste des abréviations

ABTS: 2,2'-azynobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique]

DPPH : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EAG: Equivalent Acide Gallique

ELF : Extrait Lyophilisé du Fruit

EQ: Equivalent Quercétine

FRAP: Pouvoir Antioxydant de Réduction Ferrique

HPLC-UV-VIS-DAD/ESI-MS : Chromatographie Liquide Haute Performance UV Visible à barette diode couplée avec la spectrométrie de masse Electro Spray Ionisation

IC₅₀: Concentration Inhibitrice à 50 %

Ip: Voie Intrapéritonéale

NO°: Oxyde nitrique

ORAC: Capacité antioxydante du radical oxygène

Per os : Voie orale par gavage

TBARS: Substances réactives à l'acide thiobarbuturique

Introduction

Introduction

La consommation des aliments d'origine végétale constitue ces dernières années un enjeu de santé publique qui pourrait contribuer à prévenir de nombreuses maladies telles que les maladies cardiovasculaires, certains cancers en passant par les maladies inflammatoires et le processus de vieillissement (Heber., 2008), dont les propriétés préventives d'une alimentation riche en aliments d'origine végétale sont dues principalement à ses principes actifs qui sont souvent liés aux produits de métabolites secondaires, qui sont largement utilisés en tant qu'antioxydants contre le stress oxydatif; une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques suite à une production anormalement élevée de dérivés toxiques. Une fois installé le stress oxydant est responsable de l'oxydation de divers substrats biologiques importants comme les lipides, les lipoprotéines, ADN et les protéines (Birben *et al.*, 2012). Les modifications oxydatives apportés à ces diverses molécules sont potentiellement impliquées dans le développement de diverses pathologies : athérosclérose, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives...etc. (Pharm-Huy *et al.*, 2008).

Cependant, l'ingestion de polyphénols contenus dans les fruits et les légumes pourrait permettre à notre organisme de renforcer ses moyens de défense contre les processus d'oxydation qui menacent quotidiennement nos cellules, même si les mécanismes mis en jeu dépassent sans doute largement la réduction directe des espèces oxygénées réactivées par les polyphénols (Espin *et al.*, 2007 ; Dembitsky *et al.*, 2011).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande une consommation régulière d'un minimum de 400 g de fruits et de légumes par jour, notamment ceux riches en substances antioxydantes comme les composés phénoliques, pour la prévention des maladies chroniques qui peuvent être causées par le stress oxydatif.

Dans ce contexte, et en accord avec les recommandations OMS, nous avons exploré le potentiel antioxydant des extraits hydroalcooliques de fruits largement disponibles en Algérie ; à savoir *Vitis vinifera L Cultivar, Gros black* (Vigne), *Punica granatum L* (Grenadier), *Citrus aurantium L var. amara* (Oranger amère) et *Opuntia ficus-indica L* (Figuier de Barbarie).

Sous l'influence de facteurs environnementaux particuliers (sol et climat) à notre pays, ces espèces fructifères peuvent avoir une expression métabolique différente qui peut engendrer

des substances à fort pouvoir antioxydant particulièrement intéressantes. Il est bien établi que le stress abiotique, comme biotique peuvent activer les voies métaboliques engendrant des métabolites importants pour la protection de la plante. Les composés phénoliques notamment les flavonoïdes sont reconnus comme des photoprotecteurs qui sont produits par le végétal pour se protéger contre les méfaits liés à l'exposition au soleil et aux rayons UV.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et se fixe comme objectif sur :

-Extraction et caractérisation du profil en composés phénoliques des extraits des plantes étudiées;

- Evaluation *in vitro* du potentiel antioxydant sur plusieurs modèles expérimentaux (DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, ORAC, TBARS, NO[•]), et de la cytotoxicité (test d'*Artemia salina*) des extraits des plantes étudiées ;

- Evaluation *in vivo* des effets analgésique, cicatrisant et antihyperlipidémiant des extraits à fort potentiel antioxydant ;

-Evaluation de la toxicité aiguë chez la souris des extraits des plantes à fort pouvoir antioxydant.

Le manuscrit est organisé en deux grandes parties :

La première partie du manuscrit traite des données bibliographiques regroupant les aspects botaniques, taxonomiques et pharmacologiques sur les espèces étudiées. Le principe du stress oxydant, les structures biomoléculaires cibles ainsi que les maladies qui ont résultent sont aussi passés en revue. Cette partie décrit aussi les composés phénoliques, leur biosynthèse, leur diversité structurale ainsi que leurs propriétés biologiques qui sont abordés.

La deuxième partie est organisée en deux sous parties ; la première sous partie présente le matériel et les méthodes, alors que la seconde sous partie englobe les principaux résultats obtenus et leur discussion.

Le manuscrit comprend dans sa deuxième partie une conclusion générale qui permettra de dégager quelques perspectives de prolongement à ce travail, les références bibliographiques et une partie annexe.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur les plantes étudiées

1/ Description botanique des plantes sélectionnées

1-1/ *Vitis vinifera* L (Vigne) العنب (الكرمة)

La vigne (*Vitis vinifera*) est un arbuste pérenne ligneux, grimpant donnant annuellement des sarments pourvus de vrilles fourchues. Les inflorescences sont en grappes multiflores plus ou moins ramifiées. Feuilles alternes à 5 lobes sinués dentés, opposées à une vrille rameuse. Fleurs verdâtres, petites 3-5 mm. Sépales à 5 lobes très courts. Pétales 5. Etamine 5. Les fruits sont des baies contenant 1 à 5 graines albuminées, de 5-6 mm (Quezel et Santa., 1963 ; Louvieaux., 2004) (fig1).



Figure 1 : Différents organes de *Vitis vinifera* L.

La vigne *Vitis vinifera* est une espèce appartenant à la famille des Vitacées ; cette dernière est classée dans l'ordre des Rhamnales (Simon *et al.*, 1992) (tableau I). Cette famille était autrefois appelée Ampélidées qui compte plus d'un millier d'espèces vivant principalement dans les régions tropicales et subtropicales du globe (Galet., 2000). A l'heure actuelle, quatorze genres ont été définis parmi lesquels on retrouve le genre *Vitis* caractéristique des zones tempérées (Amérique, Europe et Asie). L'ensemble du genre *Vitis* comprend aujourd'hui près de 60 espèces diploïdes ($2n=38$ chromosomes) se répartissant en trois groupes géographiques distincts :

Vignes américaines (20 espèces) caractérisées par leur sensibilité au phylloxéra, leur bonne reprise au bouturage et au greffage et par leur bonne adaptation aux conditions climatiques tempérés en supportant ainsi la présence de doses importantes de calcaire dans le sol.

Vignes asiatiques (15 espèces) caractérisées par leur sensibilité au phylloxéra, à la chlorose et en général aux maladies cryptogamiques dont parmi ses espèces on note *Vitis amurensis* qui a été utilisé dans certains pays comme géniteur pour l'obtention de nouvelles variétés en raison de sa résistance au froid hivernal.

Vigne européenne qui n'est quant à elle constituée que d'une seule espèce *Vitis vinifera L* ; cultivée (*sativa sp*) et sauvage (*silverstris sp*), la vigne cultivée comprend des milliers de variétés ou cépages qui nécessite un climat tempéré (Blanc., 2012 ; Kanagarla *et al.*, 2013 ; Bettaieb-Khiari., 2015).

En Algérie, la culture de la vigne existait depuis longtemps et se basait sur la domestication des cépages autochtones. Les cultivars introduits par les différentes invasions du pays par des peuples arrivés du bassin méditerranéen : Romains, Turcs et Français, avaient orienté cette culture vers la production vinicole. La culture de la vigne se localisait dans les meilleures terres, à savoir les plaines de l'Oranie, de la Mitidja et de la Kabylie. Les diverses variétés de *Vitis vinifera* cultivées en Algérie sont : *Ahchichene*, *Adadi*, *Adari*, *Arekak*, *Tadelith*, *Ghanez*, *Muscat de Bercaime*, *Mokrani*, *Toutrissine*, *Ferrana de Mascara*, *Muscat de Gustave*, *Muscat de Fondouk*, *Chaouch* et *Muscat noire*. Cette dernière fait l'objet de la présente étude (Taguemout., 2013). Actuellement, les vignobles cultivés sont destinés à la production des raisins plus que du vin et ils se situent surtout au nord du pays et même dans la partie sud ; dans quelques oasis sahariennes (Sebki., 2014).

Tableau I: Classification de *Vitis vinifera L.*

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Archichlamydées
Ordre	Rhamnales
Famille	Vitacées
Genre	<i>Vitis</i>
Espèce	<i>Vitis vinifera L</i>

1-2/ *Punica granatum L* (Grenadier) الرمان

Arbuste de 2 à 5 m très rameux. A feuilles opposées oblongues, luisantes et fleur d'un rouge écarlate, sessile, régulière et grande, 20-25 mm, par 1-3 à l'aisselle des feuilles. Calice longuement campanulé coriace, rouge orangé à 5-7 lobes. Pétales 5-7. Etamines très nombreuses. Fruit volumineux couronné par la partie supérieure du calice, à graine nombreuses (grenade). Cultivé partout et souvent subspontané dans le Tell (Quezel et Santa., 1963). Le grenadier possède des feuilles caduques, oblongues, entières et glabres (fig2).

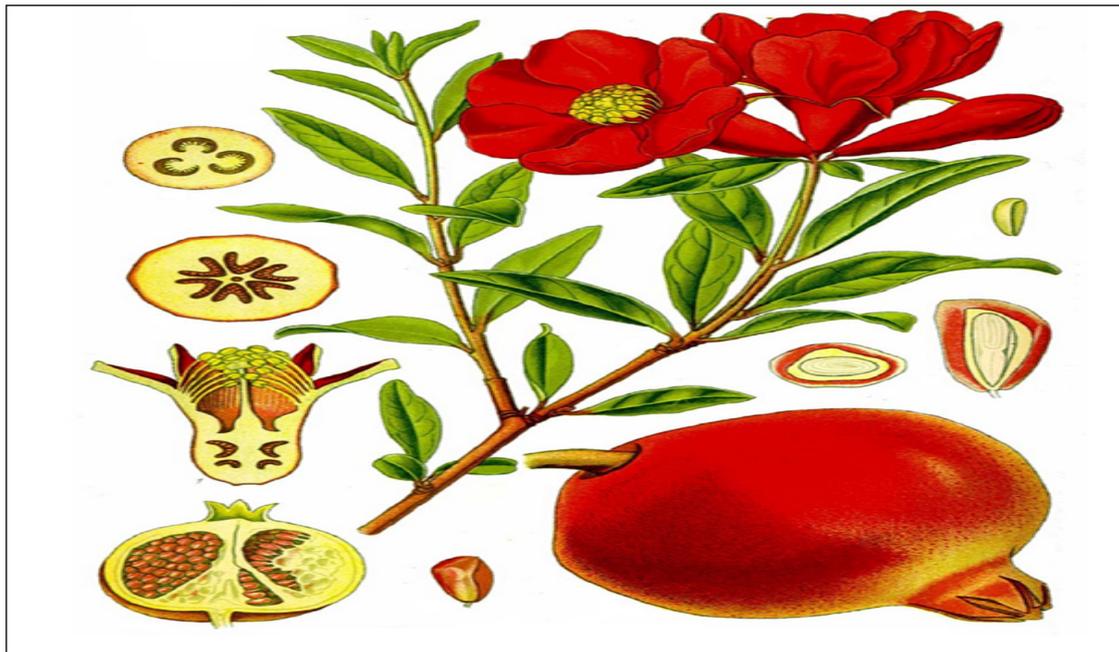


Figure 2: Différents organes de *Punica granatum L*.

La grenade, *Punica granatum*, fait partie de l'ordre des Myrtales et de la famille des Lythraceae (Tableau II), cette dernière est une famille des plantes dicotylédones qui comporte plus de 620 espèces. Une nouvelle classification a été créée en 1998 par un groupe de chercheurs botanistes en se basant sur les critères moléculaires notamment à l'ADN (classification phylogénétique), cette classification a été révisée en 2003 dont il convient de retenir que pour certaines espèces végétales, les résultats moléculaires sont en accord avec les anciennes classifications alors que pour d'autres espèces végétales il est nécessaire de modifier leur position, cependant pour le cas de *Punica granatum L* la famille des Punicacées n'existe plus. Le grenadier appartient alors à la famille des Lythracées (tableau II) (Spichiger *et al.*, 2004). Le grenadier a présenté une multitude de variétés dont aucune différence au niveau de la taille du fruit ou de caractéristiques agronomiques n'a été mise en évidence. La différence visuelle entre chaque variété se situe au niveau de la couleur de peau (du rouge

foncé au jaune pâle rosé), la couleur des arilles (du rouge très foncé au rose transparent) ou bien du goût des arilles (acide ou doux) (Chauchard., 2013). En Algérie, environ quatorze variétés sont actuellement autorisées à la production et à la commercialisation par l'Etat dont on peut citer l'*Espagne rouge*, *Corda travita*, *Moller huesso*, *Mellisse*, *Papers shell*, *Gajin*, *Sefri*, *Zemdautomne*, *Sulfani*, *Spanish duoy*, *Selection station*, *Chelfi Doux de kolea* et *Messaad* dont cette dernière variété a fait l'objet de la présente étude.

Les plantes ligneuses de la famille des Lythraceae se développent préférentiellement dans les zones tropicales et méditerranéennes dont l'aire de répartition de grenadier se situe en Asie occidentale et centrale (moyen orient) ; les pays d'origine de l'arbre s'étendent de la Turquie via le Caucase (Arménie, Azerbaïdjan, Géorgie) et du Tadjikistan, Turkménistan et Ouzbékistan à l'est jusqu'en Iran, Afghanistan et Pakistan dont la surface mondiale dédiée à la culture du grenadier est de 300 000 Ha, dont plus de 76% sont répartis sur cinq pays (Inde, Iran, Chine, Turquie et USA), cependant l'Espagne et l'Egypte ont une superficie comprise entre 2400 et 16 000 Ha (Hmid., 2013). Le grenadier est très bien adapté au climat méditerranéen et il est beaucoup cultivé dans le bassin méditerranéen : Espagne, Italie, Grèce, Algérie, Tunisie et Maroc (Kanoun., 2014) et on le rencontre plus rarement dans le midi de la France, au Portugal, en Bulgarie et en Crimée.

Tableau II: Classification de *Punica granatum L*

Embranchement	Angiospermes
Sous-embranchement	Dicotylédones vraies
Classe	Rosidées
Ordre	Myrtales
Famille	Lythraceae
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punica granatum L</i>

1-3/ *Citrus aurantium L* "Bigarade" "orange amère" البرتقال المر

Le bigaradier est un arbre de 5 à 10 m, à floraison continue, il porte un fruit avec une peau rugueuse teintée de vert ou de jaune, sa chair est acide et peu juteuse, très amère et contient beaucoup de pépins (Medjedoub., 1996). Le tronc est gris et lisse. Les feuilles ont un limbe ovale, coriace, articulé sur un pétiole ailé. Les fleurs d'orange sont blanches ou roses très odorantes à 5 pétales, blanches charnues et très parfumées avec une vingtaine d'étamine

soudées à la base par leur filet et qui servent à la fabrication de l'eau de fleur d'orange dans les pays où cette dernière est une tradition comme en Maroc, Algérie, Tunisie et Liban (fig3).



Figure 3 : Différents organes de *Citrus aurantium L.*

Le bigaradier, ou l'orange amère connu sous la dénomination scientifique *Citrus aurantium L* est une espèce d'arbre qui fait partie de la famille des Rutacées (agrumes), cette dernière se rencontre principalement dans les régions chaudes et tempérées du globe, composée d'environ 2000 espèces et 150 genres, et se subdivise en 7 sous familles dont Hespéridés qui regroupent essentiellement les espèces du genre *Citrus* (tableau III), désignées sous la dénomination d'Agrume (Ernould., 2008). Comme la plupart des arbres à agrumes, le bigaradier (*Citrus aurantium*) est originaire de la Sud-est de l'Asie. Sa diffusion est assurée par les Arabes dès le 8^{ème} siècle en Syrie, en Palestine, en Egypte, en Afrique du Nord puis en Sicile, en Sardaigne et en Espagne (Didier., 1984). Actuellement, le bigaradier (*Citrus aurantium L*) est largement implanté en région méditerranéenne et cultivé dans de nombreuses autres parties du monde.

Tableau III : Classification de *Citrus aurantium L.*

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Sapindales
Famille	Rutaceae
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>Citrus aurantium L</i>

1-4/ *Opuntia ficus-indica* L "figuier de Barbarie" التين الشوكي

Le figuier de barbarie est une plante robuste qui peut mesurer jusqu'à 5 mètres. Le tronc est épais et ligneux avec des cladodes vert aplatis sous forme de raquettes de 30 à 50 cm de longueur et de 15 à 30 cm de largeur, recouverts d'épines. Les fleurs sont hermaphrodites de couleur jaune ou rougeâtre. Les fruits sont des baies charnues avec une pulpe juteuse avec de nombreuses graines (Sutton *et al.*, 1981) (fig4).

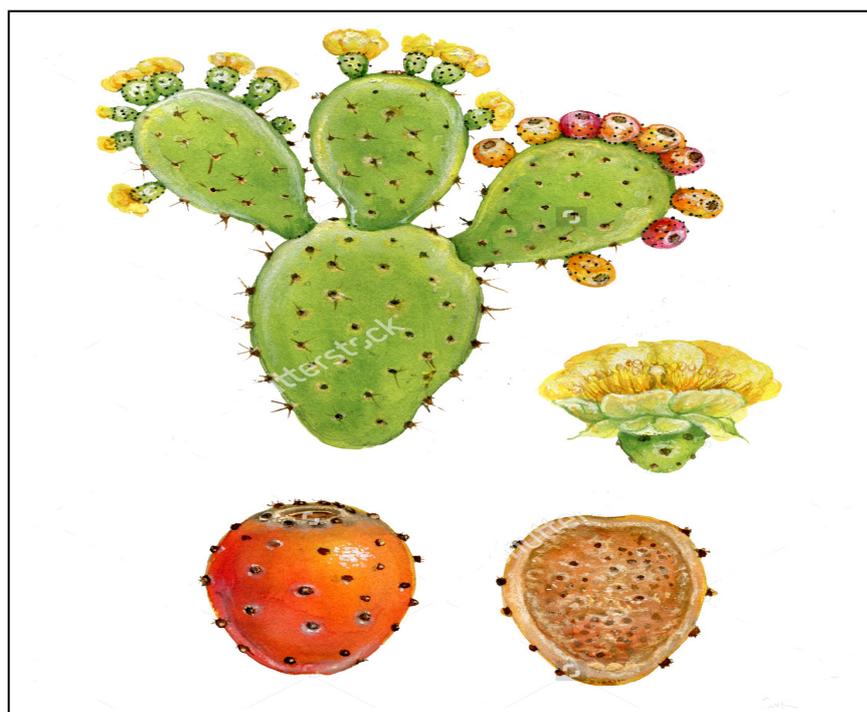


Figure 4 : Différents organes d'*Opuntia ficus-indica* L.

Le figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) est une espèce de plante de la famille des Cactaceae (tableau IV), subdivisée dans les tribus des Pereskieae, *Opuntieae* et *Cereae* qui compte environ 130 genres et 1500 espèces. La tribu des *Opuntieae* comprend le genre *Opuntia* avec environ 300 espèces intégrées dans l'ordre des *Caryophyllales* et à la sous classe des *Caryophylidaes* (Araba., 2000 ; Mulas *et al.*, 2004 ; Reyes-Aguero *et al.*, 2006 ; Neffar., 2012).

Le figuier de barbarie pousse sur le continent Américain dont il est originaire des régions arides et semi-arides du Mexique, le figuier de barbarie a été introduit en Afrique du Nord vers le 16^{ème} siècle (El Mannoubi *et al.*, 2008) où il s'est parfaitement adapté dans tout le bassin méditerranéen et largement cultivé pour son intérêt nutritif. Par la suite, la Cactaceae s'est répandue sur tous les continents présentant des régions au climat chaud et aride ; actuellement elle est présente en formes spontanées ou cultivées plus ou moins importante

dans de nombreux pays (Mulas et Mulas., 2004). *Opuntia ficus-indica* L est parmi les espèces les plus répandues dans le Maghreb en général et en Algérie en particulier qui produit des fruits comestibles appelés figue de Barbarie, deux formes d'*Opuntia ficus-indica* L poussent dans plusieurs steppes Algériennes : **inermes** ; qui présentent des différences au niveau de leurs pores, de la couleur du fruit et de la période de fructification dont les dimensions et le poids du fruit sont influencés par la période sèche et par la période de précipitation et **épineuses** ; elles diffèrent entre elles par la couleur de la chaire et par la présence des épines.

Tableau IV : Classification d'*Opuntia ficus-indica* L.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Caryophyllidae
Ordre	Caryophyllales
Famille	Cactaceae
Sous famille	Opuntioideae
Tribu	<i>Opuntieae</i>
Genre	<i>Opuntia</i>
Espèce	<i>Opuntia ficus-indica</i> L

2/ Propriétés pharmacologiques des fruits étudiés

2-1/ Effets protecteurs des fruits vis-à-vis des maladies cardiovasculaires

La consommation insuffisante des fruits et des légumes est un facteur vis-à-vis de l'apparition de maladies cardiovasculaires. Des études utilisant des modèles cellulaires et animaux, suggèrent que les bénéfices santé des fruits seraient en partie liés à l'activité biologique des composés phénoliques et en particulier aux flavonoïdes.

De nombreuses études évoquent fortement l'intérêt des composés phénoliques contenus dans les extraits des fruits de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus indica* vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (Livrea and Tesoriere., 2006 ; Olas *et al.*, 2008 ; Miguel *et al.*, 2010 ; Saonere Suryawanshi., 2011). Ces composés possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antiagrégantes et veinotropes qui leur permettent d'interagir avec le métabolisme des prostaglandines. Les polyphénols vont inhiber la cyclooxygénase et la lipooxygénase plaquettaire, limitant ainsi la formation de la thrombose, susceptible d'obstruer les artères (Cathiard-Thomas et Pezard., 1998 ; Fang *et al.*, 2008 ; Iacopini *et al.*,

2008). Les polyphénols limitent aussi très fortement l'oxydation des LDL (lipoprotéines de faible densité) ce qui les rend d'excellents agents régulateurs de lutte contre l'athérosclérose (Castilla *et al.*, 2006 ; Demelin., 2012).

2-2/ Effets protecteurs des fruits vis-à-vis du cancer

Le cancer peut être défini comme étant une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire (tumeur) anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme dont les facteurs de risque sont multiples. Un apport journalier en fruits et légumes dans l'alimentation a montré une bonne influence sur le développement du cancer dont de nombreuses études épidémiologiques ont montré que leur consommation était associée à une baisse importante du risque de développement de la maladie (Hadj Salem., 2009)

Toutefois, l'effet anticancéreux des composés phénoliques contenus dans les extraits des fruits de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus indica* ont été confirmé par plusieurs études épidémiologiques, ces études ont montré que les composés phénoliques des fruits étudiés ont un effet anti-prolifératif (God *et al.*, 2007 ; Lazze *et al.*, 2009 ; Miguel *et al.*, 2010 ; Saonere Suryawanshi., 2011 ; Kaur *et al.*, 2012) et peuvent inhiber les différents stades du cancer (initiation, promotion et progression) suite à un arrêt du cycle, apoptose, et les gènes de signalisation de l'ADN endommagé (Singletary *et al.*, 2003 ; Jung *et al.*, 2006 ; Hudson *et al.*, 2007)

Le mécanisme d'action des composés phénolique est variable et dépend de la structure chimique de ces molécules induisant des propriétés biologiques et des mécanismes d'action différents (Hadj Salem., 2009), selon Hudson et son équipe (2007) le mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé, mais il semble que les composés phénoliques des fruits de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* favorisent la libération de cytokines induites dans l'apoptose, inhibant ainsi la prolifération anarchique des cellules.

2-3/ Effets protecteurs des fruits au niveau anti-inflammatoire

Dans des conditions normales, l'inflammation est une réaction de défense naturel de l'organisme mettant en jeu de nombreux processus et mécanismes afin d'éliminer l'agent

agresseur, de bloquer l'atteinte tissulaire et de rétablir l'homéostasie et la fonction du tissu (Hébert., 2008).

Les recherches scientifiques ont mis en évidence la capacité des extraits de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* de diminuer la réaction inflammatoire, via de multiples mécanismes d'action dont les conséquences sont la réduction de synthèse de médiateurs lipidiques et de cytokines pro inflammatoires. En effet, les extraits des fruits de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* inhibent la biosynthèse des enzymes de la cascade arachidonique, notamment les cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2 et bloquent ainsi la biosynthèse des prostaglandines et thromboxane. De plus un effet inhibiteur a été démontré sur le système NF-kB impliqué dans les réponses immunes (Georgiev *et al.*, 2014 ; Sidana *et al.*, 2013 ; Kaur *et al.*, 2012 ; Miguel *et al.*, 2010). Bralley et son groupe (2007) avaient aussi montré que les extraits de peau et de graines de *Vitis vinifera* ont une action inhibitrice sur l'œdème induit de patte de rat. L'efficacité des extraits étudiés peut être liée à leur profil chimique, particulièrement à la présence de composés polyphénoliques, parmi ces composés se trouve les flavonoïdes dont leur variabilité structurale amène à de multiples mécanismes d'action (Soro *et al.*, 2015).

2-4/ Effets protecteurs des fruits au niveau hépatoprotecteur

L'augmentation des taux sériques en transaminases (ALAT et ASAT) est considérée comme une preuve d'une atteinte hépatique, dont de nombreuses études réalisées *in vivo* ont montré que les extraits de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* assurent une diminution du taux des enzymes hépatiques, cela confirme leur effet hépatotrope protecteur. Cela est également le signe des capacités des extraits à réduire les effets dommageables ou à préserver les mécanismes du fonctionnement du foie contre les perturbations d'une hépatotoxine (El-Hawary *et al.*, 2012., Kaur *et al.*, 2012 ; Middha *et al.*, 2013 ; Tomar *et al.*, 2013). Cet effet est dû à la présence d'un certain nombre de molécules dont les mécanismes d'action restent à définir.

Chapitre II : Stress oxydant et antioxydants

1/ Généralités

Un radical libre par définition est une espèce chimique, atome ou molécule extrêmement instable comprenant un ou plusieurs électrons célibataires non appariés dont ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer leurs électrons. Donc cette molécule instable est considérée comme un radical libre. Les radicaux libres font partie de la famille des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui regroupe ; radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), radical hydroxyle (OH^{\bullet}) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaire dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le dioxygène singulet 1O_2 , à côté des ROS, il existe des ENR (espèces réactives nitrogènes) qui sont générés en permanence par l'organisme dont le représentant majeur est le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) (Dhawan., 2014).

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif, parfois appelé stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre de la balance oxydante-antioxydante c'est-à-dire lorsque la production des radicaux libres dépasse les capacités de défense des tissus, ce qui peut engendrer de nombreux dommages sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant ainsi de nombreuses cibles : protéines, lipides, et acides nucléiques, concernant les lipides il peut y avoir même des peroxydations touchant les membranes ou les lipoprotéines qui transportent les lipides dans le sang (Taibur *et al.*, 2012).

2/ Effets du stress oxydant sur les structures moléculaires

Les structures moléculaires suivantes ; ADN (acide désoxyribonucléique), les lipides membranaires ou bien encore les protéines sont les cibles privilégiées des espèces radicalaires oxygénées et des radicaux libres.

2-1/ ADN (acide désoxyribonucléique)

Les radicaux libres en général et les espèces réactives de l'oxygène en particulier peuvent causer d'importantes modifications au niveau des bases nucléotidiques (purines et pyrimidines). Les radicaux OH^{\bullet} sont parmi les radicaux les plus délétères du stress oxydatif, ils sont ainsi capables de réagir avec les désoxyriboses ou du phosphodiester de la molécule de l'ADN comme ils sont capables de s'additionner sur les doubles liaisons des bases de

l'ADN ou arracher un atome d'hydrogène des groupements méthyles ou des résidus désoxyribose (Birben *et al.*, 2012). Grâce aux mécanismes d'excision et de resynthèse effectuées par des enzymes de réparation de l'ADN, les dégâts engendrés peuvent être réparés, mais lorsque ces systèmes de protection sont eux même atteints par l'oxydation, de graves altérations du matériel génétique sont induites, comme des mutations pouvant être à l'origine des cancers.

2-2/ Lipides

La peroxydation lipidique et la dégradation des acides gras membranaires sont considérées comme un indice des dommages oxydatifs effectués aux lipides. L'autoxydation des acides gras polyinsaturés et monoinsaturés est un processus radicalaire de réaction en chaîne qui se décompose en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison, les espèces réactives oxygénées arrachent un atome d'hydrogène aux chaînes insaturées des acides gras pour former des radicaux alkyles, au cours de la phase de propagation, les réactions en chaîne interviennent ensuite dans la membrane où les radicaux alkyles réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxydes. Les conséquences de la peroxydation lipidique sont l'altération de la fluidité des membranes ce qui conduit à leur désorganisation globale jusqu'à leur lyse (Birben *et al.*, 2012). Parmi les espèces réactives de l'oxygène, les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes sont les plus réactifs vis-à-vis des acides gras polyinsaturés.

2-3/ Protéines

Notre organisme est constitué de protéines qui sont également victimes des attaques radicalaires. Par exemple, les fibres de collagène, situées dans la peau qui sont quotidiennement exposés aux radicaux libres provenant de l'environnement mais aussi les protéines circulantes comme l'albumine et les molécules de reconnaissance moléculaire comme les enzymes, les anticorps et les récepteurs membranaires qui sont aussi des cibles de l'oxydation radicalaire.

Les espèces réactives oxygénées les plus réactives avec les protéines sont le radical hydroxyle OH^\bullet et le peroxyde d'azote ONOO^\bullet . L'ion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ est le moins réactif des espèces

réactives oxygénées mais il est suffisamment fort pour oxyder les groupements thiols (-SH) de la cystéine (Halliwell and Gutteridge., 2008 *in* Dubois., 2015).

Les ERO peuvent modifier les protéines suivant plusieurs modalités dont l'oxydation, la nitrosylation, la nitration ou encore la chlorination d'acides aminés spécifiques, menant plus ou moins directement à la modification de leur structure et donc à la perte de leur activité biologique (Henrotin., 2003 *in* Dubois., 2015).

En effet, dans les conditions physiologiques, les acides aminés les plus sensibles aux ERO rapportés par la littérature sont : les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine), les acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine), les acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) (Cabiscol *et al.*, 2000)

En présence des ERO les protéines peuvent se dénaturer, se fragmenter ou perdre leur structure primaire ou secondaire (apparition de groupements hydroperoxydes (-OOH), oxydation de squelette carboné de la chaîne polypeptidique avec fragmentation des protéines....) dont le dosage plasmatique des protéines carbonylées est actuellement le marqueur d'oxydation avancées des protéines le plus utilisé, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

Afin de dégrader les protéines oxydées, les cellules eucaryotes mettent en jeu deux voies principales de dégradation : les lysosomes et les protéasomes dont la première voie assure la dégradation des protéines extracellulaires tandis que la deuxième permet de dégrader les protéines intracellulaires.

3/ Maladies liées au stress oxydatif

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. Le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses maladies, et il est considéré comme facteur associé à des complications et progression de pathologies notamment dans la genèse des maladies cardiovasculaires, neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), métaboliques (diabète) ainsi que dans le vieillissement et la formation de cancers.

On peut aussi distinguer d'autres maladies dont le stress oxydatif est la cause principale comme l'hypertension artérielle, qui est causée en partie par le stress oxydatif suite à un dysfonctionnement endothéliale. L'athérosclérose causé aussi par le stress oxydatif conduit à une diminution de la circulation sanguine et une hausse de la pression artérielle (Bansal and

Kaushal., 2014 ; Thanan *et al.*, 2015). En effet, le stress oxydatif est aussi associé à plusieurs maladies rénales, comme l'insuffisance rénale chronique et les pierres aux reins.

4/ Antioxydants

Un antioxydant par définition est toute substance capable de retarder ou de prévenir de manière significative l'oxydation du substrat par neutralisation ou réduction des dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et de maintenir un niveau non cytotoxique de ROS, tant que la quantité d'antioxydants disponibles est suffisante les radicaux libres ne constituent pas un réel problème pour l'organisme, mais en cas de production excessive de radicaux libres non gérables par l'organisme, toutes les structures biologiques deviennent la cible de lésions (Basharat., 2015). Il existe plusieurs mécanismes d'antioxydation, à savoir des mécanismes endogènes et exogènes (nutritionnels) qui ont les mêmes effets bénéfiques contre les oxydants.

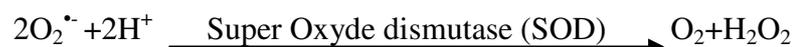
5/ Mécanismes d'antioxydation

5-1/ Système de défense endogène (enzymatique)

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de Superoxyde dismutase (SOD), Catalase et de Glutathion peroxydase GPx, ces radicaux permettent l'élimination des radicaux libres primaires (Favier., 2003).

5-1-1/ Superoxydes dismutases (SOD)

Se sont des métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydatif et qui assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ par réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène.

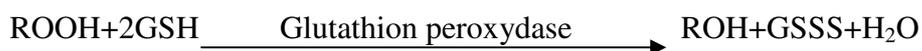


Cette métallo-enzyme se trouve dans tous les organismes aérobies, chez l'homme, on décrit trois isoenzymes : la Cu/Zn-SOD cytosolique, la Mn-SOD mitochondriale et la Cu/Zn-SOD

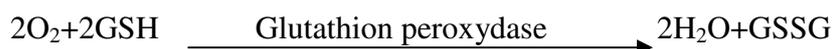
qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Haleng *et al.*, 2007).

5-1-2/ Glutathions peroxydases (GPxs)

Le glutathion peroxydase est une sélénoprotéine qui réduit les peroxydes aux dépends de son substrat spécifique. Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés.



Cette enzyme a présenté également une très bonne affinité pour le H_2O_2 dont elle est importante à sa décomposition de manière continue à des niveaux physiologiques de la cellule suite à une oxydation de son co-substrat GSH en GSSG qui sera réduit par la suite par l'action de la glutathion réductase (Matés *et al.*, 1999).



5-1-3/ Catalases

La catalase est une enzyme très indispensable pour la détoxification des radicaux libres durant le stress dont la fonction principale est de catalyser la décomposition par dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène.



La catalase est une tétramère dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécules de NADPH dont la fixation de ce dernier sur la catalase augmente son efficacité et la protège contre l'inactivation (Kirkman *et al.*, 1999), de plus cette enzyme n'utilise pas de cofacteurs enzymatiques. La catalase est présente dans la plupart des organismes procaryotes et eucaryotes, elle est présente dans tous les organes, dans la cellule elle est majoritairement concentrée dans les peroxysomes ou elle règle la production de H_2O_2 issue des enzymes oxydases et elle est présente également à l'état libre dans le plasma (Hennebelle., 2006) (Fig 5).

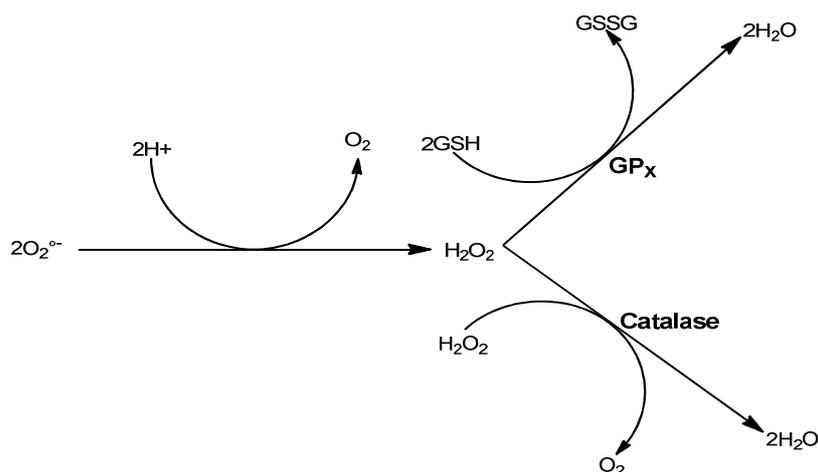


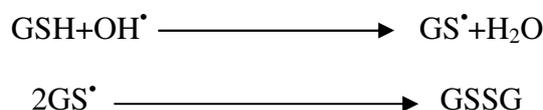
Figure 5 : Réactions de détoxification du radical anion superoxide et du peroxyde d'hydrogène (Hennebelle., 2006).

5-2/ Système de défenses exogène (non enzymatiques)

Les systèmes antioxydants non enzymatiques sont des nutriments naturellement apportés par l'alimentation ou par des composés endogènes. Ils sont capables de piéger les entités oxydantes ou de ralentir les processus d'oxydation et forment ainsi des entités plus stables qui pourront être éliminées par d'autres systèmes antioxydants. Les principaux antioxydants non enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E (α -tocophérol), la vitamine C (acide L-ascorbique), la vitamine A (caroténoïde) et l'acide urique et les composés polyphénoliques.

5-2-1/ Glutathion et protéines-thiols

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine), et il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire, présent sous sa forme réduite (GSH). Le glutathion joue un rôle important comme antioxydant endogène et dans le maintien de l'équilibre d'oxydo-réduction. Le glutathion permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonctions thiols (R-SH). De plus il piège le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et peut réagir avec les radicaux hydroxyles OH^\bullet et d'oxygène singulet O_2^\bullet directement et permet ainsi de cesser la chaîne d'oxydation (Birben *et al.*, 2012 ; Kabel., 2014).



5-2-2/ Vitamine E (α -tocophérol)

La vitamine E ou bien α -tocophérol (fig6) est une vitamine liposoluble à propriété antioxydante, ce caractère hydrophobe lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, ce qui ainsi explique sa capacité d'empêcher ou d'arrêter la propagation de la peroxydation lipidique et de piéger les radicaux libres organiques provenant de l'oxydation des lipides (Laguerre *et al.*, 2007 ; Birben *et al.*, 2012 ; Kabel., 2014).

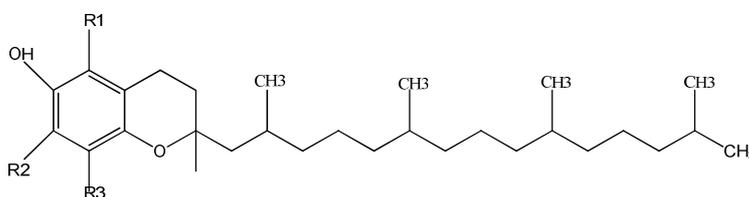


Figure 6 : Structure chimique d' α -tocophérol (Laguerre *et al.*, 2007).

5-2-3/ Vitamine C (acide L-ascorbique)

La vitamine C, ou acide ascorbique, est une molécule hydrophile que l'on retrouve dans de nombreux fruits. Son caractère hydrophile ne lui permet pas d'avoir une activité intracellulaire. La vitamine C a présenté sa capacité à piéger les radicaux libres mais son intérêt majeur réside en sa capacité à régénérer la vitamine E au sein de la membrane (fig7) ; la vitamine C est très bien connue pour ses propriétés antioxydantes, en effet, elle est considérée comme un excellent piégeur des espèces réactives oxygénées il réagit avec l'anion superoxyde (OH^\bullet), l'oxygène singulet (O_2^\bullet), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou encore inhibe la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec les radicaux lipidiques (Birben *et al.*, 2012 ; Kabel., 2014).

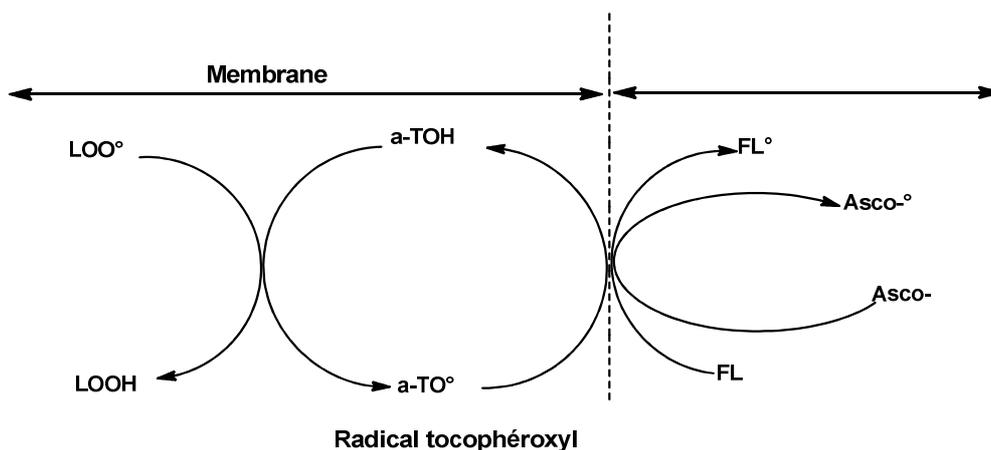


Figure 7 : Mécanisme de régénération potentiel entre α -tocophérol ($\alpha\text{-TOH}$), l'ascorbate (Asco^\bullet) et les flavonoïdes (FL) dans les systèmes membranaires (Laguerre *et al.*, 2007 ; Kabel., 2014).

5-2-4/ Vitamine A (Caroténoïdes)

Elle appartient à la famille des caroténoïdes (fig8), elle est capable de piéger les radicaux hydroxyles OH^\bullet et peroxydes LOO^\bullet , et elle protège ainsi les LDL, dans lesquelles elle est transportée. Grâce à son système de doubles liaisons conjuguées, le béta-carotène fixe les radicaux peroxydes ROO^\bullet et le radical formé est stabilisé par mésomérie ; la propagation des oxydations en chaîne s'en trouve inhibée. De ce fait, les caroténoïdes font partie du système de défense cellulaire contre les formes agressives de l'oxygène et les radicaux libres (Nicol et Maudet., 2000 ; Laguerre *et al.*, 2007).

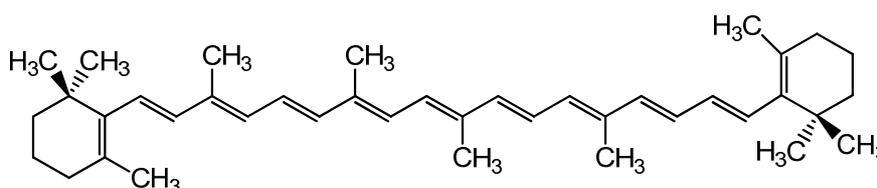
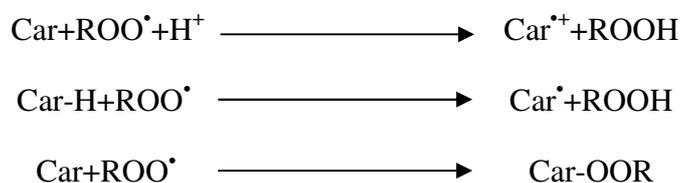


Figure 8 : Structure chimique de β carotène (Laguerre *et al.*, 2007).

5-2-5/ Acide urique

L'acide urique est un produit terminal du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux notamment OH[•], ROO[•], NOO[•].....etc. Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites notamment par la vitamine C. Cependant, il a été trouvé que l'acide urique n'a pas d'efficacité contre les générateurs liposolubles (Haleng *et al.*, 2007).

5-2-6/ Composés phénoliques

Les composés phénoliques et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes, caractérisés par une structure chimique commune de type 2-phénylbenzopyrane. Leur activité antioxydante réside dans leur capacité à terminer les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électron et de protons, et à chélater les ions métalliques qui sont capables de catalyser la peroxydation lipidique (Leopoldini *et al.*, 2011).

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous :



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO[•]), ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R[•] ; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs (Amić *et al.*, 2003)



La propriété antiradicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite : une structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), une double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo et des groupements hydroxyles libres en C3 et C5 (fig9) (Amić *et al.*, 2003). A titre d'exemple la

quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante (Middleton *et al.*, 2000).

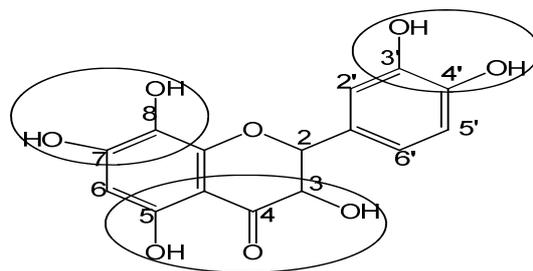
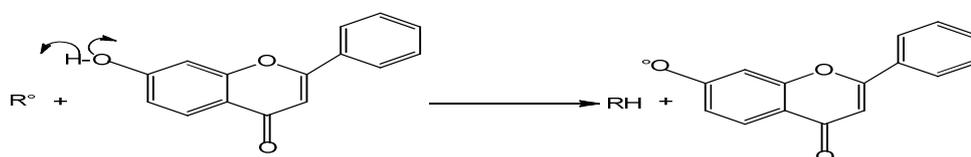


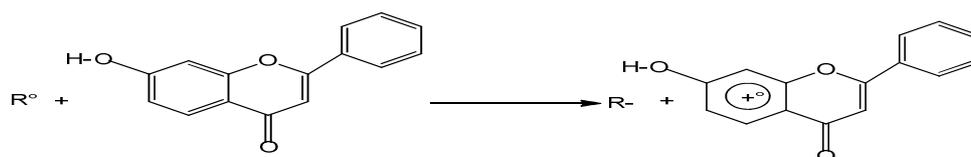
Figure 9 : Critères structuraux essentiels pour avoir une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes (Amić *et al.*, 2003).

Les flavonoïdes sont aussi capables d'interagir avec les métaux de transition et de les chélater grâce à leur structure chimique spécifique (fig10), en créant des composés complexes inactifs (Malešev et Kuntić., 2007), la chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux : un site situé entre le groupe 3'OH et le groupe 4'OH du cycle B, un site situé entre le groupe 3OH et 4C=O de l'hétérocycle C et un site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C.

Transfert de proton (HAT)



Transfert d'électron (SET)



Chélation des ions métaux de transition

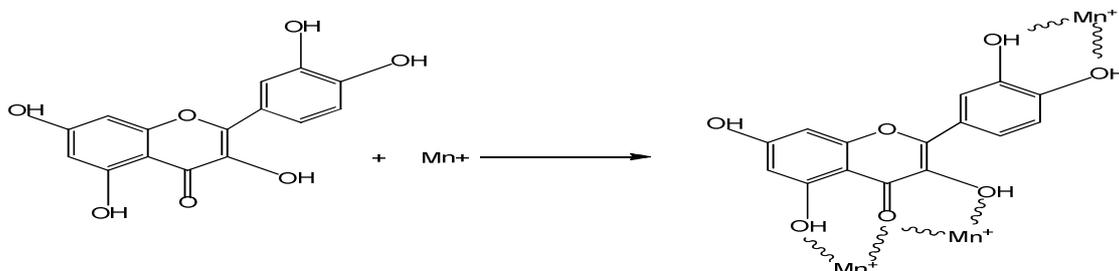


Figure 10 : Mécanismes d'actions antioxydantes des composés phénoliques (Leopoldini *et al.*, 2011).

Chapitre III : Les polyphénols, structures et principales classes

1/ Introduction

Les métabolites secondaires n'appartiennent pas aux métabolites primaires, ces derniers qui sont essentiels pour le métabolisme et le développement des plantes et qui rassemblent à des acides aminés, des lipides, des sucres ou des acides nucléiques.

Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires ne participent pas directement à l'assimilation des nutriments et donc dans le développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques et abiotiques, Ils peuvent servir de défense par la protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores (sécrétions amères ou toxiques pour les prédateurs) ou au contraire, attirer certaines espèces ayant des rôles bénéfiques (attraction des pollinisateurs), ils peuvent également permettre la communication entre les plantes, par des réponses allélopathiques ce qui aboutit à une compétition entre les plantes pour la germination et la croissance par exemple *Acacia pruinocarpa* produit des composés allélopathiques qui empêchent la croissance des autres plantes compétitrices. Parmi les produits du métabolisme secondaires on note ; les composés phénoliques ou les polyphénols, les composés azotés notamment les alcaloïdes, les terpènes et les stéroïdes.

2/ Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une famille de molécules organiques, largement présente dans le règne végétale depuis les racines jusqu'aux fruits et caractérisée par la présence d'un ou de plusieurs cycles aromatiques liés avec un ou plusieurs groupements hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction ; éther, ester, hétéroside (Bruneton., 1999 ; Bloor., 2001) (exemple : acides phénoliques, flavonoïdes, tanins et anthocyanes). Plus de 8000 structures ont été identifiées (Waksmundzka-Hajnos and Sherma., 2011) allant des molécules simples de faible poids moléculaire jusqu'aux substances hautement polymérisées de haut poids moléculaire comme les tanins.

3/Biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont principalement issus de deux grandes voies métaboliques de biosynthèse notamment la voie de l'acide shikimique, la voie d'acétate malonate ainsi qu'une voie mixte de biosynthèse des flavonoïdes.

3-1/Voie de Shikimate

La voie de shikimate (Floss., 1997) (fig11) appartient au métabolisme primaire ; C'est la voie de biosynthèse des composés aromatiques notamment les acides aminés aromatiques, parmi lesquels le précurseur du métabolisme des phénylpropanoïdes ; la phénylalanine. La voie de shikimate, appelée également la voie de phénylpropanoïde (Hoffman., 2003 ; Hoffman *et al.*, 2004) (fig12), joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme et conduit à la formation de nombreux composés phénoliques (Kening *et al.*, 1995). La phénylalanine issue de la voie de shikimate marque l'entrée à la voie de phénylalanine suite à sa conversion en acide cinnamique par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) ce qui constitue ainsi le point de départ de la synthèse des principaux métabolites notamment : les acides phénoliques simples, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, des coumarines, des tanins condensés et des polymères de lignines.

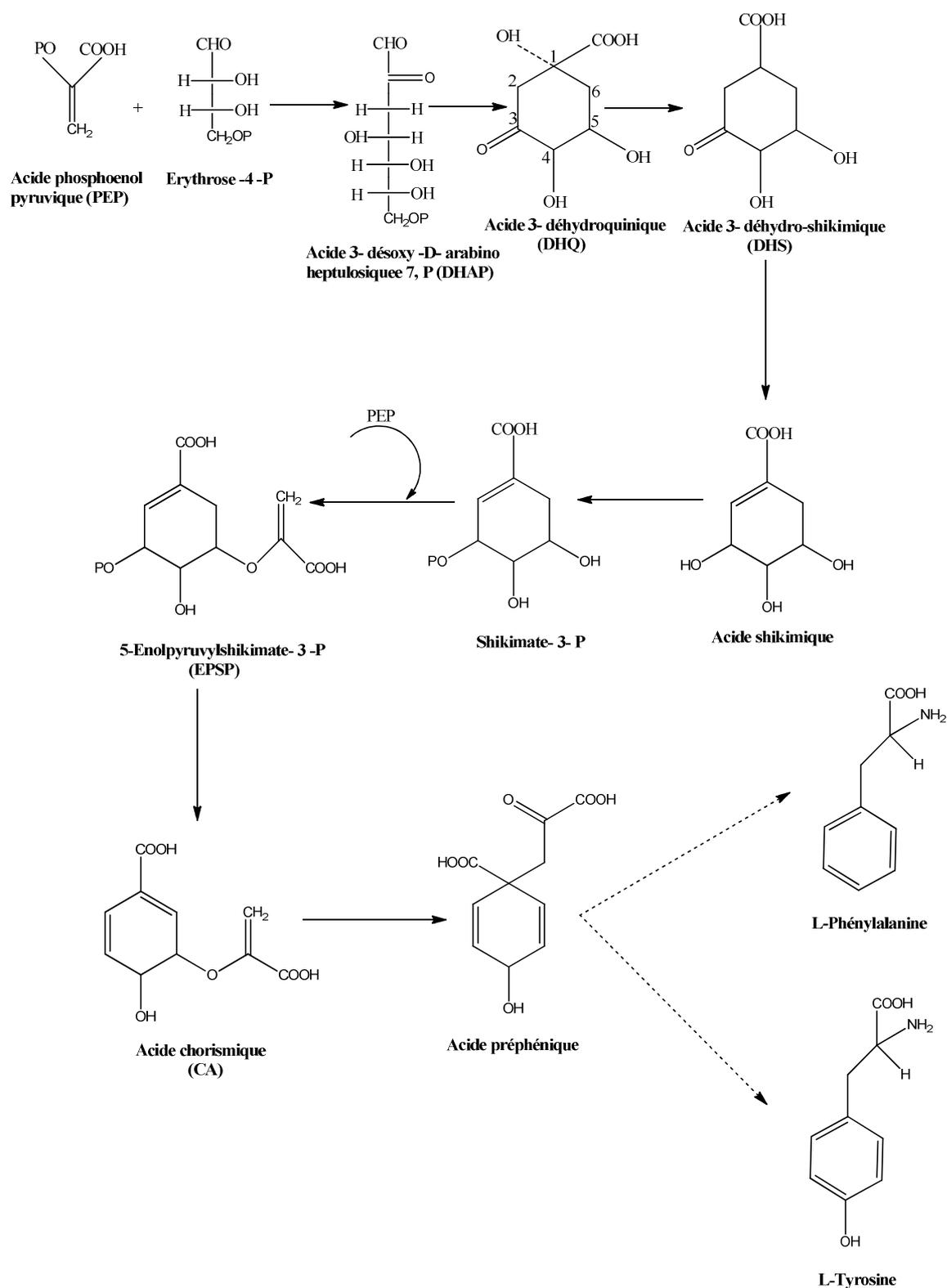


Figure 11 : Voie de biosynthèse de Shikimate (Floss., 1997)

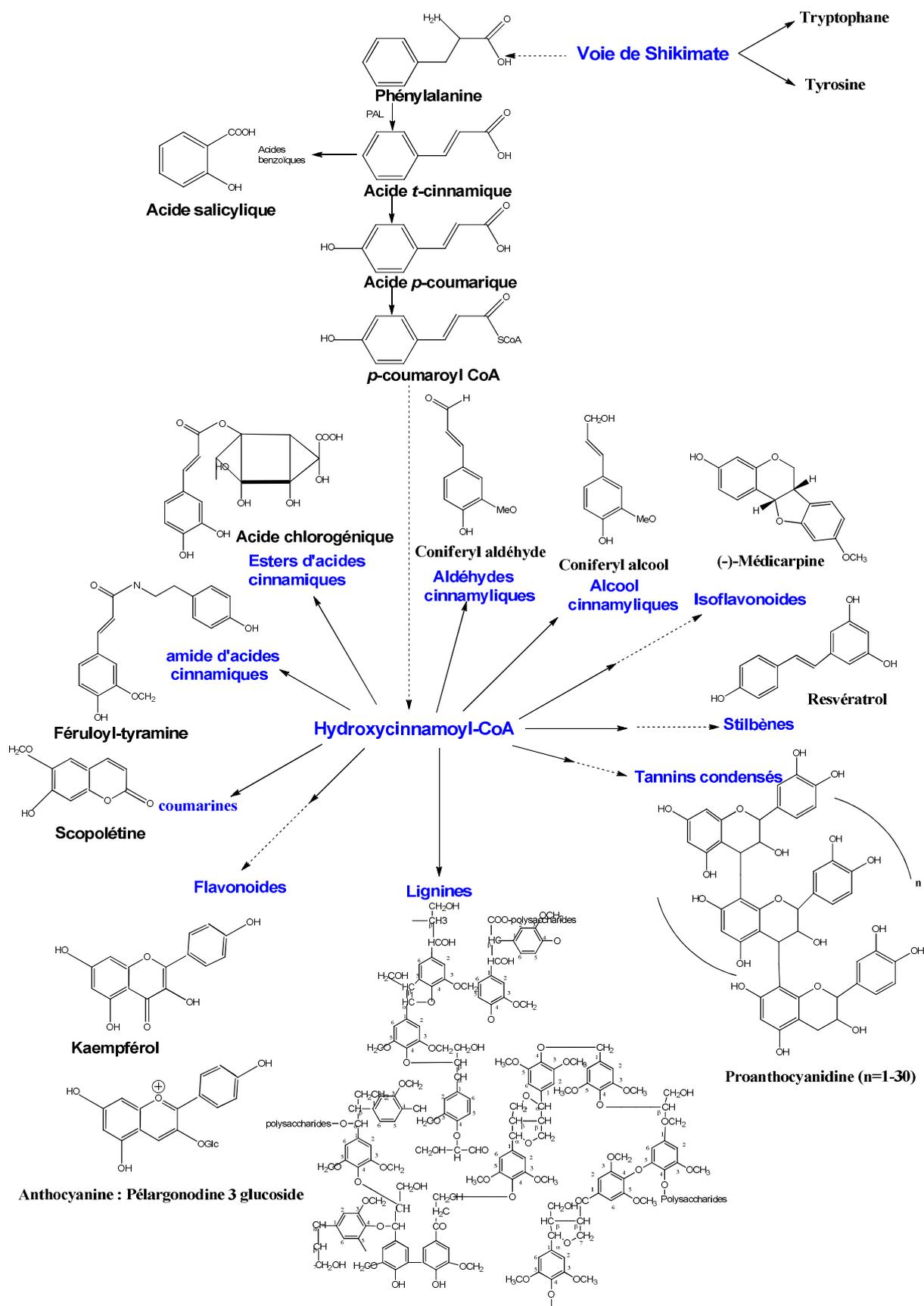


Figure 12 : Voie de biosynthèse de phénylpropanoïde (Hoffman *et al.*, 2004).

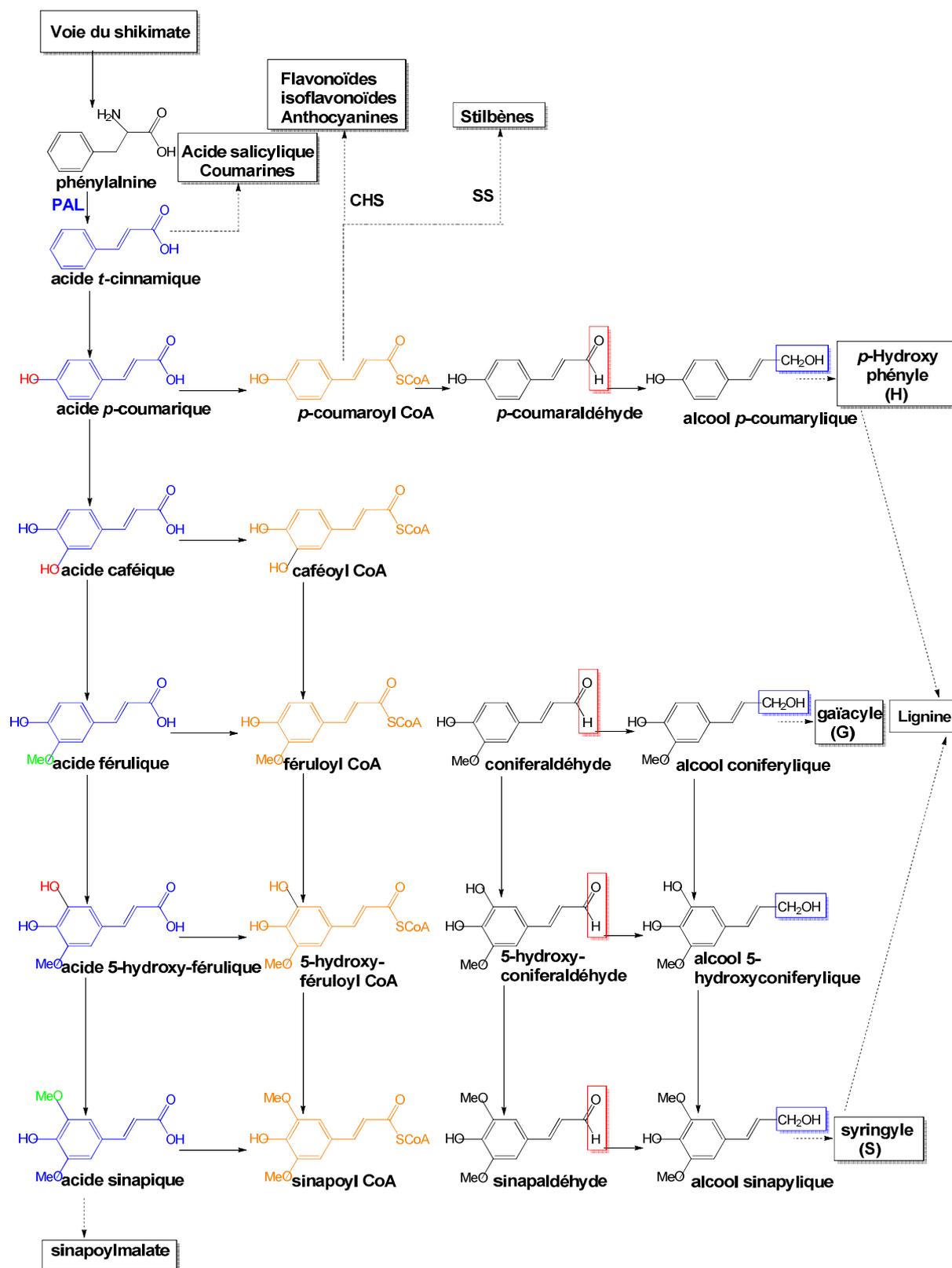


Figure 13 : Représentation simplifiée du métabolisme des phénylpropanoïdes (Hoffman., 2003).

3-2/Voie d'acétate malonate

Les composés phénoliques sont également formés par la voie d'acétate malonate suite à une condensation de 2 malonyl CoA et une molécule d'acétyl CoA qui donne une chaîne latérale, cette dernière se cyclise pour donner naissance au noyau A (fig14). La voie d'acide shikimique et celle d'acétate malonate se condensent pour donner naissance à une voie mixte responsable de la biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes.

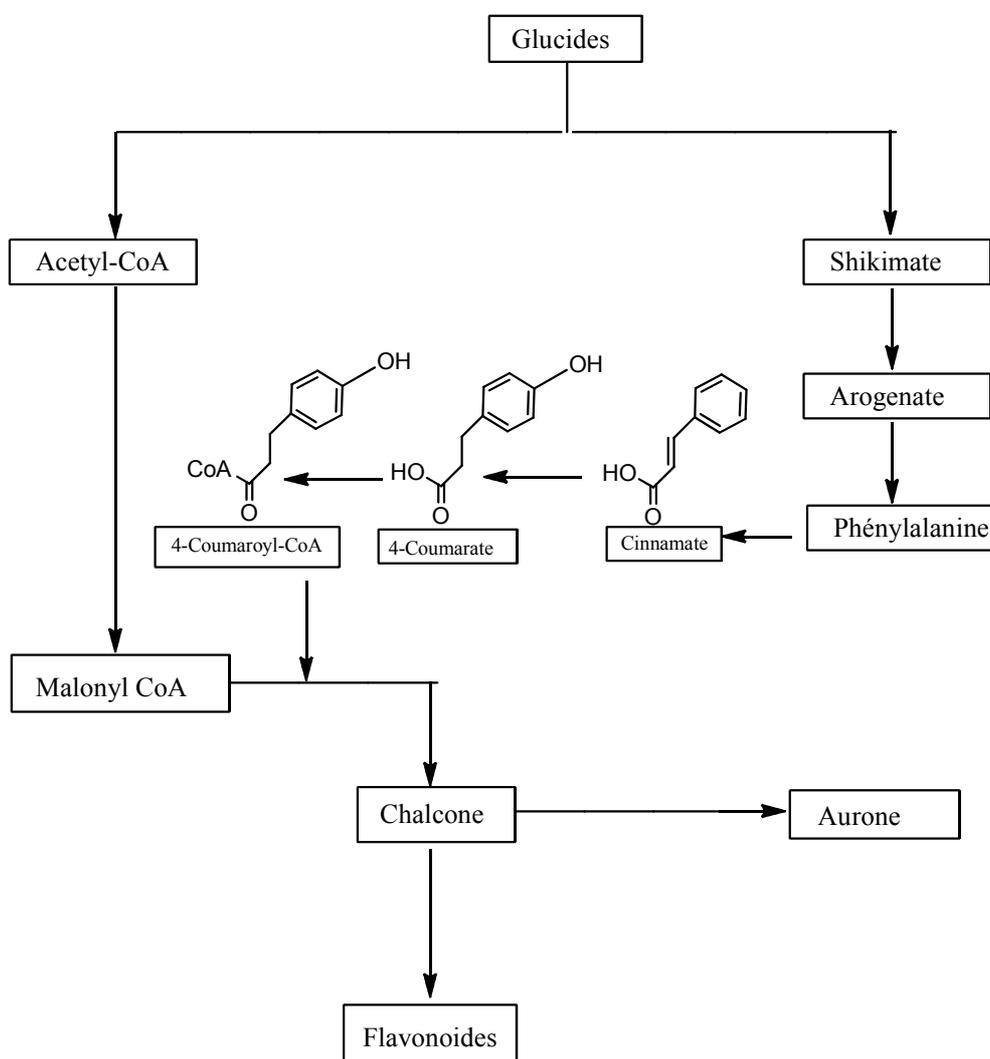


Figure 14 : Condensation de la voie d'acide shikimique et de malonate (Hoffman *et al.*, 2004).

3-3/ Voie mixte de biosynthèse des flavonoïdes

La phénylalanine ammonialyase (PAL) permet d'obtenir l'acide cinnamique qui deviendra acide *p*-coumarique après action de la cinnamate 4-hydroxylase. La réaction de condensation d'une unité de propanoïde avec trois unités de malonyl-CoA sous l'action de la chalcone synthase conduit à l'obtention de chalcone, cette dernière est par la suite considérée comme une intermédiaire caractéristique de la synthèse de différents flavonoïdes (Bruneton., 1999).

Les flavonoïdes possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones (cycle A en C6 et cycle B en C6 reliés par une chaîne en C3) parce qu'ils ont la même origine de biosynthèse, cette dernière se fait à partir d'un précurseur commun ; 4, 2', 4', 6' tétrahydroxychalcone, qui est métabolisé en présence de chalcone isomérase en flavanone, ensuite sous l'action de flavone synthase le flavanone se transforme en flavone. En présence de flavonol synthase ou dihydroflavonol-4-réductase le dihydroflavonol se métabolise en flavonol ; kaempférol ou bien flavan 3, 4 diol, ce dernier qui semble être le précurseur des flavan-3-ols et anthocyanidol (fig15) (Winkel-Shirley., 2001 ; Subsamanian *et al.*, 2007).

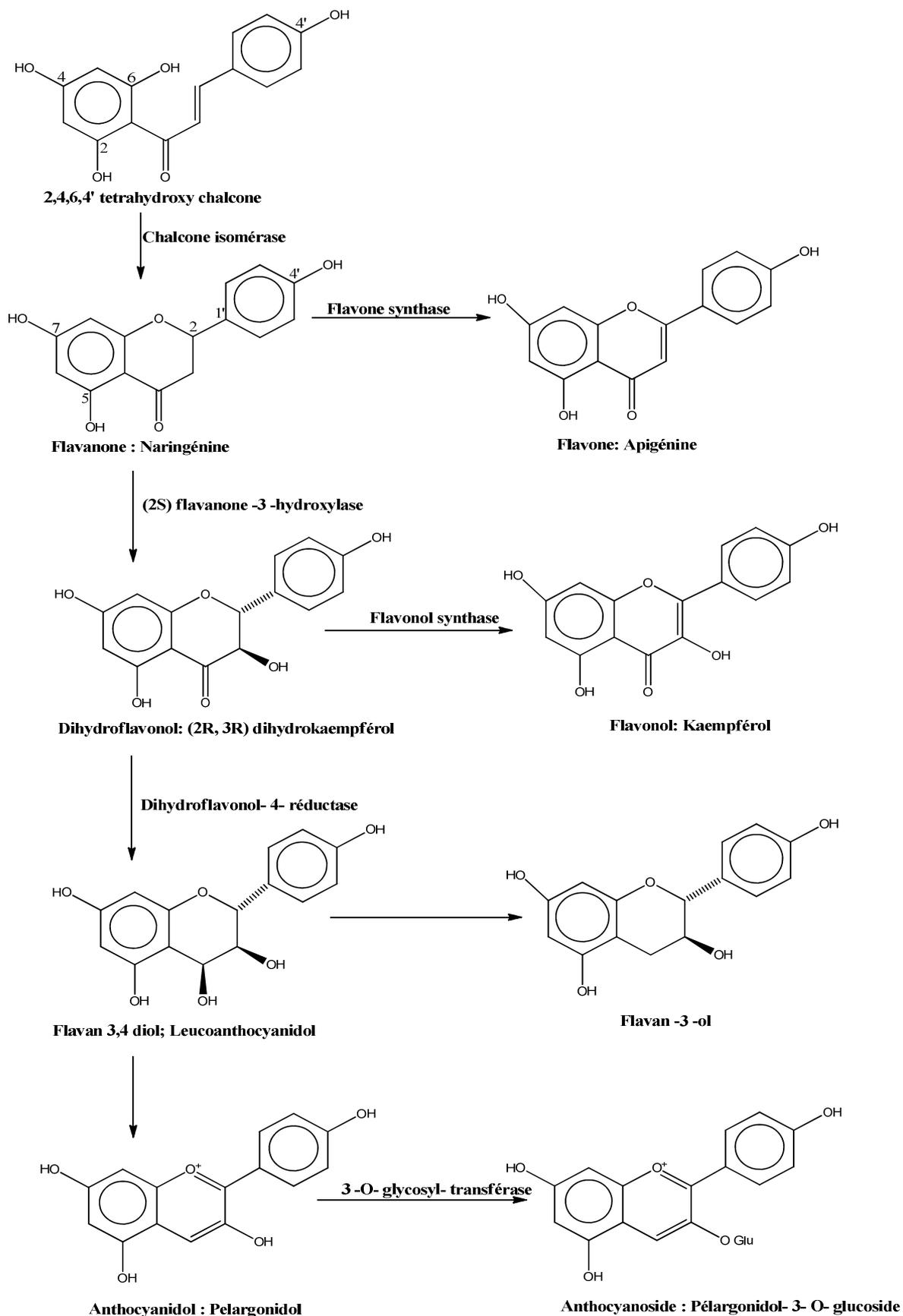


Figure 15 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Winkel-Shirley., 2001 ; Subsamanian *et al.*, 2007).

4/ Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques présentent une grande diversité de structure, dont Harborne (1993) a proposé une classification de ces composés en se basant sur la détermination du nombre d'atomes constitutifs et la structure du squelette de base. Ces composés peuvent être divisés en plusieurs classes.

4-1/Acides phénoliques (C6-C1 ou C6-C3)

Deux principales classes des acides phénoliques peuvent être distinguées ; les dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1) (Sarni-Manchado et Cheynier., 2006) et les dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3) (Sarni-Manchado et Cheynier., 2006).

Les coumarines sont aussi considérées comme des composés phénoliques ayant une structure de base de type benzo-2-pyrone (C6-C3) suite à une cyclisation interne de la chaîne latérale (Macheix *et al.*, 2005).

Tableau V : Principaux dérivés d'acide benzoïque (Sarni-Manchado et Cheynier., 2006).

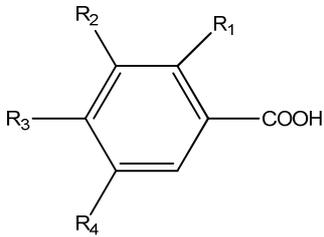
Structure	R1	R2	R3	R4	Composé
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide <i>p</i> hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Tableau VI : Principaux dérivés d'acide cinnamique (Sarni-Manchado et Cheynier., 2006).

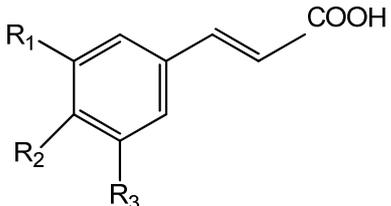
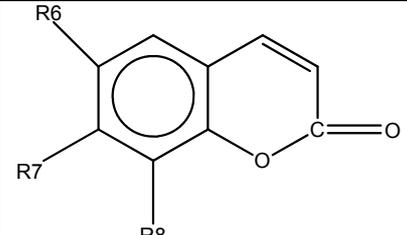
Structure	R1	R2	R3	Composé
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide <i>p</i> coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

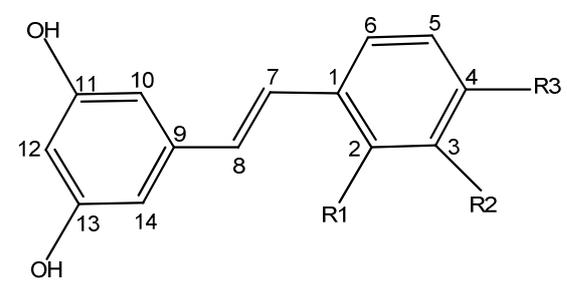
Tableau VII : Principaux dérivés de coumarines (Macheix *et al.*, 2005).

Structure	R6	R7	R8	Composé
	H	OH	H	Umbelliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH ₃	OH	H	Scopolétole
	OCH ₃	OH	OH	Fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

4-2/Stilbènes (C6-C2-C6)

Les stilbènes sont des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire des végétaux, présentent une structure de type C6-C2-C6 : deux cycles benzéniques reliés par un pont éthylène (Jean-Denis., 2005). Ces composés existent sous deux formes ; la forme *Cis* (obtenue sous action de la chaleur) et la forme *Trans* (forme stable et bioactive) (Mérillon *et al.*, 1997).

Tableau VIII : Principaux dérivés de Stilbènes (Jean-Denis., 2005)

Structure	R1	R2	R3	Composé
	H	H	H	Pinosylvine
	H	H	OH	Resvératrol
	OH	H	OH	Hydroxyresvératrol
	H	OH	OH	Picéatannol
	H	OH	OCH ₃	Rhapontagénine

4-3/Flavonoïdes (C6-C3-C6)

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, dont plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (Harbone, 1993). Ils sont à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques grâce à leur caractère anti-oxydant suite à la neutralisation des radicaux libres et la limite de certains dommages oxydatifs (Raskin *et al.*, 2002). Les flavonoïdes ayant tous en commun le même squelette de base à quinze atomes de carbones (C6-C3-C6) ; cycle A et cycle C (2 phényl-1-benzopyrane) reliés par un cycle pyranique central (cycle B) (fig16).

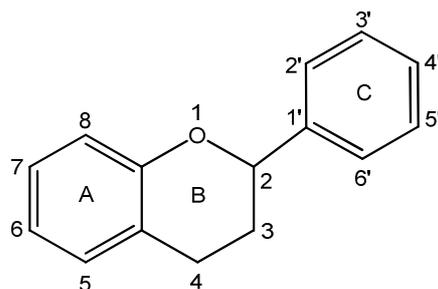
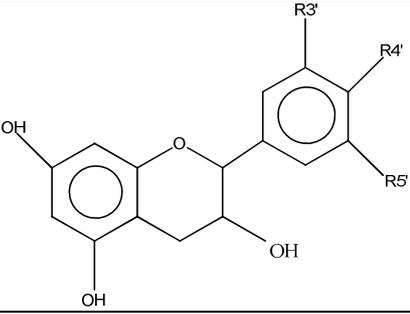
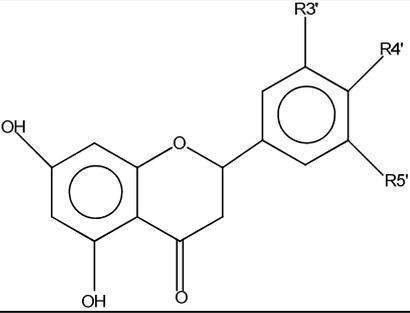
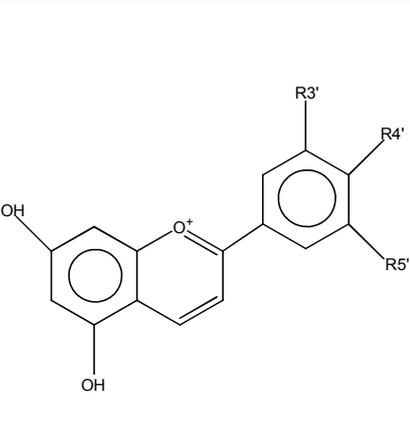
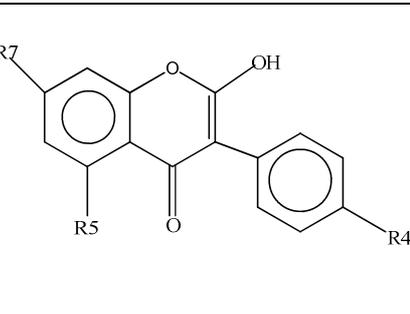


Figure 16: Structure de base des flavonoïdes (Amić *et al.*, 2003)

Les flavonoïdes peuvent être divisés en plusieurs classes notamment les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les auronnes et les anthocyanes (Narayana *et al.*, 2001 ; W-Erdman *et al.*, 2007). Cette classification a été basée sur la nature des substitutions R5 et R7 du cycle A, la nature des groupements R3', R4' et R5' du cycle C ou bien le degré d'oxydation et la diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C (Tableau IX).

Tableau IX : Principales classes des flavonoïdes (Narayana *et al.*, 2001 ; W-Erdman *et al.*, 2007).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine

Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R₅ OH	R₇ OH	R_{4'} OH	Genistéine
		H	O-Glu	OH	Diadézine

4-4/Tanins

Les tanins sont un groupe de polyphénols, de haut poids moléculaire, généralement subdivisé en tanins hydrolysables et tanins condensés.

4-4-1/Tanins hydrolysables

Comme leur nom l'indique, ce genre des tanins sont dites hydrolysables car ils sont sensibles à l'hydrolyse chimique ou enzymatique, ces molécules dérivent d'une estérification d'un

glucide (souvent le glucose) par l'acide gallique (cas des tanins galliques) ou un de ses dérivés (cas des tanins ellagiques) (fig17) (Bruneton, 2009).

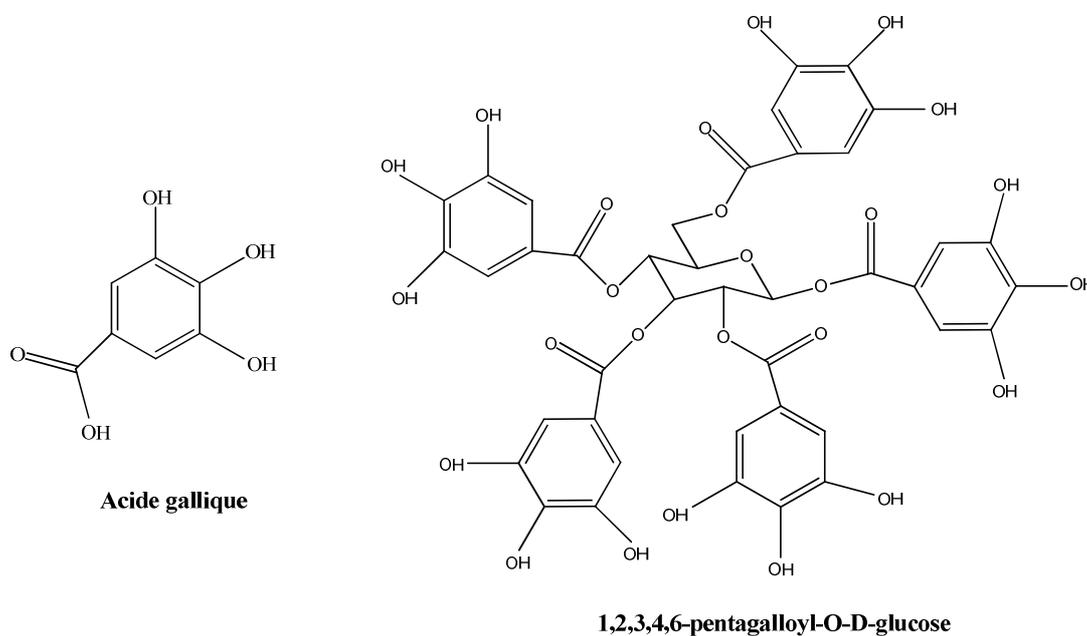


Figure 17 : Structure des tanins hydrolysables (cas d'un tanin gallique) (Bruneton., 2009).

4-4-2/ Tanins condensés (C6-C3-C6)_n

Contrairement aux tanins hydrolysables, les tanins condensés ne sont pas hydrolysables, ils résultent d'une polymérisation de flavan-3-ols (tanins catéchiques) ou bien de flavan-3,4-diols (proanthocyanidines) liés entre eux souvent par des liaisons de type Carbone-Carbone ; C4-C8 ou bien en C4-C6 des unités adjacentes (proanthocyanidines de type B) (fig18) mais lorsque la condensation s'effectue entre C2 et C7, dans ce cas les proanthocyanidines sont dits de type A (Bruneton., 2009).

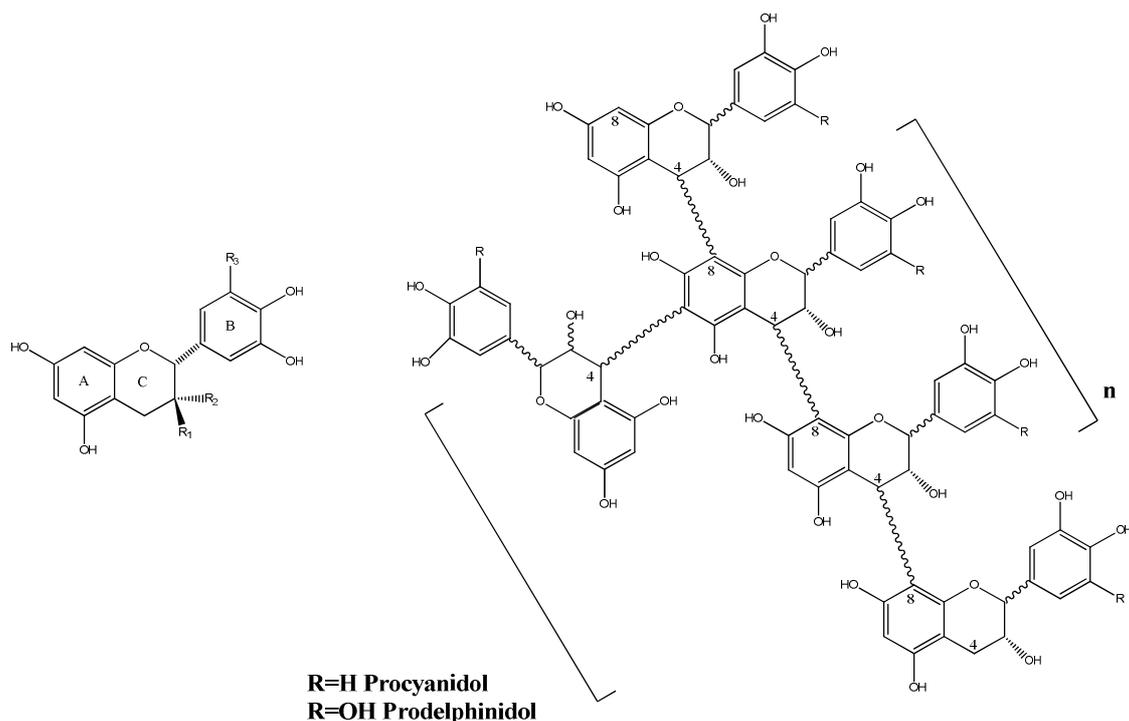


Figure 18 : Structure des tanins condensés (cas de tanins condensés à base de flavan-3-ols) (Bruneton., 2009)

4-5/ Lignanes (C6-C3)₂ et lignines (C6-C3)_n

Les lignanes répondent à une présentation structurale de type (C6-C3)₂, résultant de la condensation de deux unités de phénylpropanes (C6-C3) liés par le carbone 8 (dimère de phénylpropanoïdes) (fig19) (Sainvitu *et al.*, 2012).

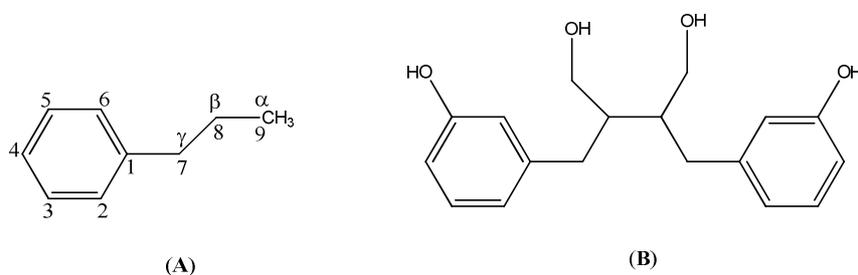


Figure 19 : Structure chimique d'une unité de phénylpropanoïde (C6-C3) (A) et d'un lignane (B) (Sainvitu *et al.*, 2012).

La lignine est un polymère fortement ramifiée d'une structure de type $(C6-C3)_n$ formée par une polymérisation oxydative de trois alcools phénylpropéniques qui sont les alcools *p*-coumarique, coniférique et sinapique (Sakagami *et al.*, 2005) (fig20). La lignine est considérée comme le second polymère le plus abondant après la cellulose, la figure 21 montre la structure d'une lignine (Scalbert et Willamson., 2000)

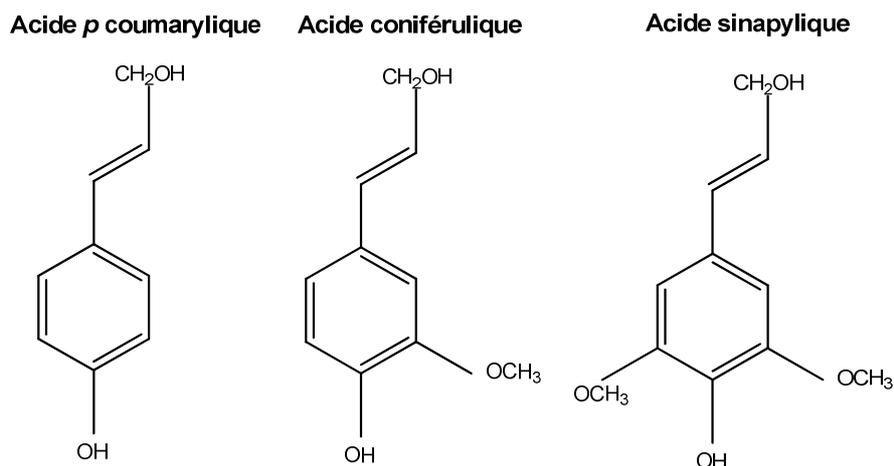


Figure 20 : Principaux constituants de lignine (Scalbert et Willamson., 2000).

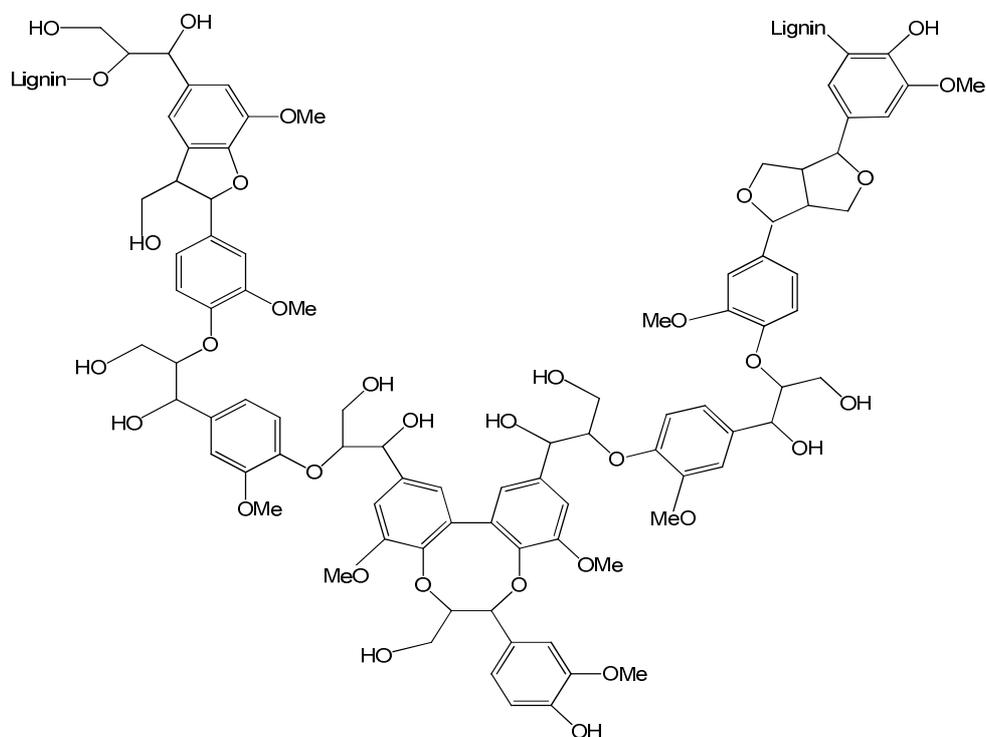


Figure 21: Structure d'une lignine (Scalbert et Willamson., 2000).

*Matériel et
méthodes*

1/ Matériel végétal

Le matériel végétal obtenu de source commerciale est constitué de fruits matures de *Vitis vinifera L*, *Punica granatum L*, *Citrus aurantium L* et *Opuntia ficus-indica L*. Les fruits ont été lavés abondamment avec de l'eau du robinet, rincés à l'eau distillée et séchés à l'air libre. La partie sélectionnée de chacun des fruits (tableau X) a été lyophilisée immédiatement après obtention (Christ Alpha 2-4 LD plus, Osterode am Harz, Allemagne). Les lyophilisats ont été transformés en poudre à l'aide d'un broyeur électrique et stockés à basse température dans des bocaux en verre ambrés et fermés hermétiquement jusqu'à extraction.

Tableau X : Caractérisation du matériel végétal d'étude.

Espèce	Partie végétative	Période d'achat	Parties utilisées
<i>Vitis vinifera L</i> Cultivar, Gros black (Vigne)	Baies (Grappe)	Septembre 2013	Fruit entier avec graines et enveloppe
<i>Punica granatum L</i> (Grenadier)	Baies (Grenade)	Septembre 2013	Fruit sans écorce
<i>Citrus aurantium L var.</i> <i>amara L</i> (Oranger amère)	Baies (Orange amère)	Janvier 2014	Fruit sans écorce
<i>Opuntia ficus-indica L</i> (Figuier de Barbarie)	Baies (Figue de Barbarie)	Septembre 2013	Fruit sans écorce

2/ Méthode d'extraction

Le procédé d'extraction a été réalisé selon la méthode décrite par Babero *et al* (2008) et Ma *et al* (2009). Les poudres des fruits lyophilisés (25 g) ont été extraites par macération par (3x500 ml) de méthanol / eau (70/30) sous agitation magnétique. L'extraction est assistée par ultrasons (Fisher scientific fb 15046, Leicestershire, Angleterre) pendant 30 minutes à une température ambiante, avec renouvellement du solvant chaque 24h. Les extraits combinés et filtrés sur papier filtre ont été concentrés dans un évaporateur rotatif sous vide à une température <40°C (Buchi R-200, Medellin, Colombia). Les solutions aqueuses résiduelles ont été lyophilisées pour fournir des résidus à consistance plus ou moins molles. Ces extraits désignés par extraits lyophilisés des fruits ou ELF, sont stockés à basse température (-25°C) jusqu'à analyse.

3/ Caractérisation chimique des extraits

3-1/ Criblage phytochimique

L'établissement du profil chimique des ELF's (extrait lyophilisé des fruits) a été réalisé par l'utilisation de réactions de caractérisation des principaux groupes de métabolites secondaires (alcaloïdes, flavonoïdes, tanins condensés et hydrolysables, coumarines, saponines, terpénoïdes et stéroïdes) selon des méthodes bien établies.

L'interprétation des résultats des criblages s'est faite selon les qualificatifs suivants :

Présence notable +++, **Présence modérée ++**, **Traces +**, **Absence -**

Après préparation des extraits des ELF's de *Vitis finifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* suite à une infusion de 3 g de poudre de l'échantillon dans 50 ml d'eau distillée bouillante, pendant 30 minutes, les suspensions sont filtrées. Ces filtrats serviront à la caractérisation des réactions de criblage chimique suivantes :

➤ **Réaction de caractérisation des alcaloïdes**

La présence des alcaloïdes dans les extraits des fruits de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* a été caractérisée par le réactif de Dragendroff (Dohou, 2003). Dans un tube à essai, 2 ml d'une solution d'acide chlorhydrique dilué est ajouté à 5 ml d'ELF et quelques gouttes de réactif de Dragendroff. En présence d'alcaloïdes le réactif de Dragendroff donne un précipité rouge brique.

➤ **Réaction de caractérisation des flavonoïdes**

La détection des flavonoïdes dans les extraits des fruits sélectionnés a été faite par la méthode de NaOH (Karumi *et al.*, 2004). Le test consiste à rajouter 1 ml d'une solution de NaOH diluée à 1 ml du filtrat d'ELF, après 3 minutes de réaction l'apparition d'une coloration jaune intense indique l'existence des flavonoïdes, La persistance de la coloration après addition de quelques gouttes d'acide dilué confirme la présence des flavonoïdes.

➤ **Réaction de caractérisation des tanins**

L'addition de quelques gouttes d'une solution aqueuse de trichlorure de fer (FeCl_3 à 2%) à chaque extrait des fruits étudiés permet de détecter la présence ou non des tanins. La couleur vire au brun noir en présence de tanins galliques (tanins hydrolysables) et au bleu verdâtre en présence des tanins catéchiques (tanins condensés) et en noirâtre en présence d'un mélange de tanins condensés et hydrolysables (Dohou, 2003).

➤ **Réaction de caractérisation des coumarines**

La présence des coumarines est révélée suite à l'addition de 0,5 ml d'une solution d'ammoniaque à 25 % à 1 ml du filtrat d'ELF. L'observation d'une fluorescence intense sous UV à 366 nm, indique la présence des coumarines (Rizk, 1982).

➤ **Réaction de caractérisation des saponines**

L'apparition d'une mousse persistante et stable, 15 minutes après agitation de 1 ml du filtrat d'ELF, indique l'existence des saponines (Dohou, 2003 ; Koffi *et al.*, 2009).

➤ **Réaction de caractérisation des triterpènes et stéroïdes**

La mise en évidence de ces noyaux terpéniques met à profil la réaction de Libermann. A 5 mg d'ELF sont additionnés 2 ml de chloroforme, 1 ml d'anhydride acétique dilué et 1 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau rose à rouge indique une génine triterpénique, alors qu'une coloration bleu verdâtre est en faveur d'une génine stéroïdique (Trease et Evans, 1978 ; Bruneton, 2009 ; Koffi *et al.*, 2009).

3-2/ Analyse qualitative des ELF's par CLHP

L'analyse qualitative des extraits des fruits par CLHP utilisant un détecteur UV-VIS a été réalisée au département de chimie analytique, chimiométrie appliquée et modélisation moléculaire de Vrije Universiteit-Bruxelles. Cette analyse a été mise à profil pour mettre en évidence la présence des acides phénoliques et des flavonoïdes dans les ELF de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium*, et *Opuntia ficus-indica*. Des substances témoins ont été utilisées à cet effet.

3-2-1/ Appareillage

Un appareil chromatographique CLHP (Lachrom Merck Hitachi, Allemagne) constitué des d'une pompe L-7100, un UV détecteur L-7400, un système d'injection automatique L-7250, et quatre colonnes couplées de type Chromolith RP-18 Performance (100 mmx4.6mm ID) (Merck, Darmstadt, Allemagne).

3-2-2/ Conditions opératoires

La phase mobile est constituée par un mélange A (Méthanol / acide trifluoroacétique, 0,05%) et B (Eau / acide trifluoroacétique 0,05 %) (Alaerts *et al.*, 2014). L'échantillon dissout dans le méthanol a été filtré à travers un filtre millipore de 0.2 µm afin d'éviter l'endommagement de la colonne et de limiter les interférences dues aux impuretés. La séparation a été réalisée à une température ambiante et à un débit à raison de 1 ml/min avec un gradient de l'éluent A et B pendant 100 minutes selon la composition décrite dans le tableau XI. Le volume d'injection est de 50 µl. Les analyses sont faites en utilisant deux longueurs d'onde 280 nm et à 325 nm. L'identification des pics est faite par comparaison du temps de rétention avec ceux de composés témoins utilisés dans les mêmes conditions. Des standards (20) constitués d'acides phénoliques (7) et des flavonoïdes (13) ont été utilisés pour cette analyse.

Tableau XI : Gradient de solvants utilisé en CLHP analytique.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0-15	5	95
15-55	15	85
55-75	33	67
75-90	50	50
90-100	95	5

Eluant A : méthanol+ acide trifluoroacétique (0.05%), v/v.

Eluant B : eau+ acide trifluoroacétique (0.05%), v/v.

3-3/ Analyses des ELF's par HPLC-UV-VIS-DAD/ESI-MS

Les ELF's de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur UV-

Visible à barrette diode (DAD) et à la spectrométrie de masse (MS) en mode ESI. Cette analyse a été effectuée au département de chimie analytique, chimie appliquée et modélisation moléculaire. Vrije Universiteit-Bruxelles.

3-3-1/ Description des conditions d'analyses

Un appareil AQUITY UPLC I-CLASS system (Waters, Milford, USA) couplé à la fois un détecteur à barrette de diodes (240 et 500 nm) et à un spectromètre de masse (SM). Le SM est un quadripôle (Q) à analyseur de temps de vol (Q-TOF XevoG2-S mass spectrometer, Waters, Milford, USA), équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI) en mode positif et négatif. La tension capillaire est fixée à 3.0 KV, le gaz de désolvatation et de nébulisation utilisé est l'azote à un débit d'écoulement de 800 L/h. La température de la source ESI et celle du gaz de désolvatation ont été fixés à 120°C et 450°C, respectivement. Des chromatogrammes ont été saisis en mode négatif et positif, en utilisant une tension de cône de 40V, un débit de gaz sur le cône de 50L/h avec un balayage des masses entre 100 et 1200 éléments de m/z (tableau XII). Une colonne AQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (Waters corporation) de dimensions (100mmx2,1mmx1,7µm), maintenue à une température de 30°C a été utilisée. La phase mobile est composée d'un mélange de deux solvants : solvant A (eau+acide formique 0,1%) et le solvant B (acétonitrile+acide formique 0,1%) (Tableau XIII). Le gradient d'élution utilisé est représenté dans le tableau XIV. Les traitements des données ont été acquis par un logiciel MASS LYNX. Pour la détection UV, les signaux ont été fixés à 280 nm et à 325 nm pour les acides phénoliques et les flavonoïdes, respectivement. L'identification du contenu en acides phénoliques et en flavonoïdes a été faite sur la base de données de la littérature et par comparaison aux standards.

Tableau XII : Conditions d'analyse par la spectrométrie de masse.

Température de désolvatation	450°C
Température de la source	120°C
Débit de gaz sur le cône	50L/h
Débit de gaz de désolvatation	800L/h
La tension de cône	40V
La tension capillaire	3,0KV
Balayage de masse	100-1200 m/z

Tableau XIII : Conditions d'analyse chromatographique.

Colonne	AQUITY UPLCr BEH C ₁₈
Caractéristiques de la colonne	Longueur : 100 mm Diamètre : 2,1 mm Diamètre des pores : 1,7 µm
Température de la colonne	30°C
Eluant A	Eau+acide formique (0,1%), v/v
Eluant B	Acétonitrile+acide formique (0,1%), v/v
Débit	0,45 ml/min
Volume d'injection	5 µl
Longueur d'onde de détection	240-500 nm

Tableau XIV : Gradient d'élution de la phase mobile.

Temps (min)	Eluant A (%)	Eluant B (%)
0,00	98,00	2,00
20,00	70,00	30,00
25,00	5,00	95,00
25,50	5,00	95,00
26,00	98,00	2,00
30,00	98,00	2,00

Eluant A : eau+acide formique (0,1%), v/v.

Eluant B : acétonitrile+acide formique (0,1%), v/v.

3-4/ Analyses quantitatives par spectrophotométrie (UV-Visible)

3-4-1/ Dosage des phénols totaux (PT)

La teneur en phénols totaux est déterminée par spectrophotométrie UV-Vis, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ces essais sont basés principalement sur la réduction du mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) lors de l'oxydation des phénols dans une solution alcaline en mélange d'oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) qui se traduit par une coloration bleu foncé (Vuorela, 2005).

Pratiquement, 1 ml d'extrait aqueux d'ELF est ajouté à 5 ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué 10 fois par de l'eau distillée. Une solution (4 ml) de carbonate de sodium Na_2CO_3 (0,7 M) est ensuite ajoutée. Après agitation les tubes ont été stockés à l'obscurité pendant 2 heures, après cette période l'absorbance est lue à 765 nm sur un appareil (Spectroscan 60DV UV/Vis spectrophotometer, Biotech Engineering Management Co. Ltd, Chypre). La teneur des phénols totaux est déterminée à partir d'une équation de régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage (voir annexe) établie avec l'acide gallique (0-0,1 mg/ml) et exprimée en milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g extrait) (Adesegun *et al.*, 2007).

La teneur des phénols totaux est calculée par la formule suivante :

$$T=C.V/M$$

T : représente le total des composés polyphénoliques (g Equivalent Acide Gallique/g d'extrait sec ; g GAE/g d'extrait)

C : concentration des phénols totaux, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)

V : le volume de l'extrait (ml)

M : poids de l'extrait sec (g).

3-4-2/ Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes contenus dans les ELF's sont estimés par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (Ayoola *et al.*, 2008). Pratiquement, 1 ml d'une solution éthanolique d' AlCl_3 (2%) a été ajouté à 1 ml de chaque extrait aqueux des fruits étudiés. L'intensité de la couleur est mesurée à la longueur d'onde de 420 nm après 30 minutes d'incubation à une température ambiante (Spectroscan 60DV UV/Vis spectrophotometer, Biotech Engineering Management Co. Ltd, Chypre). Une gamme étalon (voir annexe) à base de quercétine (0-0,1 mg/ml) est également préparée dans les mêmes conditions. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est exprimée en mg équivalents quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g extrait sec).

3-4-3/ Dosage des flavonols totaux

La quantification des flavonols a été réalisée par la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) additionné d'une solution d'acétate de sodium (Oyedemi *et al.*, 2010). Pratiquement, 2 ml d'une solution d'AlCl₃ (2%), et 3 ml d'une solution d'acétate de sodium (50g/l) sont ajoutées à 2 ml d'ELF. Les tubes à essais sont ensuite incubés à 20°C à l'obscurité pendant 2h et demi. l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 440 nm par spectrophotomètre UV-Vis (Spectroscan 60DV UV/Vis spectrophotometer, Biotech Engineering Management Co. Ltd, Chypre). Une gamme étalon de quercétine (0-0,1 mg/ml) a été préparée dans les mêmes conditions afin de quantifier la teneur des flavonols (voir annexe).

3-4-4/ Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés ont été quantifiés par spectrophotométrie UV-VIS (Swain et Hillis., 1959). Pour cela, 2 ml de la solution (Vanilline à 1% avec l'acide sulfurique à 70%) ont été rajouté à 1 ml de la solution (ELF de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica*). L'absorbance du mélange a été mesurée à une longueur d'onde de 500 nm (Spectroscan 60DV UV/Vis spectrophotometer, Biotech Engineering Management Co. Ltd, Chypre) après 15 minutes d'incubation à 20 °C. La teneur des tanins condensés a été calculée selon la formule suivante :

$$T=5.2*10^2*DO*V/P$$

DO : Densité optique à 500 nm

V : Volume d'extrait utilisé (ml)

P : Poids de l'échantillon (g)

3-4-5/ Dosage des tanins hydrolysables

La quantification des tanins hydrolysables contenus dans les ELF des plantes étudiées a été faite par la méthode décrite par Mole et Waterman *in* Gouar, 2011. Pratiquement, 1 ml d'extrait a été rajouté à 3,5 ml du réactif au trichlorure ferrique [FeCl₃ (0,01 M), HCl (0,001M)]. Après une période de 15 secondes, l'absorbance est mesurée à 660 nm (Spectroscan 60DV UV/Vis spectrophotometer, Biotech Engineering Management Co. Ltd, Chypre). La teneur des tanins hydrolysables a été calculée selon la formule suivante :

$$T = DO * M * V / E_{\text{mole}} * P$$

DO : Densité optique lue à 660 nm

E_{mole} : 2169 de l'acide gallique (constante exprimée en mole)

M : 300

V : Volume d'extrait utilisé (ml)

P : Poids de l'échantillon (g)

4/ Evaluation des activités biologiques

Différents essais pour mesurer le potentiel antioxydant des extraits ont été utilisés, à savoir DPPH•, ABTS^{•+}, FRAP, ORAC, NO•, TBARS.

4-1/ Activité antioxydante au DPPH

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante des différents extraits en raison de sa capacité à produire des radicaux libres stables et la simplicité de l'analyse (Benhammou *et al.*, 2007). La présence des radicaux libres DPPH• dans la solution donne lieu à une coloration violette foncée à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Benhammou *et al.*, 2007). Les antioxydants réduisent le DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), par conséquent la couleur vire du violet vers le jaune (fig22) (Thomas., 2011). Ainsi, l'intensité de la couleur violette est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu.

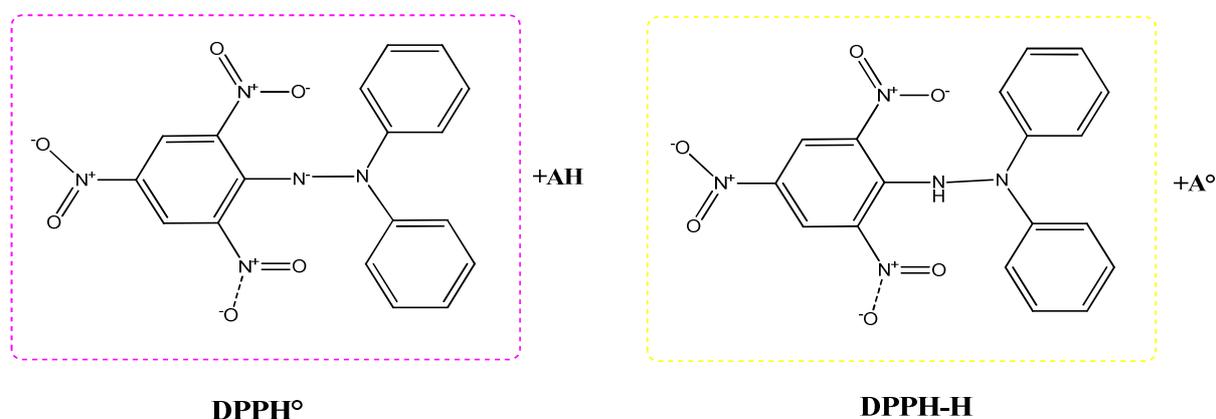


Figure 22: Mécanisme réactionnel entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (Thomas., 2011)

L'effet de chaque extrait est mesuré par la procédure décrite par Talukder *et al* (2013). Pratiquement, 2 ml de différentes concentrations des ELF (0-1 mg/ml) sont ajoutés à 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%), puis le mélange est laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 minutes. La lecture de l'absorbance de différentes solutions est effectuée à 520 nm. Les résultats sont comparés au contrôle négatif (solution de DPPH• en absence de l'extrait). Le pourcentage d'inhibition de l'extrait est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition}_{\text{DPPH}} (\text{I} \%) = [(A_0 - A_T) / A_0] * 100$$

A_0 : Absorbance du contrôle négatif (solution de DPPH• en absence de l'extrait)

A_T : Absorbance du test (solution du DPPH en présence de l'extrait)

Tous les tests sont répétés trois fois ($n=3$). Les valeurs des IC_{50} (mg/ml) (signifiant les concentrations nécessaires des extraits pour piéger 50% des radicaux DPPH•) sont exprimées en moyennes \pm écarts types. L'activité antioxydante des extraits est comparée au Trolox (antioxydant de référence).

4-2/ Activité antioxydante à l'ABTS

La présente méthode est basée sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical cation $ABTS^{*+}$ ou l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) en ABTS (Bekir *et al.*, 2013). Ce dernier est quantifié par spectrophotométrie entre 600 et 750 nm. L'oxydant $ABTS^{*+}$ est un produit d'oxydation en présence de persulfate de potassium.

Pratiquement, un stock d'une solution mère d'ABTS (7 mM, pH= 7,4) est traité avec 2,5 mM de persulfate de potassium. Le mélange est laissé à une température ambiante, à l'obscurité pendant 16 h pour donner une coloration bleu verdâtre. La solution est ensuite diluée dans l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

Un volume (20 μ l) de différentes concentrations de l'extrait [(0-0,1 mg/ml) pour ELF de *Vitis vinifera* et (0-1 mg/ml) pour ELF de *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica*] est mélangé avec 180 μ l de la solution d'ABTS fraîchement préparée. Après 6 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 734 nm (Shimadzu UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu corporation Kyoto, Japan) (Bekir *et al.*, 2013). Le pourcentage d'inhibition des extraits est déduit de l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition}_{\text{ABTS}} (\text{I} \%) = [(A_0 - A_T) / A_0] * 100$$

A_0 : Absorbance du contrôle négatif (solution d'ABTS en absence de l'extrait)

A_T : Absorbance du test (solution d'ABTS en présence de l'extrait)

Tous les tests sont répétés trois fois ($n=3$). Les valeurs des IC_{50} (mg/ml) (signifiant les concentrations nécessaires des extraits pour piéger 50% des radicaux $ABTS^{\bullet+}$.) sont exprimées en moyennes \pm écarts types. L'activité antioxydante des extraits est comparée au Trolox (antioxydant de référence).

4-3/ Activité antioxydante au FRAP

Le pouvoir réducteur des extraits étudiés correspond à la capacité de leurs composés à donner des électrons et par conséquent à participer aux réactions de réduction des ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} (fig23) (Thomas., 2011). La capacité totale en antioxydants de chaque extrait a été déterminée selon le protocole expérimental décrit par Boulekbache Makhoulouf *et al* (2013).

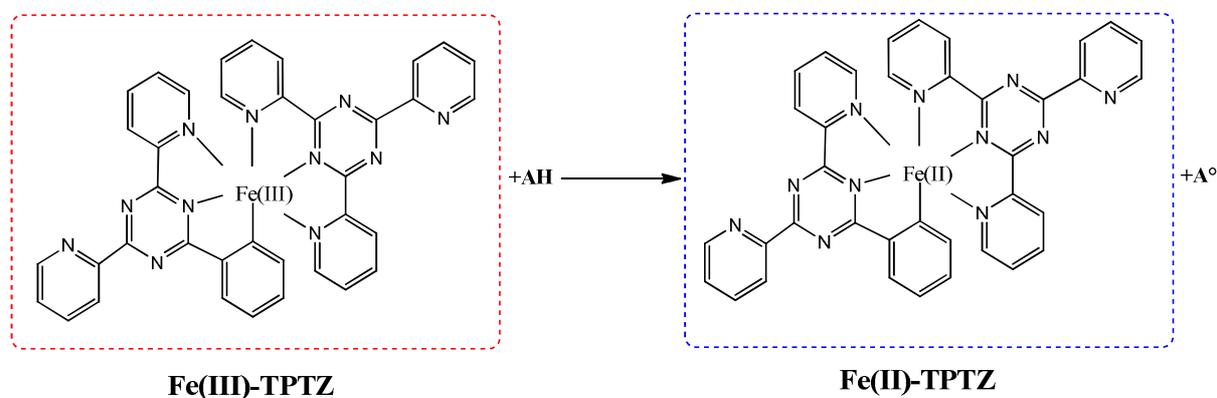


Figure 23 : Mécanisme réactionnel intervenant entre le complexe tripyridyltriazine ferrique Fe(III)-TPTZ et un antioxydant (AH) (Thomas., 2011).

Pratiquement, 1 ml d'extrait de différentes concentrations des ELF (0-1 mg/ml), est mélangé à 1 ml d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH6,6) et 1 ml de ferricyanure de potassium $[K_3Fe(CN)_6]$ (1%). Le mélange est incubé à 50 °C pendant 20 minutes, ensuite 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) a été ajouté. Le mélange est ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes à une température ambiante. A 1.5 ml du surnageant sont additionnés 1.5 ml d'eau

distillée et 150 µl de trichlorure de fer (0,1%). La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm (Spectroscan 60DV UV/Vis spectrophotometer, Biotech Engineering Management Co. Ltd, Chypre) contre un blanc (eau distillée). L'EC₅₀ signifiant la concentration effective d'un extrait avec laquelle l'absorbance est égale à 0,5 est déduite à partir de la courbe de réduction du fer ferrique Fe⁺³ en fer ferreux Fe⁺² en présence des ELF's de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica*.

Le pouvoir réducteur des ELF's sont comparés à ceux de trolox. Le test est répété trois fois pour chaque concentration ($n=3$). Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes EC₅₀ ± écarts types.

4-4/ Activité antioxydante ORAC

La méthode ORAC est une analyse spectrofluorimétrique, qui permet de déterminer le pouvoir antioxydant d'une substance en solution par comparaison à un analogue de la vitamine E (trolox). Le principe de la méthode est basé sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine (protéine fluorescente extrêmement sensible au stress oxydatif) en présence d'AAHP (2,2'-azobis-2-aminopropane dihydrochloride), un radical libre stable, donneur de radicaux peroxydes. La cinétique de dégradation de la fluorescéine est directement liée à la concentration de radicaux libres présents dans le milieu réactionnel ; La présence des antioxydants empêche ou ralentit la décomposition de la fluorescéine, l'intensité de la fluorescence quantifiée à l'aide d'un fluorimètre (VICTOR³ 1420: Perkin-Elmer, USA), est calculée par l'aire sous la courbe en fonction du temps (fig24).

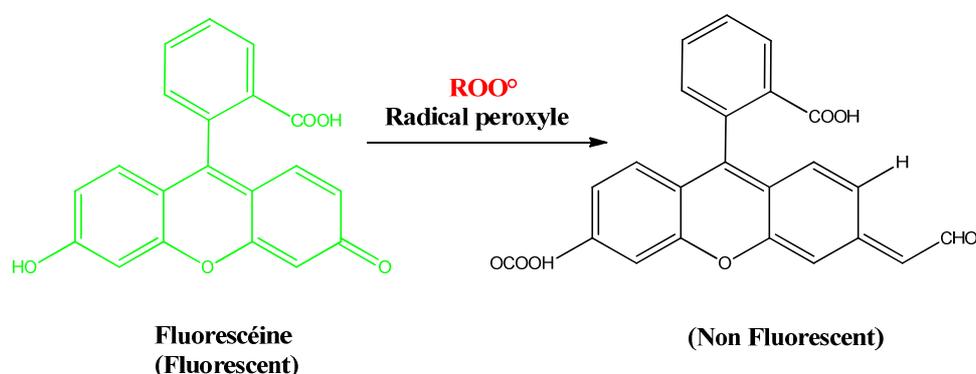


Figure 24 : Mécanisme réactionnel de la fluorescéine en présence des radicaux libres (Ben Yakhlaf., 2008)

Pratiquement, le dosage est effectué dans des plaques de fluorescence en polypropylène (Corning Scientific, Corning, NY) à parois noires à 96 puits (Dejian *et al*, 2002). Dans chaque puits, est placé un volume (25 µl) de différentes concentrations de l'extrait ELF (6,25, 12,5, 25,0, 50,0, 100 µM) préparés dans un tampon phosphate (75 mM, pH 7.4). Après addition de 150 µl de fluorescéine (8,16x10⁻⁵ mM) à chaque puits, l'incubation de la plaque est faite à une température de 37°C et à l'obscurité pendant une période de 10 minutes. Le trolox utilisé comme contrôle positif est préparé aux mêmes concentrations que les extraits étudiés, et incubés dans les mêmes conditions. Après la période d'incubation, toutes les plaques sont placées immédiatement dans un fluorimètre chauffé à 37°C (VICTOR³ 1420: Perkin-Elmer, USA). La fluorescence est lue à un intervalle d'une minute, pendant 40 minutes, aux longueurs d'onde d'excitation (485 nm) et d'émission (520 nm). Les mesures sont répétées trois fois (*n*=3).

Le pouvoir antioxydant exprimé en µM de trolox équivalent par gram d'extrait (le trolox est utilisé comme un antioxydant purifié qui permet l'étalonnage), est déduit de l'équation suivante :

$$\text{Valeur relative d'ORAC} = [(AUC_{\text{échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{Blanc}})] \times (C_{\text{Trolox}} * k)$$

$$AUC = 0.5 + f_1/f_0 + \dots + f_i/f_0 + \dots + f_{34}/f_0 + (f_{40}/f_0)$$

*f*₀ = fluorescence initiale enregistrée à temps 0 ; *f*_{*i*} = fluorescence enregistrée à temps *i*.

*C*_{Trolox} : la concentration du trolox

K : facteur de dilution

4-5/ Activité antioxydante au TBARS

Les ELF des plantes étudiées ont été évalués pour leur effet inhibiteur de la peroxydation lipidique selon la méthode de substances réactives de l'acide thiobarbuturique (Thiobarbituric Acid Reactive Substances ou TBARS) décrit par Okoh *et al* (2014).

En présence d'agent oxydant, les lipides contenus dans un substrat (jaune d'œuf) vont se transformer en malonaldéhyde (MDA), un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés. Deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) réagissent avec une molécule de malonaldéhyde (MDA) pour former un composé coloré rouge qui absorbe autour de 532-535 nm (fig25). La mesure de l'absorbance de ce composé

(TBRAS ou substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique) permet donc de déterminer l'importance de la dégradation de lipides par des radicaux libres (Nadal., 2010).

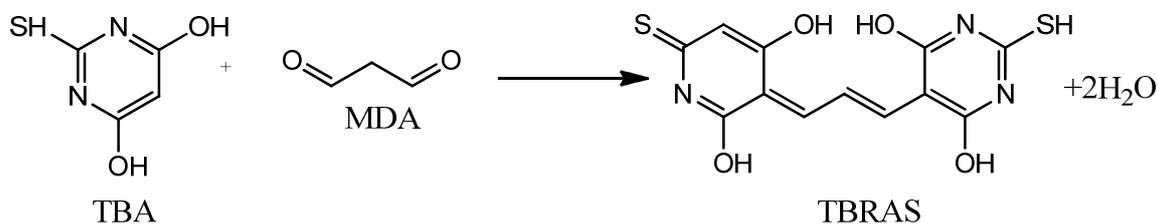


Figure 25: Principe de formation des produits de la peroxydation lipidique (TBARS) (Nadal., 2010).

Pratiquement, un volume (500µl) d'ELF de différentes concentrations (0-2 mg/ml) et 250µl de sulfate ferrique (0,07 M) sont additionnés à 500µl d'homogénat de jaune d'œuf (10%) préalablement préparé dans une solution tampon phosphatée saline (0,2M, pH7.4). Le mélange réactionnel est incubé à une température ambiante pendant 30 minutes. Après induction de la peroxydation lipidique, 1.5 ml d'acide acétique (20%) (pH ajusté à 3,5 avec NaOH), 1,5 ml d'acide thiobarbiturique (0,8%) préparé dans le sodium dodecyl de sulfate (1,1%) et 500µl d'acide trichloroacétique (20%) sont rajoutés. Le mélange est chauffé à 95°C pendant 60 minutes, refroidis puis additionné de 3 ml de n-butanol. Après centrifugation pendant 10 minutes à 3000 rpm, la densité optique du surnageant est lue au spectrophotomètre à 532 nm contre un blanc (eau distillée) (Shimadzu UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu corporation Kyoto, Japan).

La capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique (CIPL), exprimée en pourcentage, et calculée selon la formule suivante :

$$\text{CIPL (\%)} = [(\text{DO}_{\text{Contrôle}} - \text{DO}_{\text{Echantillon}}) / \text{DO}_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

DO_{Contrôle} : absorbance du contrôle (solution en absence d'extrait)

DO_{Echantillon} : absorbance du test (solution en présence d'extrait)

Le mélange réactionnel relatif au contrôle est constitué de tous les réactifs à l'exception de l'extrait ELF testé. La capacité inhibitrice de la peroxydation des extraits est comparée à celle

de l'acide ascorbique (0-0,1 mg/ml) utilisé comme substance de référence. Tous les tests ont été répétés trois fois ($n=3$) est comparé à la substance de référence (acide ascorbique).

4-6/ Activité antioxydante à l'oxyde nitrique (NO•)

Ce test utilise le réactif de Griess (Tyaghi *et al.*, 2010), en faisant réagir le nitrite (NO_2^-) avec la sulfanilamide et le n-naphtyl éthylène diamine en condition acide. Il se produit alors un dérivé azoté coloré qui absorbe à 520 nm.

La réaction de Griess a été rapportée pour la première fois en 1879, est une réaction de diazotation en deux étapes : Le N_2O_3 généré par l'acidification du NO_2^- est un dérivé du NO• ayant un grand potentiel nitrosant. Il réagit avec la sulfanilamide pour produire un ion diazonium qui permet le couplage au N-(1-naphtyl) éthylène diamine dihydrochlorure (NEDD). Le produit ainsi formé est un chromophore stable qui absorbe fortement à 520 nm (fig26). L'absorbance est donc linéairement proportionnelle à la quantité de NO• dans l'échantillon (Gagné., 2008).

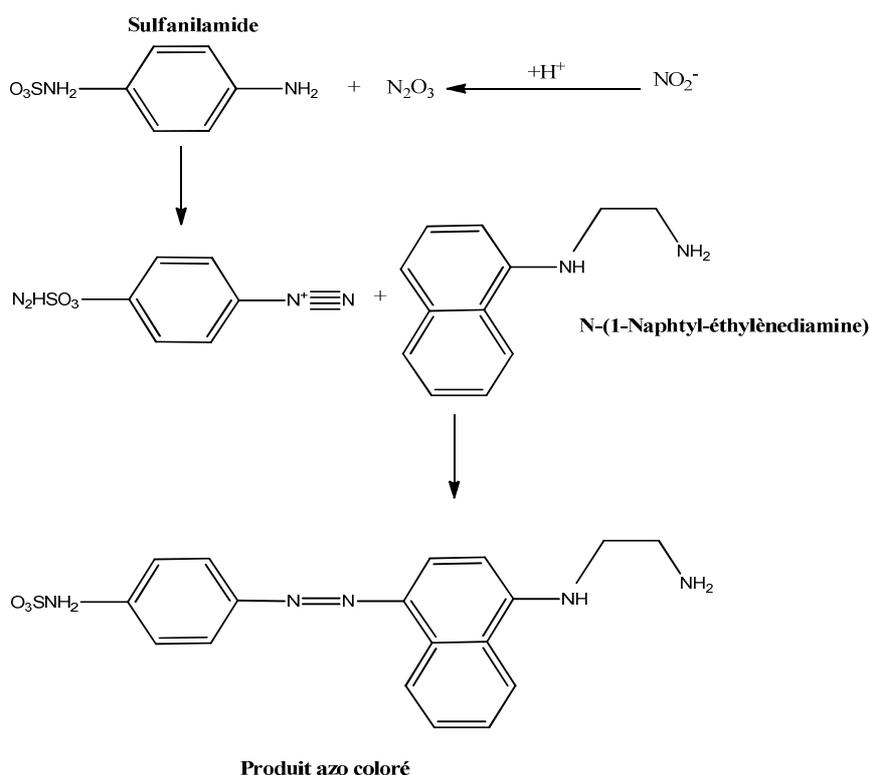


Figure 26 : Principe de détection des radicaux d'oxyde nitrique par le réactif de Griess (Gagné., 2008).

Le mélange réactionnel contient 2 ml de nitroprusside (SNP) (10 mM), 500µl d'une solution tampon saline phosphatée (0,2M, pH 7,4) et 500 µl de l'extrait ELF de différentes concentrations (0-2 mg/ml). Après incubation à 25°C pendant 25 minutes, 1ml du réactif de Griess (33% d'acide sulfanilique dans 20% d'acide acétique glacial, incubé à une température ambiante pendant 5 minutes) et 1 ml de réactif de n-naphtyl éthylène diamine (NED) (0,1%) ont été rajouté à 1 ml du mélange réactionnel. Le mélange est alors incubé à l'abri de la lumière pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée contre un blanc (eau distillée) à 532 nm (Shimadzu UV-1800 spectrophotometer, Shimadzu corporation Kyoto, Japan). L'activité de piégeage de l'oxyde nitrique (NO•) est évaluée selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(A_1 - A_2) / A_2] \times 100$$

A₁ : Absorbance sans extrait

A₂ : Absorbance avec extrait

Le mélange réactionnel relatif au contrôle est constitué de tous les réactifs à l'exception de l'extrait ELF testé. Le pourcentage d'inhibition des extraits ELF est comparé à celui de l'acide ascorbique (0-1 mg/ml) utilisé comme substance de référence. Tous les tests ont été répétés trois fois ($n=3$) est comparé à la substance de référence (acide ascorbique).

4-7/ Activité cytotoxique sur les larves d'*Artemia salina*

Artemia salina est une espèce de crustacées d'eau salée de la famille des artemidae. Le test de toxicité des larves d'*Artemia salina* a été proposé comme test préliminaire pour évaluer le seuil de toxicité (cytotoxicité) d'une substance donnée (Toé *et al*, 2005).

4-7-1/ Préparation d'*Artemia salina*

Des œufs d'*Artemia salina* sont obtenus d'une source commerciale. Les larves de crevette sont obtenues après une incubation de 48 heures dans l'eau de mer recomposée d'une salinité de 25 g/l, sous une agitation continue et à une température entre 25 et 30 °C (Toé *et al*, 2005). Afin de permettre une homogénéisation et une favorisation de l'éclosion à une

température ambiante de laboratoire qui varie entre 25 et 30°C, une lumière artificielle est aussi importante afin de favoriser un bon rendement des larves.

4-7-2/ Préparation de l'échantillon

A partir d'une solution mère de l'extrait ELF, une gamme de dilution a été réalisée (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, et 100 µg/ml).

4-7-3/ Activité cytotoxique

Pour ce test des plaques multi puits stériles avec couvercle (CELLULAR[®] Greiner Bio-one, France) ont été utilisées (fig27). Dans chaque puits 10 larves de crevettes sont transférés à l'aide d'une pipette. L'extrait ELF reconstitué dans de l'eau distillée est placé dans chacun des puits (à raison de trois puits pour chaque concentration) et le volume est ajusté à 3ml par de l'eau saline reconstituée. Pour chaque extrait ELF, quatre concentrations (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, et 100 µg/ml) ont été ainsi testés. Le contrôle est constitué d'eau saline sans ajout d'extrait. Une solution de sulfate de cuivre est utilisée comme témoin.

L'ensemble est incubé pendant 24 heures à une température ambiante du laboratoire. Après incubation, tous les puits ont été examinés et le nombre des larves survivantes dans chaque puits a été déterminé. Les larves sans mouvements pendant au moins 10 secondes et ne répondant pas aux excitations lumineuses sont comptabilisées comme mortes (Manasathien *et al*, 2012).

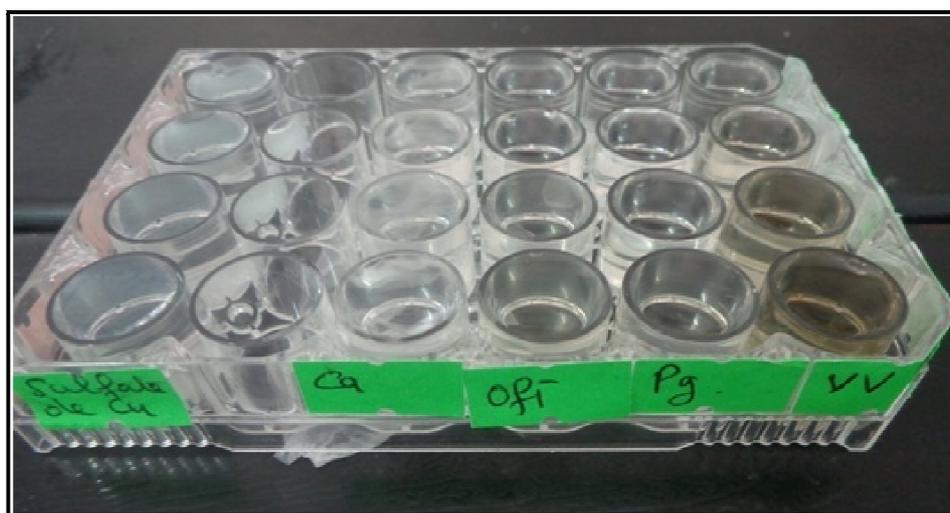


Figure 27 : Plaque de 24 puits utilisée dans le test de toxicité larvaire.

Le pourcentage de mortalité des larves après 24 heures, est déterminé selon l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage de mortalité (\%)} = [1 - (A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

A₁ : moyenne des larves en absence d'extrait

A₂ : moyenne des larves en présence d'extrait

La concentration létale CL₅₀ est déduite à partir des courbes de pourcentage de mortalité en fonction des concentrations. Selon les travaux de Mousseux plusieurs seuils de toxicité sont distingués selon la valeur de la concentration létale. Seules les CL₅₀ < 10 µg/ml sont déclarées doués d'un potentiel cytotoxique (tableau XV).

Tableau XV : Estimation de la toxicité (Mousseux, 1995).

CL ₅₀	Toxicité
CL ₅₀ ≥ 100 µg/ml	-
100 µg/ml > CL ₅₀ ≥ 50 µg/ml	+
50 µg/ml > CL ₅₀ ≥ 10 µg/ml	++
CL ₅₀ < 10 µg/ml	+++

4-8/ Etude de la toxicité aiguë chez la souris

4-8-1/ Matériel animal

L'étude expérimentale utilisée pour évaluer la toxicité aiguë des ELF de *Vitis vinifera*, et *Punica granatum* est réalisée sur des souris blanches de sexe mâle, *Albinos* pesant entre 20 et 35 g et âgées de 4 à 8 semaines. Les animaux proviennent de l'institut Pasteur d'Alger, et sont acclimatés au sein du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie (INSV-UC1, Constantine). Les souris sont maintenues dans des cages en plastique transparentes et aérées, avec accès libre à une alimentation standard pour souris. Les animaux sont soumis à une alternance naturelle du jour et de nuit et maintenues à une température de laboratoire.

Les animaux sont acclimatés pendant 72 heures, et privés de nourritures 24 heures avant l'expérience.

4-8-2/ Détermination de la toxicité aiguë des extraits par voie orale (*Per os*)

Après avoir soumis les animaux à jeun pendant 24 heures, différentes concentrations des ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* sont administrés par voie orale (*per os*) avec une sonde à gavage. Le test de toxicité est réalisé selon la méthode de Nene *et al* (2008) modifiée comme suit :

Chaque lot ($n=6$) reçoit une seule fois par gavage un volume de 0,5 ml de différentes concentrations des ELF (500, 2500, 5000 et 10000 mg/kg). Le lot contrôle recevant de l'eau distillé sans ajout des extraits.

Les souris traitées sont gardées sous observation, durant lesquels on note les variations de poids, de mortalité et toutes modifications physiques et comportementales. Les observations ont été faites pendant chaque heure, pendant le premier jour et quotidiennement jusqu'à 14^{ème} jours. A la fin de l'expérience, le nombre des animaux morts est exprimé en pourcentage (pourcentage de mortalité). Les animaux restant sont sacrifiés et examinés pour une éventuelle altération. La toxicité des ELF a été déterminée par la dose létale 50 (DL₅₀).

4-9/ Activité analgésique des ELF

Le principe de cette activité consiste à déterminer l'action inhibitrice des extraits sur la douleur provoquée chez l'animal. Cette douleur peut être induite par la chaleur ou par injection d'une substance chimique (Shankar Uma *et al*, 2010). Dans cette étude trois tests ont été utilisés :

i)-Le test de la plaque chauffante et l'immersion de la queue ;

ii)-Le test de torsion induite par l'acide acétique.

Trois doses (1,0, 2,0, 3,0 g/kg) d'ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* sont administrés par gavage intra-gastrique (*per os*) aux souris réparties au hasard en cinq lots pour chaque test, chaque lot se compose de six souris. Le lot contrôle positif reçoit l'acide acétyle salicylique à raison de 0,1 g/kg et un lot témoin recevant par voie intra-gastrique (*per os*) de l'eau distillée. Les animaux ont été préalablement mis à jeun de 18 heures avec accès libre à l'eau avant l'expérimentation.

4-9-1/ Test de torsion

Une injection intra-péritonéale (*ip*) de l'acide acétique à 1% a été faite une heure après le traitement par les extraits ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* à différentes doses, selon une méthodologie décrite précédemment (Koster *et al*, 1959 ; Taber *et al*, 1969 ; Singh *et al*,

1996). Après un temps de latence de cinq minutes environ, le nombre des crampes est comptabilisé pendant 20 minutes après injection de l'acide acétique. Le syndrome douloureux se traduit par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale appelés crampes abdominales (fig28) (Sanogo *et al*, 2006 ; Kouakou *et al*, 2010).



Figure 28 : Mouvements d'étirement de la patte postérieure et torsion de la musculature dorso-abdominale (crampes abdominales).

Des lots homogènes de souris, en nombre de 6 dans chaque lot, ont été traités comme suit :

- Trois lots ont été traités par chacune des doses suivantes des ELFs : 1, 2 et 3 g/kg ;
- Un lot traité par l'acide acétyle salicylique (0,1 g/kg) ;
- Un lot contrôle recevant que de l'eau distillée.

L'activité analgésique est exprimée en pourcentage d'inhibition de la douleur. Celui-ci est déduit de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = (N_{\text{témoins}} - N_{\text{traité}}) / N_{\text{témoins}} \times 100$$

$N_{\text{témoins}}$: nombre des crampes chez le groupe témoin non traité.

$N_{\text{traité}}$: nombre de crampes chez le groupe traité par les ELF de *Vitis vinifera* ou *Punica granatum* ou par l'acide acétyle salicylique.

Les pourcentages d'inhibition sont exprimés en valeurs moyennes \pm écart type ($n=6$). Les groupes traités par les ELF's ou par l'acide acétyle salicylique sont comparés par rapport aux groupes contrôles utilisant le test de *Tukey HSD*. La valeur $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

4-9-2/ Test de la plaque chauffante

Le principe de ce test consiste à réduire par l'administration des ELF's testés la douleur provoquée chez des souris déposées sur une plaque chauffante (Naveed *et al*, 2012). Après une heure de traitement par les ELF's de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* à différentes doses ou par l'acide acétyle salicylique comme témoin, les animaux sont déposés sur la surface d'une plaque chauffante maintenue à une température de 55°C (fig29). Le temps de réaction des souris comptabilisé en secondes correspond à l'intervalle entre le moment où la souris rentre en contact avec la plaque chauffante et le moment où elle réagit (sursaut, léchage de pattes).

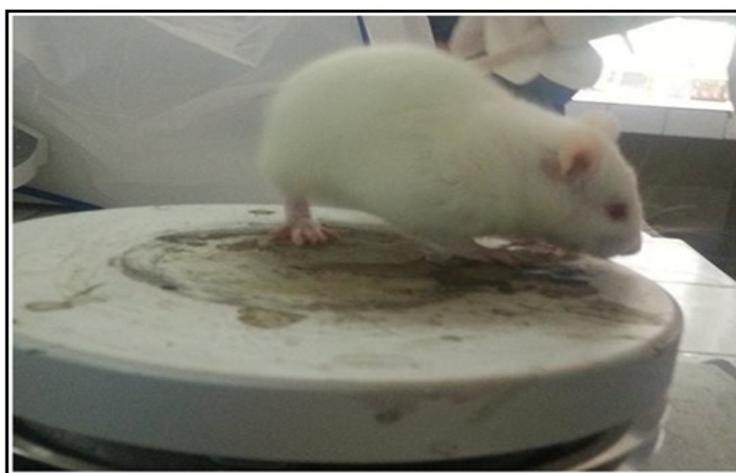


Figure 29: Activité analgésique centrale par le test de la plaque chauffante.

Des lots homogènes de souris, en nombre de 6 dans chaque lot, ont été traités comme suit :

- Trois lots ont été traités par chacune des doses suivantes des ELF's : 1, 2 et 3 g/kg ;
- Un lot traité par l'acide acétyle salicylique (0,1 g/kg) ;
- Un lot contrôle recevant que de l'eau distillée.

Le temps de réaction est exprimé en moyennes \pm écarts types pour chacun des lots. La signification statistique entre les groupes a été traitée par le test de *Tukey HSD*. La valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

4-9-3/ Test d'immersion de la queue

Le principe de ce test consiste à réduire par les ELF's étudiés la douleur provoquée suite à l'immersion de la queue d'une souris dans de l'eau chaude (fig30) (Hoque *et al*, 2011). Après une heure de traitement des souris par les ELF's de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* aux différentes doses et le traitement par l'acide acétyle salicylique, la queue de chaque souris est laissée immerger dans de l'eau chaude maintenue à 55°C.



Figure 30 : Activité analgésique centrale par le test d'immersion de la queue.

Des lots homogènes de souris, en nombre de 6 dans chaque lot, ont été traités comme suit :

- Trois lots ont été traités par chacune des doses suivantes des ELF's : 1, 2 et 3 g/kg ;
- Un lot traité par l'acide acétyle salicylique (0,1 mg/kg) ;
- Un lot contrôle recevant que de l'eau distillée.

Le temps de réaction est exprimé en moyennes \pm écarts types pour chacun des lots. La signification statistique entre les groupes a été traitée par le test de *Tukey HSD*. La valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

4-10/ Activité cicatrisante

L'activité cicatrisante des ELF's a été évaluée sur des brûlures et des plaies pratiquées chez les lapins *albinos*, mâles de poids homogène selon des procédures décrites précédemment (Bensegueni *et al*, 2007 ; Farnood *et al*, 2012).

Un nombre de six plaies ou de brûlures ont été pratiqués sur le même animal, chaque lapin reçoit un des traitements suivants :

- ELF de *Vitis vinifera* ou *Punica granatum* à la dose de 250 mg.
- Une crème cicatrisante Cicatryl Bio[®] à la dose de 250 mg.

Un lapin avec plaies ou brûlures, sans traitement est utilisé comme contrôle.

4-10-1/ Test d'excision

Récemment, de nombreuses recherches ont été effectuées afin d'évaluer l'activité cicatrisante des extraits sur des plaies d'excision chez des lapins. Les animaux sont anesthésiés par une injection intramusculaire de chlorhydrate de kétamine à raison de 15 mg/kg, l'anesthésie est complétée par 5 mg/kg de diazépam localement sur le lieu d'excision. Un lambeau de peau de 17 mm environ est excisé (Bensegueni *et al*, 2007). Le pansement des plaies a été fait tous les jours en raison d'une application par jour avec une quantité précise des extraits testés et de pommade jusqu'à guérison complète.

Le pourcentage de cicatrisation des plaies d'excision des différents lots est calculé tous les trois jours, selon l'équation suivante :

$$\text{Contraction de la plaie (\%)} = [(T_i - T_j) / T_i] \times 100$$

T_i : taille de la plaie initiale

T_j : taille de la plaie du jour spécifique

Les moyennes de pourcentage de contraction des plaies sont données en valeurs moyennes ± écart types ($n=6$). La comparaison entre les groupes a été traitée par le test de *Tukey HSD*. La valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

4-10-2/ Test de brûlure

Pour ce test nous avons adopté la technique qui consiste à effectuer des brûlures par la plaque chauffante. Le protocole suivi est celui décrit par Farnood *et al* (2012), au jour zéro les lapins sont anesthésiés par une injection intramusculaire de 50 mg/kg de chlorhydrate de kétamine complété par 5 mg/kg de diazépam. Après épilation et rasage, six plaies ont été réalisées sur le dos de chaque lapin de part et d'autre de la colonne dorsolombaire, en maintenant un cylindre métallique chauffé à 170 °C sur la peau de l'animal pendant 10 secondes sans exercer aucune force. Juste après l'induction des brûlures, les ELF's testés sont appliqués par voie topique à la zone brûlée.

La fréquence d'application des crèmes sur les plaies est fixée à une application par jour d'une façon quotidienne jusqu'à guérison complète. Une observation macroscopique est effectuée avant chaque application, le pourcentage de cicatrisation des plaies est calculé chaque trois jours par rapport à la taille initiale de la plaie selon l'équation suivante :

$$\text{Contraction de la plaie (\%)} = [(T_i - T_j) / T_i] \times 100$$

T_i : taille de la plaie initiale

T_j : taille de la plaie du jour spécifique

Les moyennes de pourcentage de contraction des plaies sont données en valeurs moyennes ± écart types ($n=6$). La comparaison entre les groupes a été traitée par le test de *Tukey HSD*. La valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

4-11/ Evaluation de l'activité hyperlipidémiant des extraits

Cette activité a été pratiquée sur un groupe de souris male, *suisse albinos*, adultes (10-12 semaines), selon le protocole précédemment décrit (Osorio-Esquivel *et al*, 2012). Tous les lots de souris ont reçu par gavage à l'aide d'une sonde un volume de 0,5 ml/kg de l'huile de tournesol hydrogénée par jour pendant 7 jours avant le début des traitements.

Des lots de souris (six par lot) ont été constitués et traités comme suit :

Lot I : souris sans traitement, n'ayant pas reçu l'huile de tournesol (groupe contrôle négatif).

Lot II : souris traitées uniquement par l'huile de tournesol hydrogénée (0,5 ml/kg/jour) (groupe contrôle positif).

Lots III et IV : souris recevant *per os* (à l'aide d'une sonde) des ELFs de *Vitis vinifera* à raison de 0,1 g/kg et 0,5 g/kg respectivement.

Lot V et VI : souris recevant *per os* (à l'aide d'une sonde) des ELF de *Punica granatum* à raison de 0,1 g/kg et 0,5 g/kg respectivement.

Après une semaine de traitement, un prélèvement sanguin a été réalisé à partir de la veine faciale. Le plasma obtenu après centrifugation a été conservé à une basse température de -25°C en attendant les analyses biochimiques.

Analyse des paramètres biochimiques : un bilan lipidique concernant les paramètres lipidiques (HDL, LDL, Cholestérol) a été effectué au service de biochimie (CHU de Constantine).

Les paramètres biochimiques sont donnés en valeurs moyennes \pm écart types ($n=6$). La comparaison entre les groupes a été traitée par le test de *Tukey HSD*. La valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

*Résultats et
discussion*

1/ Rendement des ELF's (teneur en matière extractible)

L'extraction hydroalcoolique des fruits des quatre espèces a permis d'obtenir les ELF's avec les rendements suivants (voir tableau).

Tableau XVI : Rapports d'extraction des ELF's.

Espèces	Masse des fruits lyophilisés (g)	Masse de l'extrait final (g)	Rapport d'extraction (DER)*
<i>Vitis vinifera</i>	25	1,25	20 : 1
<i>Punica granatum</i>	25	1,70	14-15 : 1
<i>Citrus aurantium</i>	25	1,48	16-17 : 1
<i>Opuntia ficus-indica</i>	25	1,85	13-14 : 1

DER : Drug Extract Ratio ou rapport d'extraction exprimé par rapport à la drogue étudiée.

A travers les valeurs des rapports d'extraction, on peut remarquer que les extraits d'*Opuntia ficus-indica* et de *Punica granatum* sont plus riches en matière extractible relativement aux autres extraits.

2/Caractérisation chimique des ELF's

2-1/ Criblage phytochimique

Les résultats de l'analyse phytochimique des ELF's de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* sont décrits dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Résultats du criblage phytochimique des ELF's.

Groupe de métabolites	Extrait lyophilisé des fruits			
	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Punica granatum</i>	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Opuntia ficus indica</i>
Alcaloïdes	-	-	-	-
Flavonoïdes	++++	++++	++	+
Tanins condensé	+++	++	+	-
Tanins hydrolysables	-	+++	-	-
Coumarines	+	+++	++	++
Saponines	+	+	+	+
Terpénoïdes	+++	-	-	-
Stéroïdes	+++	+++	-	-

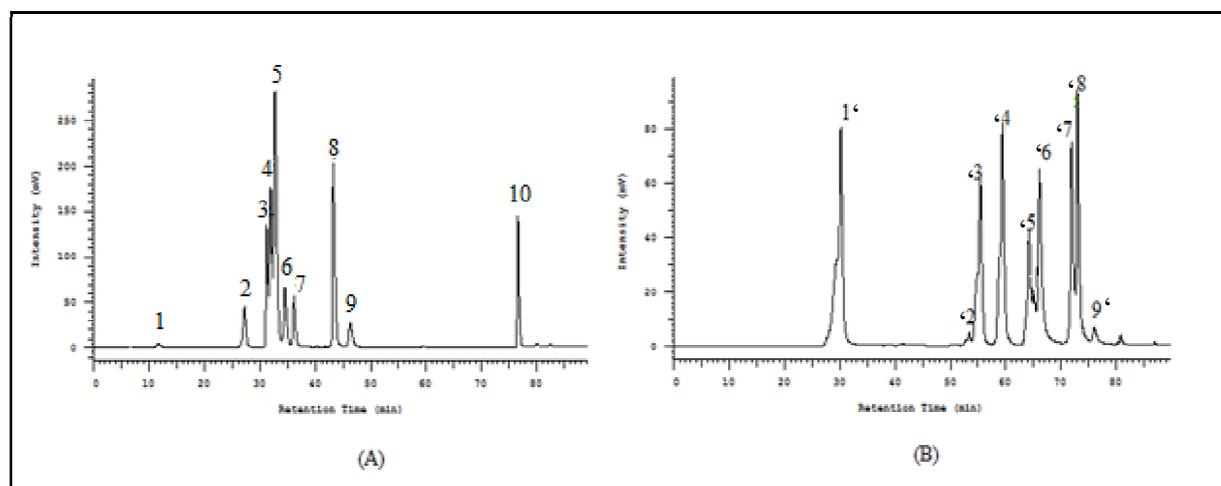
Présence notable (+++), présence modérée (++) , traces (+), absence (-)

D'après les résultats illustrés dans le tableau XVII, les flavonoïdes, les saponines et les coumarines constituent les marqueurs les plus importants chez tous les ELF's de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus indica*. Ces résultats vont dans le même sens que les analyses réalisées par Bhandary *et al* (2012) ; El Gengaih *et al* (2013) ; Rufai et Fatimah (2015) ; et Toure *et al* (2015) sur les extraits hydroalcooliques des fruits des mêmes plantes.

Notre étude a révélé que l'ELF de *Vitis vinifera* est riche en triterpènes et en stéroïdes alors que celui de *Punica granatum* contient des stéroïdes en plus de tanins des deux types (hydrolysables et condensés). La non détection des alcaloïdes dans les quatre extraits des fruits est confirmée par la réaction de Dragendroff.

2-2/ Examen du profil chromatographique des ELF's par CLHP/UV-VIS

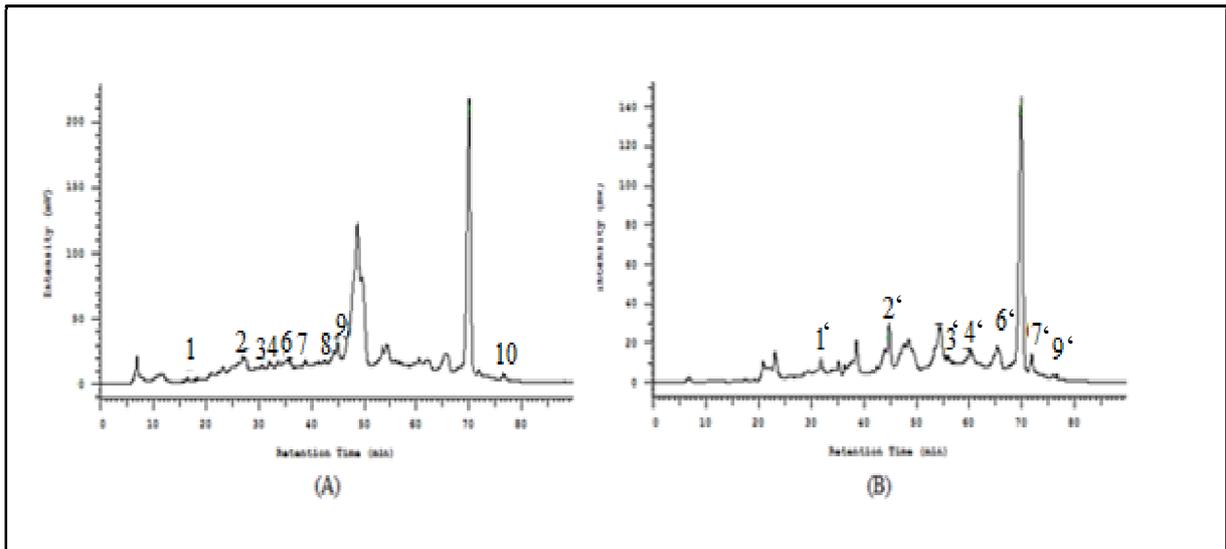
Une identification préliminaire du profil de chacun des ELF's a été faite par HPLC avec une double détection UV (280, 325 nm) en présence d'une série de témoins (7 acides phénoliques et 12 flavonoïdes) (fig31).



Légende : (A); 1: acide gallique, 2: catéchine, 3: acide chlorogénique, 4: acide caféique, 5: acide vanillique, 6: épicatechine gallate, 7: épicatechine, 8: acide cinnamique, 9: acide benzoïque, 10: acide coumarique. (B): 1': esculetine, 2': hespéridine, 3': rutine, 4': quercétine, 5': naringénine, 6': quercitrine, 7': kaempférol, 8': apigénine, 9': rhamnétine.

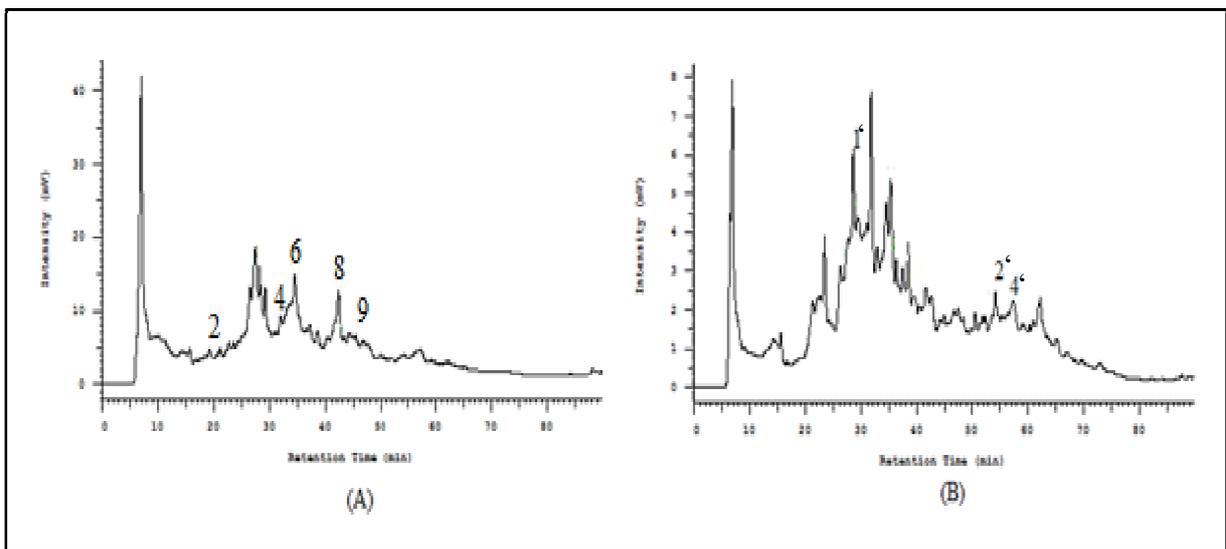
Figure 31 : Tracé Chromatographique des principaux témoins détectés à 280nm (A) et 325nm (B).

Les tracés chromatographiques des ELF's de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* sont décrits dans les figures 32, 33, 34 et 35 respectivement.



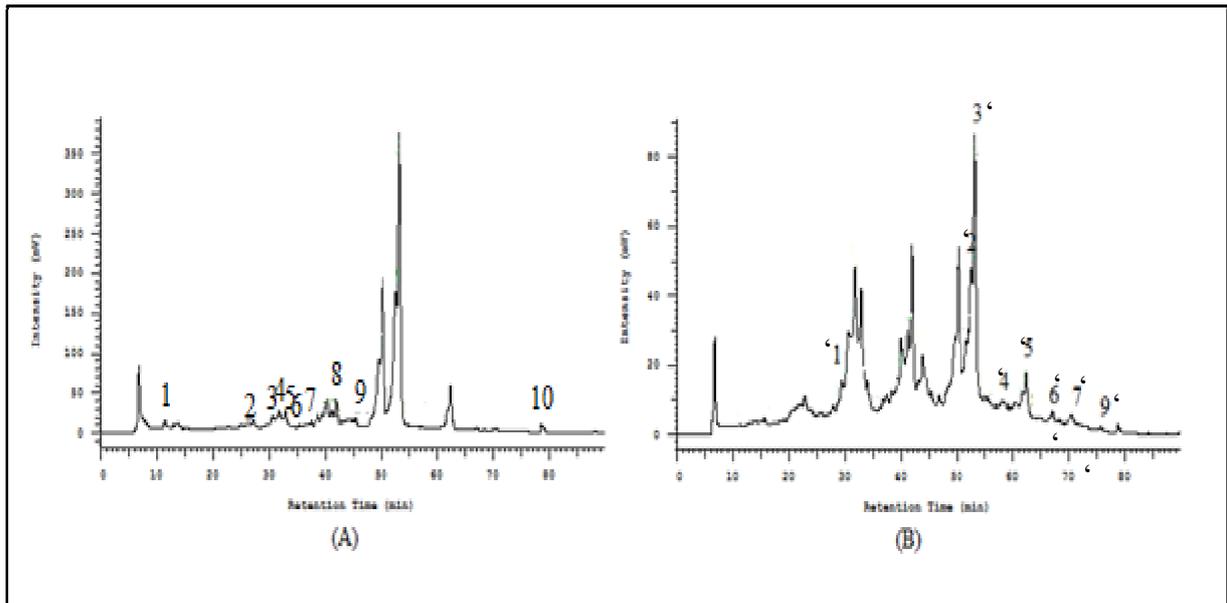
Légende : (A): 1: acide gallique, 2: catéchine, 3: acide chlorogénique, 4: acide caféique, 6: épicatechine gallate, 7: épicatechine, 8: acide cinnamique, 9: acide benzoïque, 10: acide coumarique. (B): 1': esculetine, 2' : hespéridine, 3': rutine, 4': quercétine, 6': quercitrine, 7': kaempférol, 9': rhamnétine.

Figure 32 : Tracé Chromatographique des principaux acides phénoliques et des flavonoïdes d'ELF de *Vitis vinifera* détectés à 280nm (A) et 325nm (B).



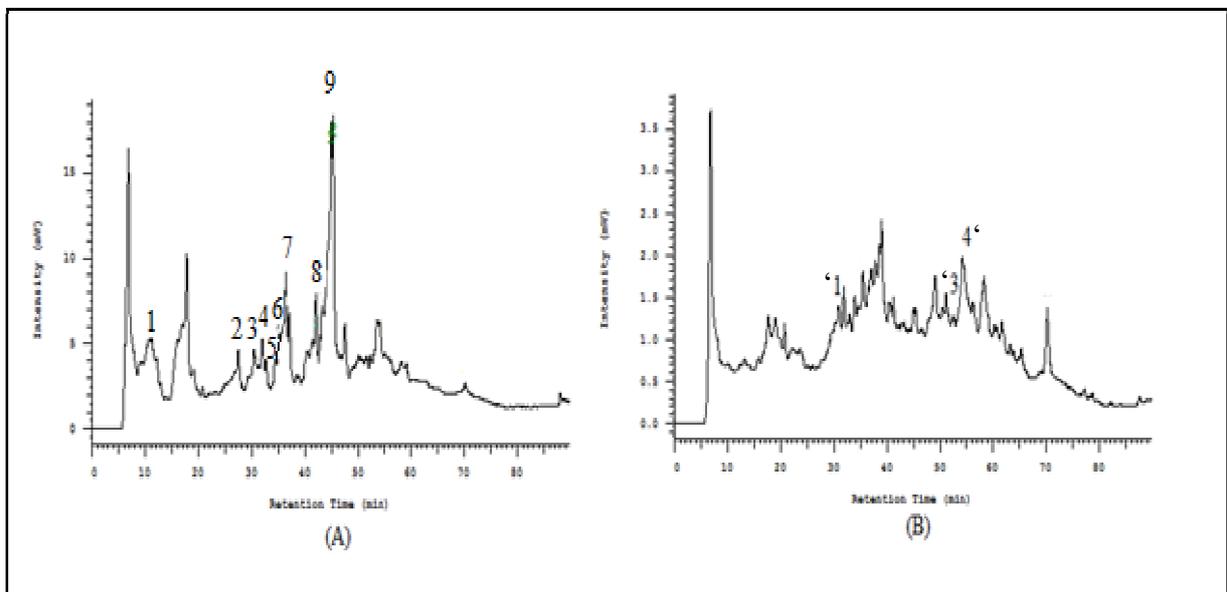
Légende : (A) 2: catéchine, 4: acide caféique, 6: épicatechin gallate, 8: acide cinnamique, 9: acide benzoïque. (B): 1': esculetine, 2': hespéridine, 4': quercétine.

Figure 33 : Tracé Chromatographique des principaux acides phénoliques et des flavonoïdes d'ELF de *Punica granatum* détectés à 280nm (A) et 325nm (B).



Légende : (A) : 1: acide gallique, 2: catéchine, 3: acide chlorogénique, 4: acide caféique, 5: acide vanillique, 6: épicatechine gallate, 7: épicatechine, 8: acide cinnamique, 9: acide benzoïque, 10: acide coumarique. (B): 1': esculetine, 2': hespéridine, 3': rutine, 4': quercétine, 5': naringénine, 6': quercitrine, 7': kaempférol, 9': rhamnétine.

Figure 34: Tracé chromatographique des principaux acides phénoliques et des flavonoïdes détectés à 280nm (A) et 325nm (B) dans l'ELF de *Citrus aurantium*.



Légende : 1: acide gallique, 2: catéchine, 3: acide chlorogénique, 4: acide caféique, 5: acide vanillique, 6: épicatechine gallate, 7: épicatechine, 8: acide cinnamique, 9: acide benzoïque. (B) : 1': esculetine, 3': rutine, 4': quercétine.

Figure 35 : Tracé chromatographique des principaux acides phénoliques et flavonoïdes détectés à 280nm (A) et 325nm (B) dans l'ELF d'*Opuntia ficus-indica*.

Le tableau XVIII récapitule les résultats du criblage des ELF's par rapport aux acides phénoliques et flavonoïdes témoins.

Tableau XVIII : Profil en acides phénoliques et flavonoïdes dans les ELF's.

Standards	TR (min)	Extraits Lyophilisés des Fruits (ELF's)			
		<i>Vitis vinifera</i>	<i>Punica granatum</i>	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i>
Acide gallique*	11,95	+	-	+	+
Catéchine*	27,17	+	+	+	+
Acide chlorogénique*	31,17	+	-	+	+
Acide caféique*	31,87	+	+	+	+
Acide vanillique *	32,60	-	-	+	+
Epicatechine gallate*	34,41	+	+	+	+
Epicatechine*	36,08	+	-	-	+
Acide cinnamique*	43,12	+	+	+	+
Acide benzoïque*	46,12	+	+	+	+
Acide coumarique*	76,61	+	-	+	-
Esculetin**	30,11	+	+	+	+
Hesperedine**	53,49	+	+	+	-
Rutine**	55,45	+	-	+	+
Quercetine**	59,44	+	+	+	+
Naringenine**	64,27	-	-	+	-
Quercitrine**	66,11	+	-	+	-
Kaempferol**	71,95	+	-	+	-
Apigénine**	72,99	-	-	-	-
Rhamnetine**	76,00	+	-	+	-

+ : présence probable - : non détecté * détecté à 280 nm ** détecté à 325 nm

L'analyse par HPLC des ELF's de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* montre la présence de certains des acides phénoliques et flavonoïdes utilisés comme témoins. C'est le cas des caféique, cinnamique, et benzoïque, de même que la catéchine, l'epicatechine gallate et l'esculetine. Les acides gallique et chlorogénique ainsi que la rutine sont présents dans les ELF's de *Vitis vinifera*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* et absents dans l'ELF de *Punica granatum*. L'examen du tableau XVIII révèle

également que l'acide coumarique, la quercétrine, le kaempférol et la rhamnétine sont présents chez les ELF de *Vitis vinifera* et *Citrus aurantium* et absents chez les ELF de *Punica granatum* et *Opuntia ficus-indica*. La présence du flavonoïde naringénine n'est confirmée que dans l'ELF de *Citrus aurantium*, alors que l'absence de l'apigénine est confirmée dans tous les ELF testés.

Les résultats de notre analyse chromatographique de l'ELF de *Vitis vinifera* sont partiellement similaires à ceux de Gursoy (2012), indiquant que les composés phénoliques détectés dans les ELF de *Vitis vinifera* sont l'acide gallique, l'acide benzoïque, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'acide cinnamique. Godevac et ses collaborateurs (2010) ont également indiqué que les acides phénoliques les plus couramment identifiés dans le raisin sont les dérivés d'acides cinnamiques, l'acide benzoïque et l'acide gallique. Cette observation est confirmée par notre analyse où ces composés ont été détectés dans l'extrait de cette plante.

La présente étude a révélé l'existence de nombreux composés phénoliques dans l'ELF de *Punica granatum* comme l'acide caféique, cinnamique et benzoïque, la catéchine, l'épicatéchine gallate, l'esculetine, l'hespéridine et la quercétine. Nos résultats vont dans le sens des données communiqués par Hmid *et al* (2013), concernant la présence dans les extraits des fruits de *Punica granatum* d'acide gallique, d'acide chlorogénique, d'acide caféique, la catéchine, l'épicatéchine et la quercétine. Par ailleurs, ces auteurs ont également rapporté la présence d'autres composés phénoliques qui n'ont pas été identifiées dans notre étude tels que : l'acide chlorogénique, férulique, ellagique, et la rutine (Hmid *et al.*, 2013). Cette divergence peut être expliquée par le fait que la composition en métabolites secondaires diffère qualitativement et quantitativement selon plusieurs facteurs endogènes et exogènes ; par exemple climatique, génétique, stade de développement, degré de maturation, période de récolte, et la méthode d'extraction (Aganga, 2001; Fiorucci, 2006). Nos travaux et ceux de Kulkarni et Aradhy (2005) s'accordent sur l'absence de kaempférol dans l'ELF de *Punica granatum*. Ces auteurs ont signalé qu'aucune quantité décelable de kaempférol n'a pu être trouvée dans les fruits de grenade des cultivars de *Punica granatum* (Kulkarni et Aradhy., 2005).

L'examen de l'ELF de *Citrus aurantium* a permis de mettre en évidence la plupart des témoins (7 acides phénoliques et 11 flavonoïdes) à l'exception de l'apigénine. Ces résultats sont en partie semblables à ceux de Nogata *et al* (2006) notamment en ce qui concerne l'hesperidine, la naringénine, la rutine et la quercétine. D'autres études antérieures ont prouvé également que *Citrus aurantium* accumule de nombreux types de composés phénoliques dans leurs fruits avec la naringine en tant que principal glucoside de flavanone et avec une moindre quantité d'hespéridine et de néohespéridine (Berhow *et al.*, 1998 ; Gattuso *et al*, 2007 ; Mata bilbao *et al*, 2007). La présence de la naringénine et de l'hespéridine est confirmée dans l'extrait de notre fruit.

Dans l'extrait du fruit d'*Opuntia ficus-indica*, douze composés ont ainsi été identifiés. Il s'agit de l'acide gallique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide cinnamique, l'acide benzoïque, l'épicatéchine gallate, l'épicatéchine, la catéchine, l'éculétine, la rutine et la quercétine. Fernández Lopez *et al* (2010) ont déterminé des quantités significatives en flavonoïdes dans l'ELF d'*Opuntia ficus-indica* dont la quercétine étant le composé prédominant, accompagnée d'isorhamnétine, lutéoline et kaempférol.

Finalement l'analyse par HPLC en présence de témoins (19 composés phénoliques) nous a donné des indications préliminaires mais utiles sur le profil chimique de nos extraits. Cette technique est toutefois limitée par rapport au nombre de témoins disponibles, et doit être complétée par d'autres techniques chromatographiques couplées notamment à la spectrométrie de masse (CHPL-DAD-ESI/MS).

2-3/ Analyse des ELF's par HPLC/UV-VIS-DAD-ESI-MS

Les résultats des analyses par HPLC-MS des ELF's de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* sont décrits dans les tableaux XIX, XX, XXI et XXII, respectivement.

2-3-1/ Identification des molécules présentes dans l'ELF de *Vitis vinifera*

Les résultats d'analyse d'ELF de *Vitis vinifera* par HPLC-MS sont présentés dans la figure 35 et le tableau XIX.

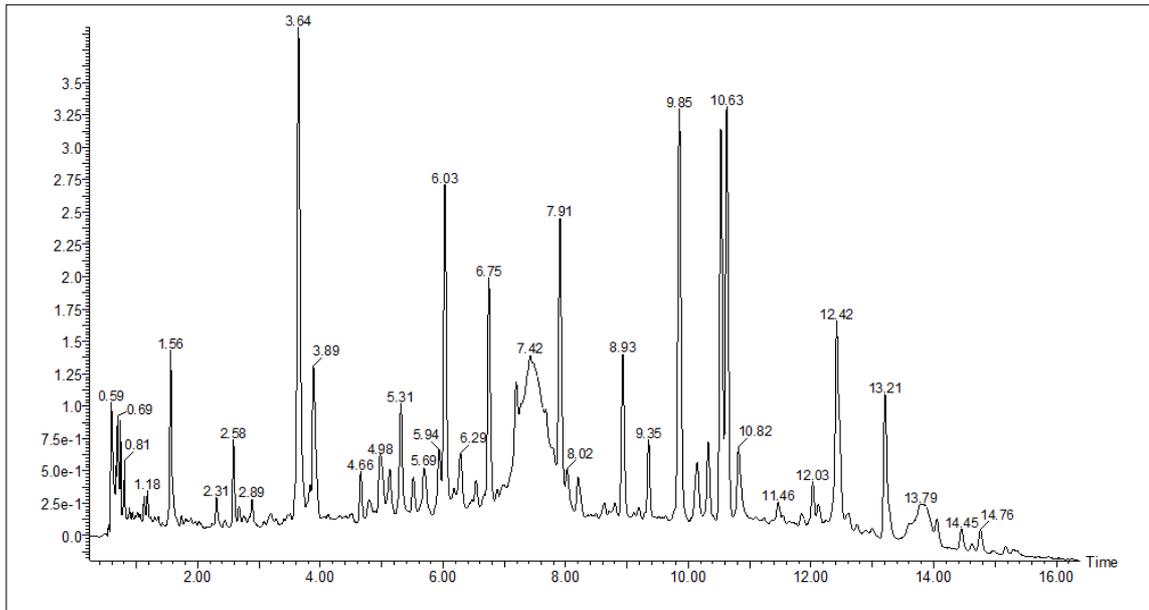


Figure 36 : Chromatogramme HPLC-UV-MS relatif à l'ELF de *Vitis vinifera*.

De la lecture du tracé chromatographique (fig36) et des résultats d'analyse par HPLC-MS regroupé dans le tableau XIX on peut observer que :

-Plus de 37 composés ont été détectés dont 29 identifiés ;

-Parmi les composantes majoritaires d'ELF de *Vitis vinifera*, on remarque la présence majoritaire de resvératrol hexoside I (12,75%), Acide caftarique (12,66%), acide *p*-coumarique hexoside (8,05%), acide dicaféoyl tartrique (7,25%), quercétine-3-O-glucoside (5,31%) Isorhamnétine-3-O-glucoside (5,15%) et quercétine-3-O-glucuronide (5,03%). Ces composés représentent à eux seuls plus de 50% d'ELF de *Vitis vinifera* ;

-En ce qui concerne les flavonoïdes, ils sont présents dans l'ELF de *Vitis vinifera* avec un pourcentage de 25,47%, représentés majoritairement par la quercétine-3-O-glucoside (5,31%) et l'isorhamnétine-3-O-glucoside (5,15%). La rutine fréquemment présente dans les végétaux est présenté avec un taux de 1,62% ;

-Les acides phénoliques pour leur part sont présents dans l'ELF de *Vitis vinifera* avec un pourcentage de 50,59%, avec l'acide caftarique (12,66%) comme acide phénolique majoritaire ;

-Le resvératrol, un stilbène à activité antioxydante bien connue est présent à une concentration équivalente à 12,75%.

Tableau XIX : Principales molécules détectées dans l'ELF de *Vitis vinifera*.

RT min	λ_{max}	[M-H] ⁺	Fragments	Identification	(%)
0,59	264	149,0102	96	Acide tartrique I	2,98
0,69	262	149,0102	96	Acide tartrique II	1,15
0,81	278	191,0208	159, 133, 96	Acide quinique	0,55
1,18	274	180,0676	163[(M-H)-17], 149, 147, 133	Acide hydroxy coumarique	0,17
1,56	271	169,0162	125[(M-H)-44]	Acide gallique	3,82
2,31	310	331,0672	179, 169	Acide caféoyl gallique	0,40
2,58	254, 295sh	331,0673	169[(M-H)-162]	Acide gallique hexoside	1,02
2,89	288	329,0872	305, 235, 179, 167[(M-H)-162], 153, 149	Acide vanillique hexoside	0,32
3,64	251	311,0705	179, 149[(M-H)-162]	Acide Caféoyl tartrique (Acide caftarique)	12,66
3,89	326	355,0666	191, 179, 149	Acide dihydrocaféoyl quinique	4,85
4,66	321	341,0877	281, 235, 179[(M-H)-162], 161, 135	Acide caféique hexoside	0,68
4,98	311	295,0453	235, 163, 149[(M-H)-146], 146	Acide coutarique	0,97
5,31	279, 320sh	289,0724	579[2(M-H)], 245[(M-H)-44], 179[(M-H)-110], 109	Acide caféique pyrocatechine ester	2,15
5,69	266	417,1045	325, 235, 116	Non identifié	1,21
5,94	298	597,1812	447, 325, 235, 116	Non identifié	1,37
6,03	310	325,0932	265, 235, 163[(M-H)-162], 145	Acide <i>p</i> -coumarique hexoside	8,05
6,29	275	447,1501	325[(M-H)-122], 197, 163[(M-H)-122-162]	Caféoyl benzoyl hexoside	1,22
6,75	310	325,0932	265, 235, 163[(M-H)-162], 145	Acide <i>p</i> -coumarique hexoside	3,47
7,42	278	289,0724	579[2(M-H)], 245[(M-H)-44], 179[(M-H)-110], 109	Acide caféique ester pyrocatechine	2,37
7,91	278	491,1189	509, 427, 329, 235, 116	Acide dicaféoyl tartarique	7,25
8,02	260	403,1032	509, 387, 235	Non identifié	0,16
8,2	346	479,086	316, 301[(M-H)-176-2], 287, 271	Dihydro quercétine-3-O-glucuronide	2,50
8,62	266	639,12	625, 463[(M-H)-176], 441, 427, 349, 301[(M-H)-176-162]	Quercétine-3-O-glucoside-7-O-glucuronide	0,27

9,35	344	509,1299	347[(M-H)-162], 329[(M-H)-180], 179, 167	Acide dicaféoyl vanillique	1,03
9,85	306	389,1237	227[(M-H)-162]	Resvératrol hexoside I	12,75
10,32	345	609,1456	463[(M-H)-146], 301[(M-H)-146-162], 271	Quercétine-3-O-rutinoside (Rutine)	1,62
10,53	254/349	477,0679	301[(M-H)-176], 271	Quercétin-3-O-glucuronide	5,03
10,63	254/351	463,0881	927[2(M-H)], 301[(M-H)-162], 271	Quercétine-3-O-glucoside	5,31
10,82	262/350	493,0983	449, 330, 235, 116	Non identifié	1,91
11,46	283	569,2232	523, 447, 363, 333, 235, 116	Non identifié	0,18
12,03		447,0926	285[(M-H)-162]	Lutéoline-3-O-glucoside	0,91
12,12		477,1037	363, 285[(M-H)-192], 191, 187	3-O-Hydroxyquinoyl lutéoline	0,24
12,42	351	477,1037	315[(M-H)-162], 271	Isorhamnétine-3-O-glucoside	5,15
13,21	285	389,1237	273, 227[(M-H)-162]	Resvératrol hexoside II	3,72
13,79	282	683,1602	655, 625, 533, 435, 377, 235	Non identifié	1,84
14,45		551,1033	377, 343, 235, 207, 116	Non identifié	0,34
14,76	266	347,0771	315, 235, 116	Non identifié	0,48

RT : Temps de rétention (min), **λ_{max}** : Longueur d'onde maximale (nm), **%** : Pourcentage d'aire de pic par rapport à la somme des aires des principaux pics.

2-3-2/ Identification des molécules présentes dans l'ELF de *Punica granatum*

Les résultats d'analyse d'ELF de *Punica granatum* par HPLC-MS sont présentés dans la figure 37 et le tableau XX.

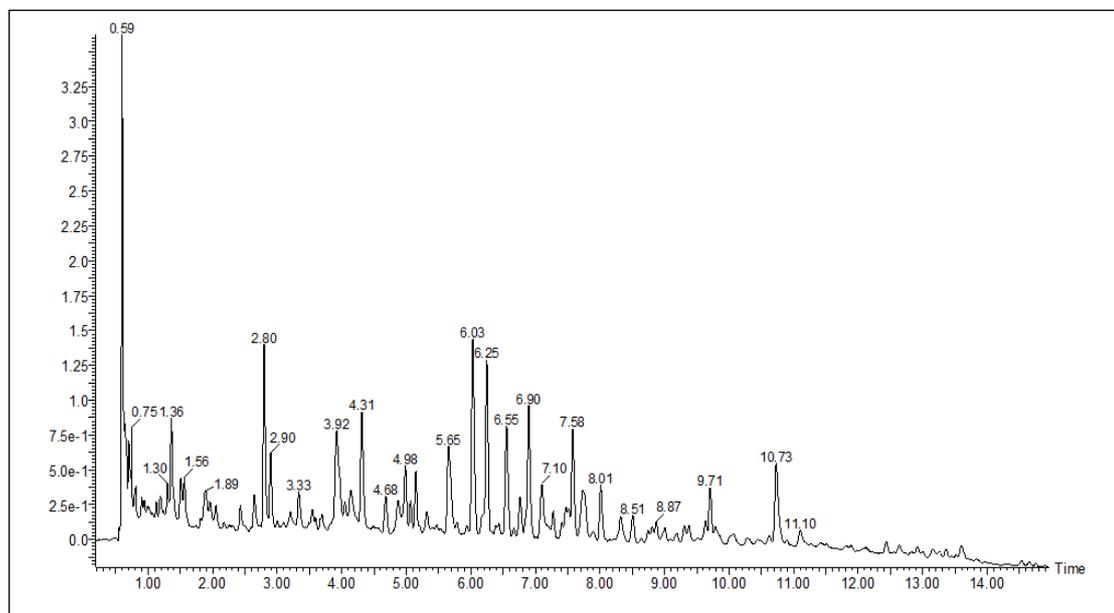


Figure 37: Chromatogramme HPLC-UV-MS relatif à l'ELF de *Punica granatum*.

Il ressort de la lecture des résultats du tracé chromatographique (fig37) et du tableau XX que :

- Plus de 22 composés ont été identifiés sur les trentaines détectés ;
- L'ELF de *Punica granatum* est constitué majoritairement des acides phénoliques (41,11%), d'une coumarine (39,39%), deux flavonoïdes (5,11%), et d'un tanin (0,61%) ;
- Le Bergapten diglucoside est le constituant majoritaire avec une concentration équivalent à 39,39% ;
- Parmi les acides phénoliques, l'acide vanillyl hydroxycaféoyl hexoside (5,79%) suivi de l'acide caféoyl vanillique (4,23%) et du féruloyl galloyl hexoside (4,07%) viennent en tête.

Tableau XX : Principales molécules détectées dans l'ELF de *Punica granatum*.

RT min	λ_{max}	[M-H] ⁻	Fragments	Identification	(%)
0,59	264	539,1372	377, 215	Bergapten diglucoside	39,39
0,75	242	439,0802	353 [M-H-86], m/z 191[M-H-86-162]	Acide malonyl glucoside quinique	3,78
1,3	295	506,1505	451, 387, 331, 265, 219, 191, 179	Non identifié	0,82
1.36	267	506,1508	331[(M-H)-175], 191, 179[(M-H)-175-152], 169	Caféoyl galloyl citrate	3,20
1,5		685,1822	506[(M-H)-179], 331[(M-H)-179-175], 191, 179[(M-H)-179-175-152], 169	Dicaféoyl galloyl citrate	1,36
1,56	271	735,2188	649[(M-H)-86], 506, 331, 191, 179, 169,	Dicaféoyl galloyl malonyl citrate	2,19
1,89		348,1014	347, 331, 179[(M-H)-169], 169	Acide caféoyl gallique	1,36
2,8	254/ 295	370,1038	368[(M-H)-2H], 191[(M-H)-179], 179[(M-H)-191]	Acide caféoyl citrique	3,47
2,9	252/ 290	329,881	167[(M-H)-162]	Acide vanillique hexoside	1,38
3,33	256	299,0777	643, 443, 239, 223, 116	Non identifié	0,69
3,92	269	329,0878	179, 167[(M-H)-162]	Acide caféoyl vanillique	4,23
4,31	330	341,0876	179[(M-H)-162]	Caféoyl hexoside	2,62
4.68	321	627,1561	695, 489, 405, 341, 235, 116	Non identifié	0,69
4,98	258	689,1928	528[(M-H)-161], 355[(M-H)-161-173], 193[(M-H)-161-173-162], 191,174	Férruloyl diglucosyl citrate	1,37
5,15	267	511,1788	341[(M-H)-170], 179[(M-H)-170-162]	Caféoyl galloyl hexoside	0,76
5,65	314	325,0929	323, 163[(M-H)-162], 145	Acide <i>p</i> -coumarique hexoside	2,30
6,03	270	525,1605	1051[2M-H],363[(M-H)-162], 193[(M-H)-162-170],169, 152	Férruloyl galloyl hexoside	4,07
6,25	269	525,1612	363[(M-H)-162], 195[(M-H)-162-168], 167[(M-H)-162-196], 149	Vanillyl hydroxycaféoyl hexoside	5,79
6,55	328	355,1028	191, 179[(M-H)-176], 175	Acide caféoyl citrique	2,07
6.90	264	643,1503	643, 387, 305, 235, 179, 116	Non identifié	6,32

7,1	321	439,1813	355, 295, 235, 116	Non identifié	1,52
7,58	255, 361	463,052	301[(M-H)-162]	Quercétine hexoside	3,78
7,69	266	461,1664	315[(M-H)-162]	Isorhamnétine rhamnopyranoside	1,33
8,01	265/330	363,1076	915, 551, 337, 235, 116	Non identifié	1,38
8,51	284	505,1713	343[(M-H)-162], 191, 174[(M-H)-162-169], 169	Acide galloyl citrique hexoside	0,57
8,87	283	461,1665	551, 415, 331, 235, 116	Non identifié	0,29
9,71	361	447,0566	301[(M-H)-146]	Acide élлагique deoxyhexoside	0,61
10,73	280	507,1505	355[(M-H)-152], 207[(M-H)-152-148],174	Sinapaldéhyde deoxycoumaroyl gallate	2,27
11,1		539,1763	387[(M-H)-152], 235, 207[(M-H)-152-180], 179	Sinapaldéhyde caféoyl gallate	0,39

RT : Temps de rétention (min), **λ_{max}** : Longueur d'onde maximale (nm), **%** : Pourcentage d'aire de pic par rapport à la somme des aires des principaux pics.

2-3-3/ Identification des molécules présentes dans l'ELF de *Citrus aurantium*

Les résultats d'analyse d'ELF de *Citrus aurantium* par HPLC-MS sont présentés dans la figure 38 et le tableau XXI.

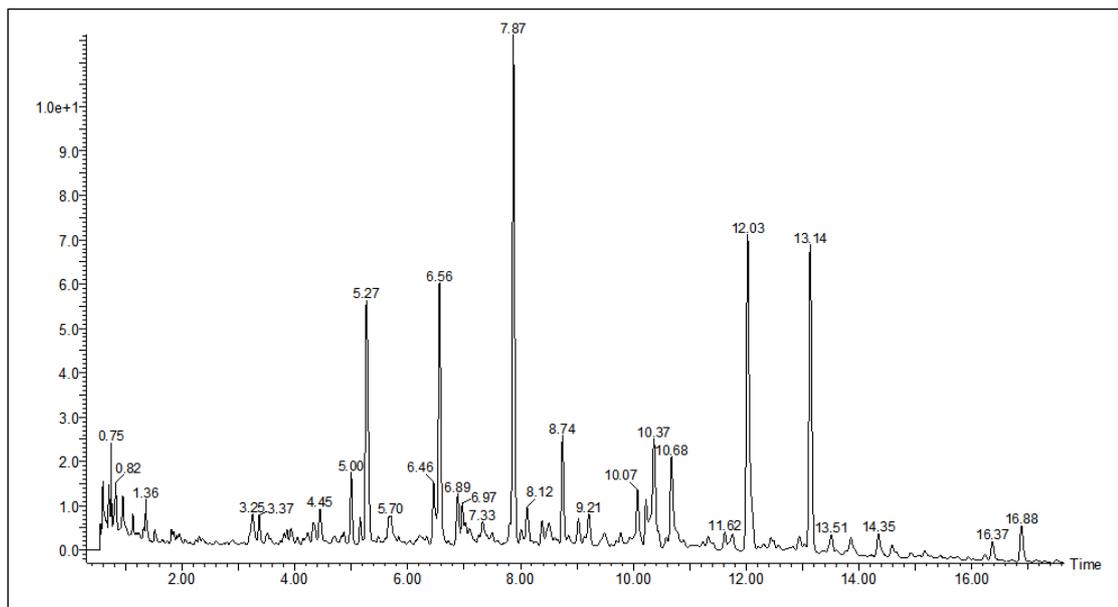


Figure 38 : Chromatogramme HPLC-UV-MS relatif à l'ELF de *Citrus aurantium*.

De la lecture du tracé chromatographique (fig38) et le tableau (XXI) d'analyse par HPLC-MS d'ELF de *Citrus aurantium* on peut observer que :

-Plus de 28 composés ont été détectés dont 20 ont été identifiés ;

-Parmi les composants majeurs d'ELF de *Citrus aurantium* on note la présence prédominante d'acide diféruloyl sinapique (22,02%) et de trois flavonoïdes à savoir ; la quercétine caféoyl glucoside (12,52%), la naringénine-7-O-rutinoside (12,27%) et la Rutine (Quercétine-3-O-rutinoside) (10,42%), ces composés seuls représentent plus de 57% ;

-Le groupe de flavonoïdes présents avec un taux de 49,88 % est présentés par trois types de génines.

Tableau XXI: Principales molécules détectées dans l'ELF de *Citrus aurantium*.

RT min	λ_{\max}	[M-H]-	Fragments	Identification	(%)
0,75	272	515,1254	353[(M-H)-162], 191[(M-H)-2x162], 179, 173, 135	Acide dicaféoyl quinique I	1,62
0,82	272	515,1256	353[(M-H)-162], 191[(M-H)-2x162], 179, 173, 135	Acide dicaféoyl quinique II	0,95
1,36	273	515,1249	353[(M-H)-162], 191[(M-H)-2x162], 179, 173, 135	Acide dicaféoyl quinique III	1,01
3,25	285	313,0566	205, 191[(M-H)-122]	Acide quinique hydroxybenzoyl I	0,95
3,37	241/309	223,0255	221, 205, 193, 179[(M-H)-44], 169	Acide sinapique	0,54
4,45	325	353	235, 191[(M-H)-162], 174	acide caféoyl quinique	0,63
5	257	387,1297	193[(M-H)-194],	Acide diférule	1,75
5,27	267	443,1919	341, 337[(M-H)-106], 295, 191, 174	Acide coumaroyl benzoyl quinique	5,86
5,7	267	417,1402	325[(M-H)-92], 191[(M-H)-132-2], 174	Acide dihydro quinique pentoside glycérol	1,22
6,46	324	367,0667	749, 467, 323, 235, 207, 116	Non identifié	3,96
6,56	253/347	771,1988	609, 593, 399, 301, 273	Quercétine caféoyl glucoside	12,52
6,89	330	385,1133	337, 191, 179,174	Acide quinique méthoxy caféoyl	1,74
6,97	270/336	609,1455	595, 519, 417[(M-H)-192], 369	Lutéoline hydroxy quinoyl pentoside	2,11
7,33	327	399,0924	337, 235, 223, 193, 174	Acide sinapique féruloyl	0,91
7,87	270/335	593,1511	399[(M-H)-194], 337, 235, 223[(M-H)-194-176], 193, 174	Acide sinapique diféruleoyl I	22,02
8,12	325	593,1511	399[(M-H)-194], 337, 235, 223[(M-H)-194-176], 193, 174	Acide sinapique diféruleoyl II	0,85

8,74	284	741,2234	579[(M-H)-162], 433[(M-H)-162-146], 271[(M-H)-2 x 162-146]	Naringénine diglucoside rhamnoside	2,12
9,21	283/325	399,0929	613, 367, 235, 116	Non identifié	0,79
10,07	270/333	563,1402	473, 367, 235, 116	Non identifié	2,17
10,37	284/334	463,124	301[(M-H)-162]	Quercétine hexoside	7,42
10,68	323	561,1256	659, 451, 367, 235, 116	Non identifié	2,92
11,62	271/333	707,1826	739, 605, 451, 415, 235, 116	Non identifié	0,55
12,03		579,1722	1159[2(M-H)], 271[(M-H)-308]	Naringénine-7-O-rutinoside	12,27
13,14	284	609,1823	301[(M-H)-308]	Rutine (Quercétine-3-O-rutinoside)	10,42
13,51	324	683,2927	729, 575, 427, 351, 235, 116	Non identifié	0,45
14,35	324	575,1406	899, 643, 489, 395, 235, 116	Non identifié	0,90
16,37	324	589,1558	657, 499, 417, 387, 235, 116	Non identifié	0,45
16,88	283	593,1874	503[(M-H)-90], 417[(M-H)-176]	Lutéoline pentosyl glucuronide	0,90

RT : Temps de rétention (min), **λ_{max}** : Longueur d'onde maximale (nm), **%** : Pourcentage d'aire de pic par rapport à la somme des aires des principaux pics.

2-3-4/ Identification des molécules présentes dans l'ELF d'*Opuntia ficus-indica*

Les résultats d'analyse d'ELF d'*Opuntia ficus-indica* par HPLC-MS sont présentés dans la figure 39 et le tableau XXII.

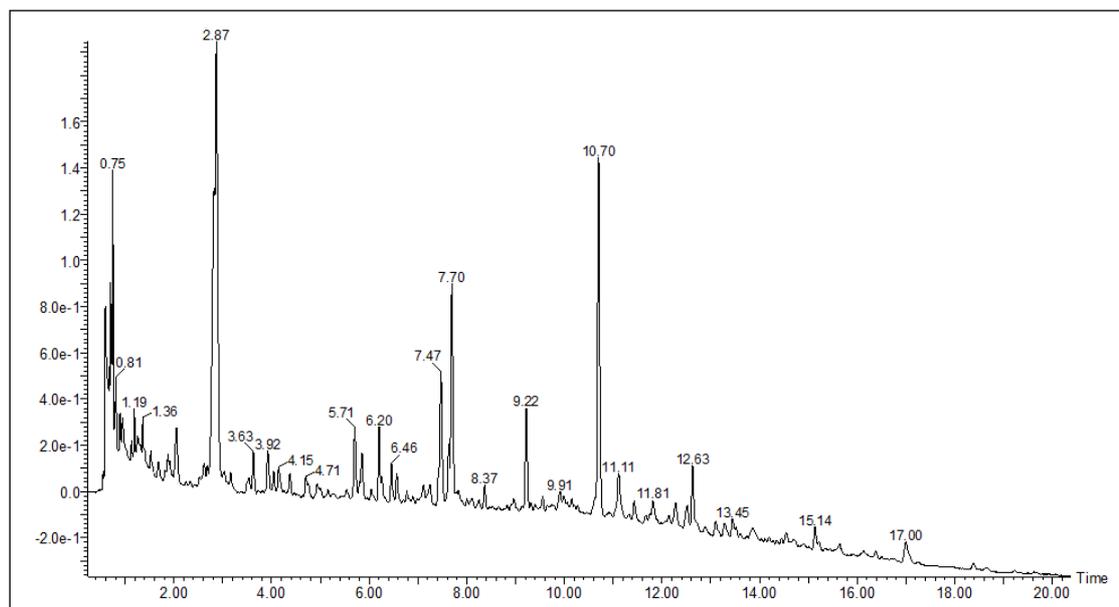


Figure 39 : Chromatogramme HPLC-UV-MS relatif à l'ELF d'*Opuntia ficus-indica*.

De la lecture du tracé chromatographique (fig39) et des résultats d'analyse du tableau XXII on peut remarquer que :

- Plus de 16 composés ont été identifiés sur 28 composés détectés ;
- Les principaux composants d'ELF d'*Opuntia ficus-indica* sont des acides phénoliques dont l'acide quinique I (20,90%), l'acide caféoyl benzoïque (20,21%) et l'acide piscidique (13,94%) sont considérés comme des composants dominants ;
- La quercétine et l'isorhamnétine sont aussi présents mais en faibles quantités (1,10% et 0,09%) respectivement.

Tableau XXII : Principales molécules détectées dans l'ELF d'*Opuntia ficus-indica*.

RT min	λ_{\max}	[M-H] ⁺	Fragments	Identifications	(%)
0,59	266	284,099	179	Acide caféoyl benzoïque	20,21
0,7	257	387,1143	341, 291, 215	Betanidine	3,77
0,75	245	191,0205	173, 133	Acide quinique I	20,90
0,81	261	191,0205	133	Acide quinique II	2,29
1,19		191,0203	133	Acide quinique III	0,56
1,36	257	515,1602	191, 179	acide dicaféoyl quinique	0,73
2,05		301,0933	271, 179	Quercétine	1,10
2,69	272/314	315,0718	235, 116	Isorhamnétine	0,09
2,87	247	255,0518	511[(2M-H)]	Acide piscidique	13,94
3,63	280	373,1135	359[(M-H)-14], 207[(M-H)-14-152], 193, 179, 174	Acide diméthyle galloyl férulique	0,62
3,92		361,0772	293, 235, 174, 116	Acide syringique hexoside	0,76
4,38		386,1081	339, 235, 116	Acide dihydroxy caféoyl quinique	0,31
5,71	266	417,1399	405, 236, 215, 207	Non identifié	1,12
5,85	274	239,057	177	Acide eucomique	0,98
6,2	259	461,1661	451, 387, 235, 116	Non identifié	3,30
6,46	319	959,321	387, 235, 174, 116	Non identifié	0,57
6,57	328	355,1035	235, 207, 116	Acide férulique hexoside I	0,54
7,47	322	355,1035	235, 207, 116	Acide férulique hexoside II	3,00
7,7	286	517,1555	355	Acide férulique diglucoside	5,93
8,37	284	1019,3414	555, 431, 387, 329, 235, 207	Non identifié	0,35
9,22	271	613,2131	603, 481, 405, 341, 235, 116	Non identifié	1,47
9,91	273	787,2673	777, 625, 499, 387, 245, 235, 116	Non identifié	0,29

10,7	275	565,1923	555, 405, 327, 235, 116	Non identifié	12,51
11,11	271	827,2615	827, 535, 449, 387, 235, 207	Non identifié	1,47
11,81		487,1817	627, 415, 405, 235, 207, 116	Non identifié	0,52
12,63	274	605,1873	561, 327, 235, 209, 116	Non identifié	1,30
13,45	273	791,275	763, 583, 457, 343, 235, 207, 116	Non identifié	0,26
15,14		562,1559	555, 352, 235, 116	Non identifié	0,37

RT : Temps de rétention (min), **λ_{max}** : Longueur d'onde maximale (nm), **%** : Pourcentage d'aire de pic par rapport à la somme des aires des principaux pics.

En conclusion, les résultats d'analyse par HPLC-MS d'ELF de *Vitis vinifera* a révélé un profil dominé par le resvératrol hexoside I (12,75%), l'acide caftarique (12,66%), l'acide *p*-coumarique hexoside (8,05%), l'acide dicaféoyl tartrique (7,25%), la quercétine 3-O-glucoside (5,31%), la quercétine 3- O-glucuronide (5,03%) et d'autres constituants mineurs. La présence de tous ces constituants ainsi que d'autres ont été signalé par d'autres auteurs (Downey and Rochfort., 2008; Godevac *et al.*, 2010; Lago-Vanzela *et al.*, 2011 ; Stefova and Ivanova., 2011 ; Perestrelo *et al.*, 2012).

Les résultats de l'analyse d'ELF de *Punica granatum* a révélé la présence dominante d'une coumarine dérivé de bargaptène (39,39%), de glycoside de la quercétine et de l'isorhamnétine ainsi que des dérivés d'acide vanillique, d'acide citrique et d'acide *p* coumarique. Des travaux antérieurs ont révélé la présence dominante de la quercétine hexoside, des dérivés d'acide éllagique, cafféique, vanillique et d'autres constituants mineurs. Nos résultats s'accordent avec les travaux antérieurs sur le point que la quercétine hexoside est présente en quantité importante et de la présence d'autre constituants également (Cristofori *et al.*, 2011 ; Fischer *et al.*, 2011 ; Ambigaipalan *et al.*, 2017).

Les résultats concernant les analyses par HPLC-MS d'ELF de *Citrus aurantium* montre la prédominance d'acide diféruoyl sinapique (22,02%), quercétine caféoyl glucosyl glucoside (12,52%), naringénine 7-O-rutinoside (12,27%) et la rutine (10,42%), plus des dérivés de l'acide quinique et d'autre. Ces résultats sont partiellement en accord avec les travaux de Wu *et al* (2015) qui rapporte la présence en grande quantité de la naringénine-7-O-triglucoside et l'acide quinique.

Les analyses par HPLC-MS d'ELF d'*Opuntia ficus-indica* ont montré la présence en grande quantité d'acide quinique I (20,89%), acide caféoyl benzoïque (20,21%), acide piscique (13,94%) ainsi que d'autres acides et leurs dérivés en quantités moindre. Les flavonoïdes comme la quercétine (1,10%) et l'isorhamnétine (0,09%) sont détectés en faibles quantités. Nos résultats sont partiellement comparables à ceux décrits par Dhaouadi *et al* (2013), Yeddes *et al* (2013) et Mata *et al* (2016).

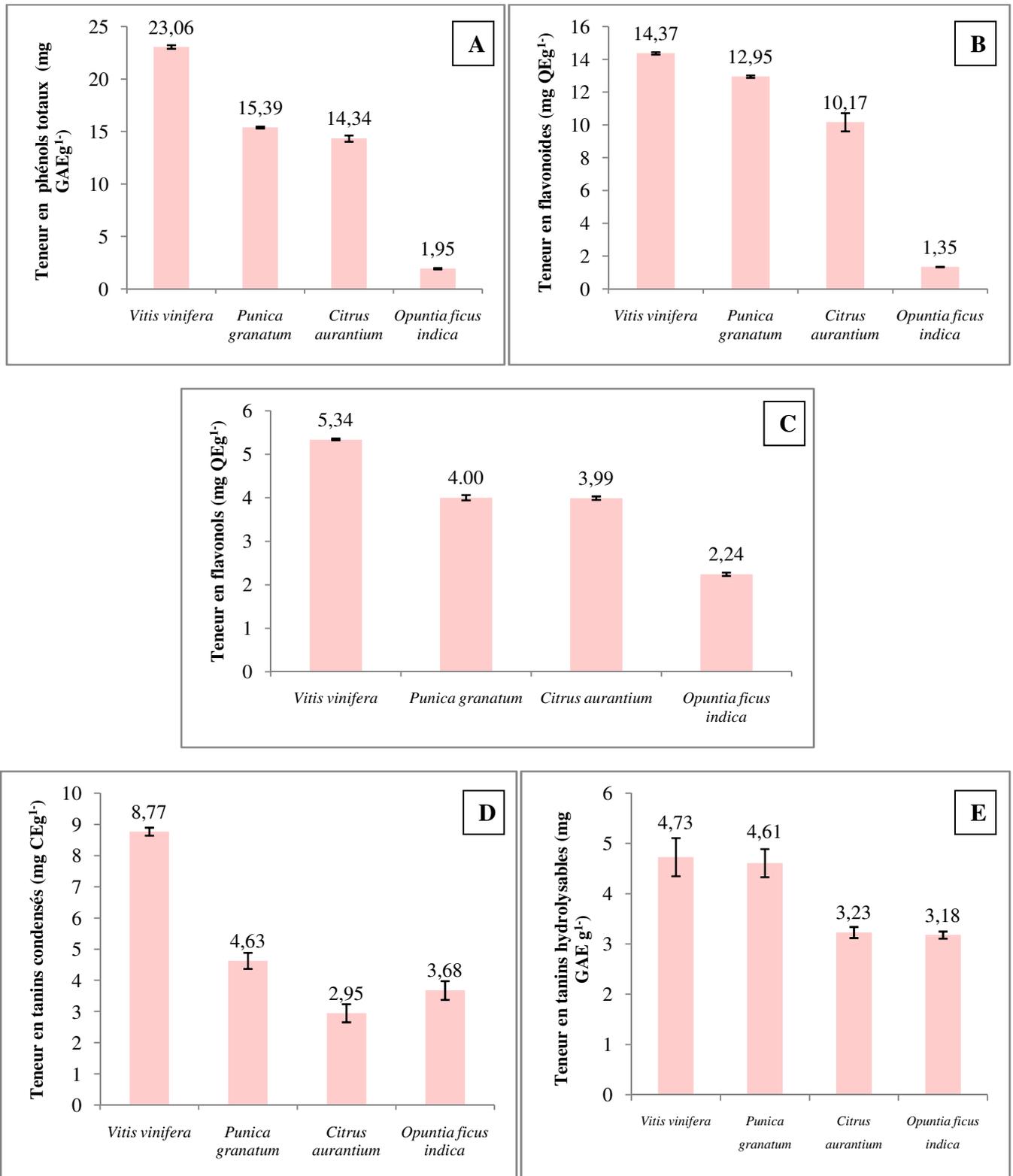
2-4/ Estimation des contenus en composés phénoliques dans les ELFs

Les résultats de l'analyse quantitative des phénols totaux (PT), des flavonoïdes totaux (FT), des flavonols (FLT), ainsi que ceux des tanins (condensés (TC) et hydrolysables (TH)) sont exprimés dans le tableau XXIII et la figure 40.

Tableau XXIII : Estimation des contenus en composés phénoliques dans les ELFs.

	Extraits Lyophilisés des Fruits (ELFs)			
	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Punica granatum</i>	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i>
Phénols totaux (mg GAE/g)	23,06±0,17	15,39±0,08*	14,34±0,3*	1,95±0,07*
Flavonoïdes totaux (mg QE/g)	14,37±0,08	12,95±0,07*	10,17±0,56*	1,35±0,02*
Flavonols (mg QE/g)	5,34±0,02	4,00±0,06*	3,99±0,04*	2,24±0,04*
Tanins condensés (mg CE/g)	8,77±0,13	4,63±0,26*	2,95±0,29*	3,68±0,30*
Tanins hydrolysables (mg GAE/g)	4,73±0,38	4,61±0,28	3,23±0,11*	3,18±0,07*

mg GAE/g : mg d'acide gallique équivalent/ g d'extrait sec, **mg QE/g**: mg de quercétine équivalent/ g d'extrait sec, **mg CE/g** : mg de cyanidine équivalent/g d'extrait sec. * : $p < 0.0001$; valeur comparée à l'ELF de *Vitis vinifera*.



A : teneurs en phénols totaux (mg GAE/g), B : teneurs en flavonoïdes totaux (mg QE/g d'extrait), C : teneurs en flavonols (mg QE/g), D : teneurs en tanins condensés (mg CE/g), E : teneurs en tanins hydrolysables (mg GAE/g).

Figure 40 : Teneurs en composés phénoliques dans les ELF.

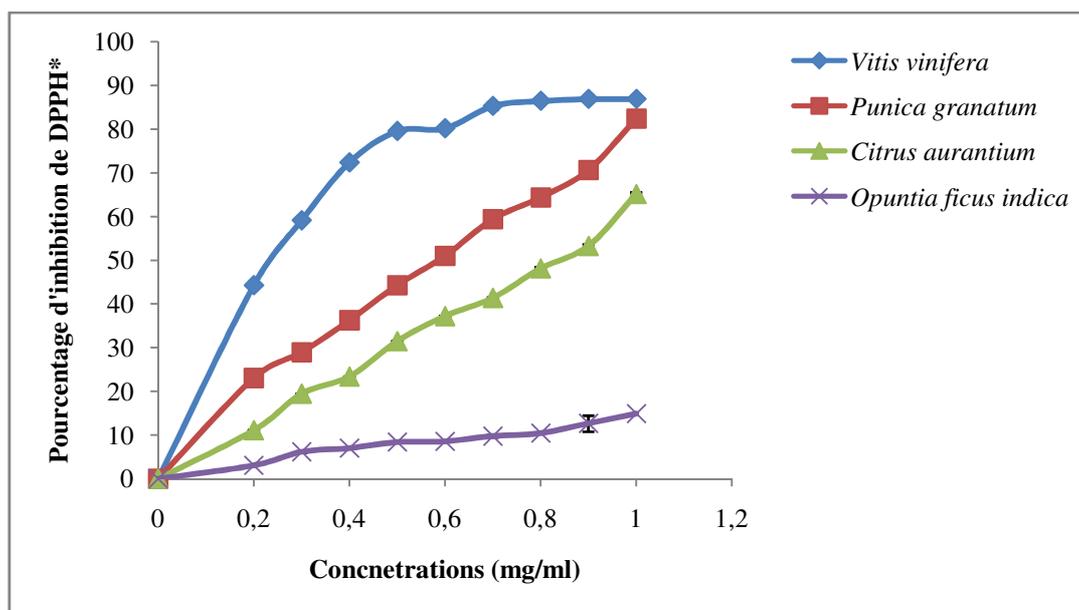
De la lecture des résultats on peut déduire que les taux des phénols totaux ($23,06 \pm 0,17$ mg GAE g^{-1}), flavonoïdes totaux ($14,37 \pm 0,08$ mg QE g^{-1}), flavonols totaux ($5,34 \pm 0,021$ mg QE g^{-1}), tanins condensés ($8,77 \pm 0,13$ mg CE g^{-1}) d'ELF de *Vitis vinifera* est significativement plus important ($p < 0.0001$) que ceux des autres fruits. Alors que le taux des tanins hydrolysables ($4,73 \pm 0,38$ mg GAE g^{-1}) dans l'ELF de *Vitis vinifera* reste important mais comparable à celui de *Punica granatum* ($4,61 \pm 0,28$ mg GAE g^{-1}). A l'opposé *Opuntia ficus-indica* présente un taux relativement faible, en phénols totaux ($1,95 \pm 0,07$ mg GAE g^{-1}), en flavonoïdes totaux ($1,35 \pm 0,015$ mg QE g^{-1}), et en flavonols totaux ($2,24 \pm 0,04$ mg QE g^{-1}) par rapport à ceux des autres fruits. Le fruit d'*Opuntia ficus-indica* présente des contenus en tanins condensés ($3,68 \pm 0,3$ mg CE g^{-1}) et tanins hydrolysables ($3,18 \pm 0,07$ mg GAE g^{-1}) comparables à ceux de *Citrus aurantium*. Quant à l'ELF de *Punica granatum*, les taux de phénols totaux ($15,39 \pm 0,08$ mg GAE g^{-1}), flavonoïdes totaux ($12,95 \pm 0,07$ mg QE g^{-1}), flavonols totaux ($4,00 \pm 0,062$ mg QE g^{-1}), et tanins condensés ($4,63 \pm 0,26$ mg CE g^{-1}) sont modérés.

On peut conclure à travers l'évaluation des teneurs en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes totaux, flavonols totaux, tanins condensés et hydrolysables) dans les fruits des quatre espèces étudiées, que *Vitis vinifera* peut constituer une source potentielle de substances phénoliques antioxydantes. Ce résultat est conforté par d'autres travaux sur cette espèce qui souligne que *Vitis vinifera* est parmi les plantes qui renferment des taux élevés en substances phénoliques qui pourraient être mis à profit contre le stress oxydant et les maladies qui en découlent (Baydar *et al.*, 2004 ; Nirmala et Narendhiraka., 2011 ; Weidner *et al.*, 2013 ; Thapakorn et Niramom, 2015).

3/ Evaluation des activités biologiques

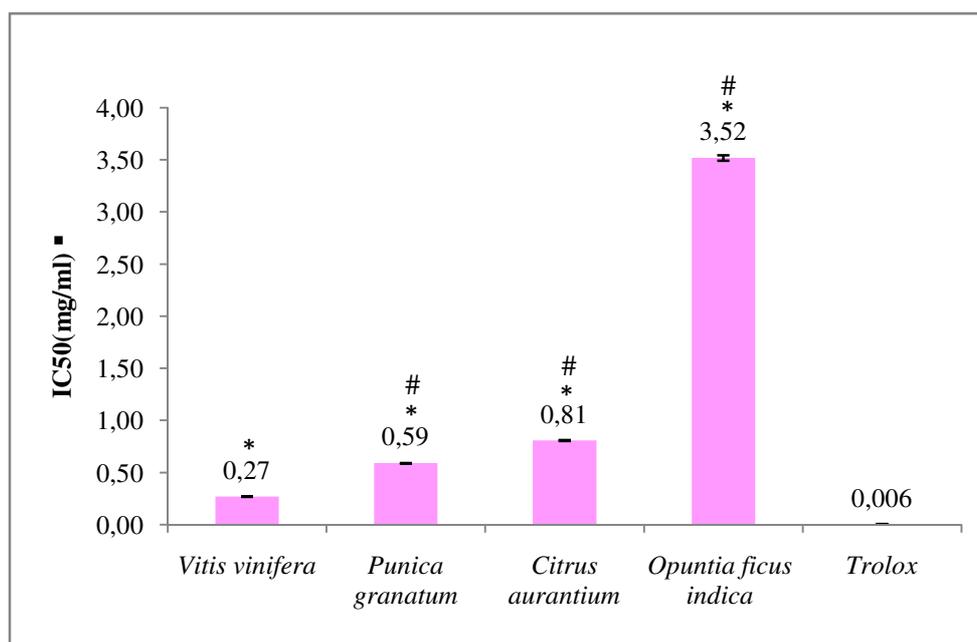
3-1/ Activité antioxydante au DPPH

La cinétique de la réduction du radical libre par les ELF de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* ainsi que les concentrations inhibitrices IC_{50} sont exprimés dans les figures 41 et 42, respectivement.



*valeurs moyennes d'inhibition de DPPH \pm SD (n=3).

Figure 41: Evolution du pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations des ELF.



■ Valeurs moyennes d'IC₅₀ \pm SD (n=3).

* : $p < 0,0001$; valeur comparée au trolox.

: $p < 0,0001$; valeur comparée à l'ELF de *Vitis vinifera*.

Figure 42 : Valeurs des IC₅₀ des ELF et de Trolox.

La lecture des courbes des cinétiques de l'inhibition du radical DPPH (figure 41, 42) montre que :

- Les ELFs et le trolox (substance antioxydante témoin) possèdent un pouvoir inhibiteur envers le radical DPPH;

-L'effet inhibiteur des ELFs est proportionnel aux doses utilisées ;

- Les ELFs de *Vitis vinifera*, *Punica granatum* et *Citrus aurantium* ont montré des pouvoirs inhibiteurs supérieurs à celui observé pour l'ELF d'*Opuntia ficus-indica* ;

-L'ELF de *Vitis vinifera* se distingue des autres extraits par son effet inhibiteur le plus élevé.

La figure 42 montre que :

-Le trolox possède un IC_{50} de $0,006\pm 0,001$, jugé significativement inférieur ($p < 0,0001$) par rapport à ceux des ELFs ;

-Les valeurs des IC_{50} des ELFs de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, et *Citrus aurantium* sont largement inférieures ($p < 0,0001$) à celui d'ELF d'*Opuntia ficus-indica* ;

-La valeur d' IC_{50} d'ELF de *Vitis vinifera* est significativement la plus faible ($p < 0,0001$) par rapport à celui des autres ELFs (*Punica granatum*, *Citrus aurantium*, *Opuntia ficus-indica*).

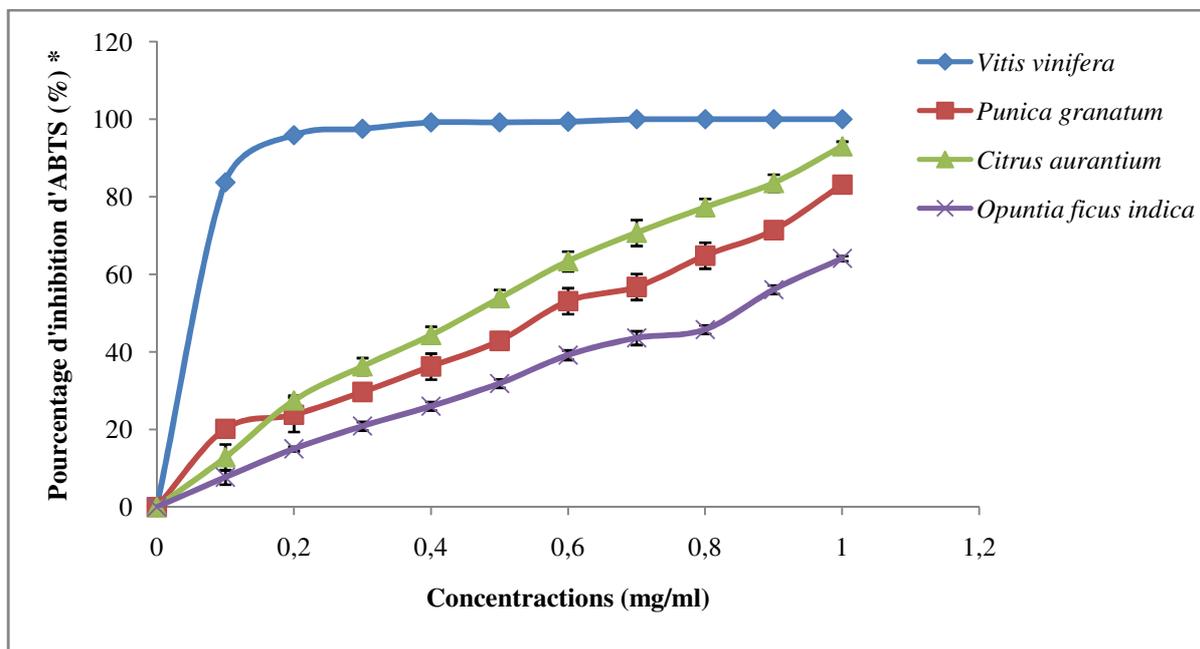
D'après ces résultats, il est évident que les ELFs, notamment ceux de *Vitis vinifera*, *Punica granatum* et *Citrus aurantium* possèdent un pouvoir antiradicalaire vis-à-vis du DPPH qui est relativement élevé par rapport à celui d'*Opuntia ficus-indica*. Le plus important effet inhibiteur est observé dans le cas de l'extrait de *Vitis vinifera* qui reste toutefois significativement moins important que celui du trolox.

Les résultats des IC_{50} des ELFs de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* sont respectivement de l'ordre de $0,27\pm 0,001$ mg/ml et $0,59\pm 0,003$ mg/ml. Ces valeurs sont en accord avec ceux rapportés par Srividya et Chandra (2014) et Safaa *et al* (2010), respectivement pour les extraits des parties comestibles de *Vitis vinifera* ($IC_{50}=0,23$ mg/ml) et *Punica granatum* ($IC_{50}=0,53$ mg/ml). Concernant l'ELF d'*Opuntia ficus-indica*, Mabrouki *et al* (2015) signalent un IC_{50} ($IC_{50}=8,63\pm 1,33$) deux fois plus important que celui obtenu dans notre étude ($IC_{50}=3,52\pm 0,026$). Les travaux de Ghasemi *et al* (2009) et Mazher Asjad *et al* (2013) rapportent des IC_{50} égales à 3,9 mg/ml et 3,7 mg/ml, respectivement. Ces valeurs décrivent des pouvoirs antiradicalaires faibles vis-à-vis du DPPH par rapport à celui mesuré dans notre étude ($IC_{50}=0,81\pm 0,005$ mg/ml).

Les différences observées dans les valeurs des IC₅₀ peuvent être attribuées à plusieurs raisons, notamment à la variation dans la composition chimique d'une plante qui est tributaire des facteurs génétiques et environnementaux (Abou Elella *et al.*, 2014).

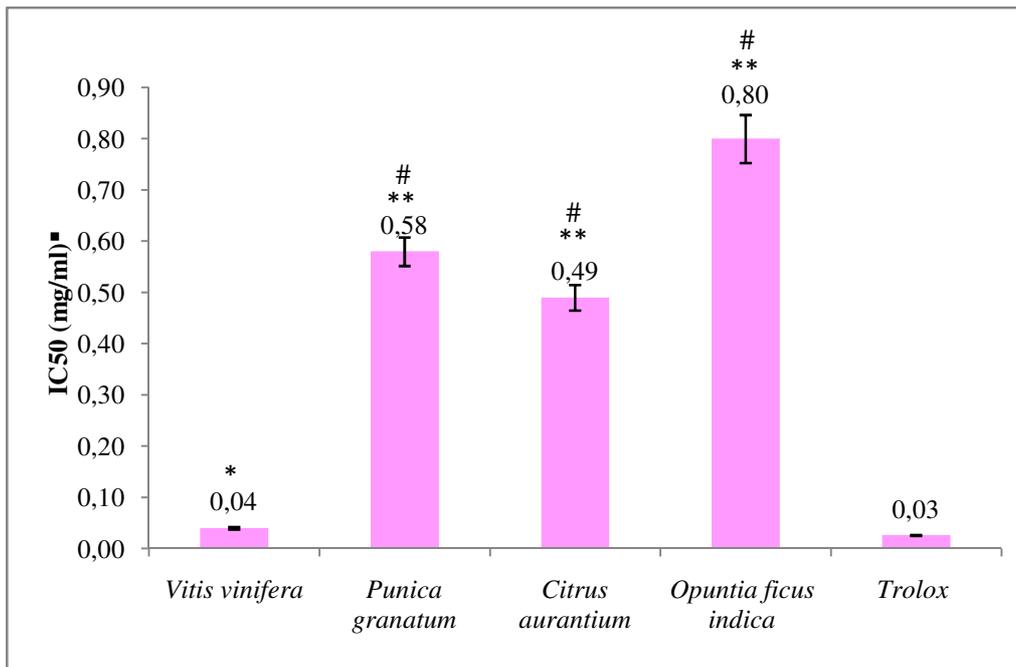
3-2/ Activité antioxydante à l'ABTS

La cinétique de la réduction du radical ABTS^{•+} par les ELF de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* ainsi que les concentrations inhibitrices IC₅₀ sont exprimés dans les figures 43 et 44, respectivement.



*valeurs moyennes de pourcentage d'inhibition d'ABTS ±SD (n=3).

Figure 43: Evolution du pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction des concentrations des ELF.



■ Valeurs moyennes d'IC₅₀±SD (n=3).

* : $p < 0,01$, ** : $p < 0,0001$; valeur comparée au trolox.

: $p < 0,0001$; valeur comparée à l'ELF de *Vitis vinifera*.

Figure 44 : Concentrations inhibitrices (IC₅₀) des ELF's par test d'ABTS.

La lecture des courbes des cinétiques de l'inhibition du radical ABTS^{•+} (figure 43, 44) montre que :

- Les extraits ELF's et le trolox (substance antioxydante témoin) possèdent un pouvoir inhibiteur envers le radical ABTS^{•+};
- L'effet inhibiteur des ELF's est proportionnel aux doses utilisées ;
- L'ELF de *Vitis vinifera* se distingue des trois autres extraits par son effet inhibiteur significativement ($p < 0,0001$) supérieur.

La figure 44 montre que :

- Le trolox (IC₅₀=0,03±0,001 mg/ml) et à un degré moindre l'extrait de *Vitis vinifera* (IC₅₀=0,04±0,0025 mg/ml) possèdent des pouvoirs antioxydant contre le radical ABTS^{•+}, significativement supérieur ($p < 0,0001$) aux autres ELF's;
- Les ELF's d'*Opuntia ficus-indica*, *Punica granatum*, et *Citrus aurantium* montrent des pouvoirs antioxydants plus faibles de 0,80±0,047 mg/ml, 0,58±0,028 mg/ml, 0,49±0,025 mg/ml respectivement.

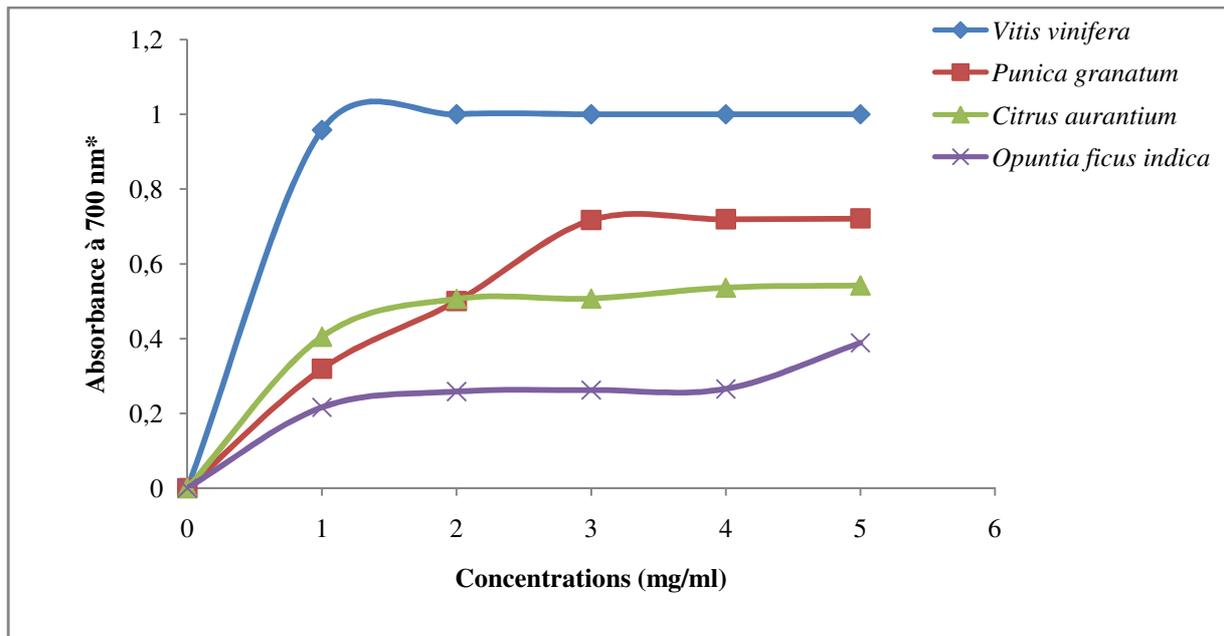
De la cinétique de la courbe de *Vitis vinifera* (fig 43), on peut remarquer que le pouvoir antiradicalaire contre l'ABTS^{•+} dépasse les 80% pour une concentration de 0.1 mg/ml d'ELF, alors que le même seuil d'inhibition est produit avec une concentration proche de trolox, estimée à 0,04 mg/ml. Nos résultats sont confortés par ceux trouvés par Kelebek *et al* (2013) et Hariram *et al* (2015) qui ont montré que l' extrait du fruit de *Vitis vinifera* a un important pouvoir antioxydant vis-à-vis du radical cation ABTS^{•+}.

Le plus faible pouvoir à stabiliser le radical ABTS^{•+} a été enregistré par l'ELF d'*Opuntia ficus-indica* (IC₅₀=0,80±0,0047 mg/ml). Ceci pourrait être expliqué par les relatives faibles teneurs en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes totaux, flavonols totaux, tanins condensés et hydrolysables) trouvées dans l'extrait de ce fruit, comme révélé par les mesures déjà effectuée (tableau XXIII). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Fernandez-Lopez *et al* (2010) qui ont prouvé que l'effet piègeur de l'extrait du fruit d'*Opuntia ficus-indica* s'avère moins actif vis-à-vis du radical cationique ABTS^{•+}. Les ELF de *Punica granatum* et *Citrus aurantium* ont révélé des valeurs d'IC₅₀ comparables, avec toutefois un pouvoir antioxydant légèrement supérieur pour *Citrus aurantium* ($p < 0,05$).

En général, il ressort des résultats de la méthode d'ABTS^{•+} que l'activité antioxydante (exprimés à travers les IC₅₀) est proportionnelle à la teneur en phénols totaux, en flavonoïdes, en flavonols, en tanins condensés et en tanins hydrolysables. Ce qui indique que probablement ces groupes de produits naturels pourraient être associés à cette activité, comme suggéré par d'autres auteurs (Lutz *et al.*, 2011).

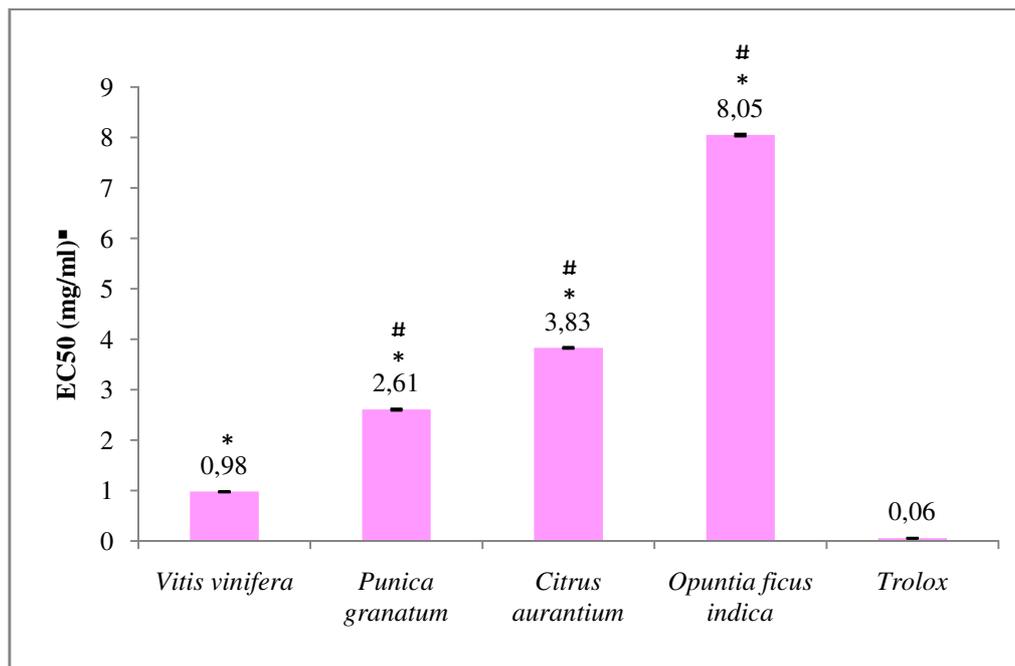
3-3/ Activité antioxydante au FRAP

La cinétique de la réduction du fer ferrique (Fe⁺³) en fer ferreux (Fe⁺²) par les ELF de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* ainsi que les concentrations inhibitrices IC₅₀ sont exprimés dans les figures 45 et 46, respectivement.



*Valeurs moyennes d'absorbance \pm SD ($n=3$)

Figure 45: Cinétique de réduction du fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}) par les ELF.



■ Valeurs moyennes d'EC50 \pm SD ($n=3$).

* : $p < 0,0001$; valeur comparée au trolox.

: $p < 0,0001$; valeur comparée à ELF de *Vitis vinifera*.

Figure 46: Concentration effective (EC₅₀) des ELF et Trolox évaluée par test FRAP.

La lecture des courbes des cinétiques de réduction de fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}) (figure 45, 46) montre que :

- Les extraits ELFs et le trolox (substance antioxydante témoin) possèdent un pouvoir réducteur de fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2});

-L'effet réducteur des ELFs est proportionnel aux doses utilisées ;

-L'ELF de *Vitis vinifera* se distingue des trois autres extraits par son effet réducteur significativement ($p < 0,0001$) supérieur.

-Le trolox (EC_{50} de $0,06 \pm 0,0004$ mg/ml) et l'extrait de *Vitis vinifera* (EC_{50} de $0,98 \pm 0,0061$) possèdent des pouvoirs réducteurs, significativement supérieur ($p < 0,0001$) aux autres ELFs;

-Un pouvoir réducteur modéré à faible est observé pour les ELFs de *Punica granatum* ($\text{EC}_{50} = 2,61 \pm 0,0145$) et *Citrus aurantium* ($\text{EC}_{50} = 3,83 \pm 0,011$) et *Opuntia ficus-indica* ($\text{EC}_{50} = 8,05 \pm 0,023$).

L'ELF de *Vitis vinifera* a enregistré le pouvoir réducteur le plus important, suivi par ceux de *Punica granatum* ($\text{EC}_{50} = 2,61 \pm 0,0145$) et *Citrus aurantium* ($\text{EC}_{50} = 3,83 \pm 0,011$). L'extrait d'*Opuntia ficus-indica* a donné l'effet réducteur le plus faible ($\text{EC}_{50} = 8,05 \pm 0,023$). Le trolox s'est montré plus réducteur que tous les extraits ($\text{EC}_{50} = 0,06 \pm 0,0004$). Des précédents travaux vont dans le sens de nos résultats où l'extrait de *Vitis vinifera* s'est révélé plus réducteur que celui de *Punica granatum* (Srividya et Chandra., 2014). Mabrouki et ses collaborateurs (2015) ont montrés que le fruit les extraits d'*Opuntia ficus-indica* possèdent une EC_{50} de $4,71 \pm 1,09$ mg/ml. La valeur trouvée par cet auteur représente le double de la valeur trouvé dans notre étude pour la même espèce. Cette différence pourrait être expliquée par les possibles fluctuations qu'on peut observer dans la composition qualitative et quantitative d'une même plante, soumises à des facteurs endogènes (génétique) et exogène (climatique) (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Van Acker *et al* 1996 ; Bahorun *et al.*, 2004).

3-4/ Activité antioxydante ORAC

La cinétique de la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence des ELFs de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* est décrite dans la figure 47. Les capacités ORAC (μM trolox équivalent/ g d'extrait) des ELFs à protéger la fluorescéine contre le radical AHP (2-2'-azobis(2-aminopropane dichlorohydrate)) sont exposées dans la figure 48.

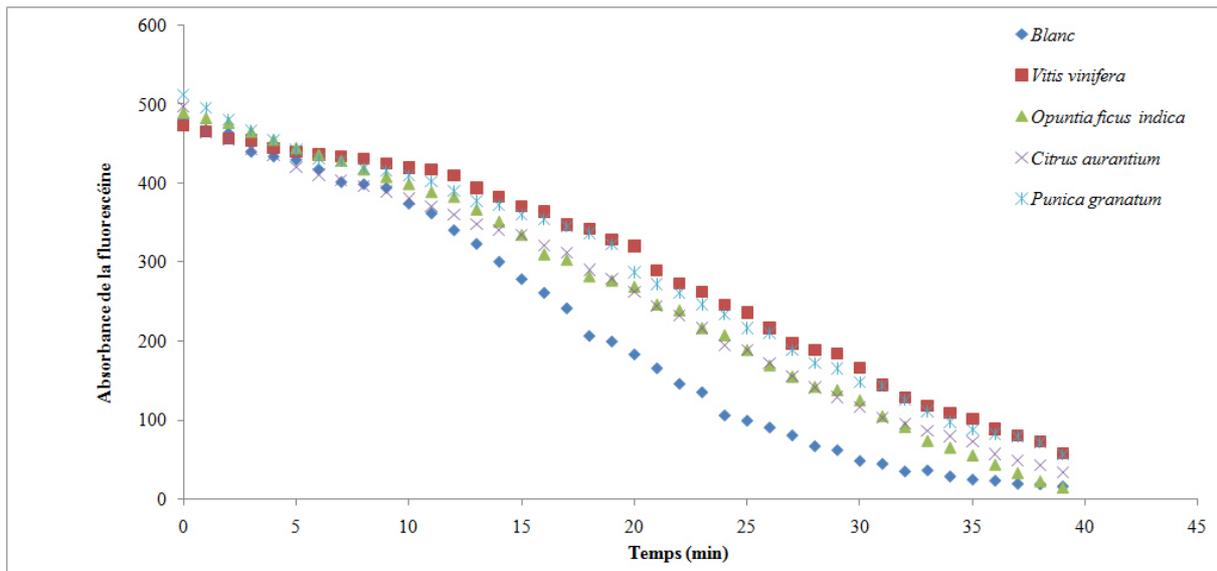
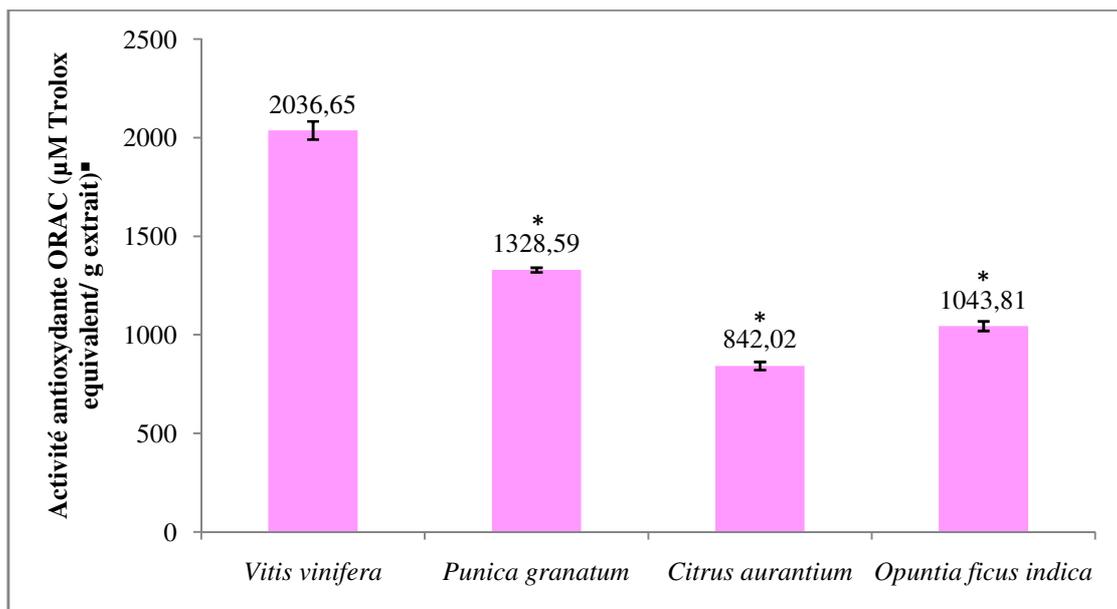


Figure 47 : Cinétique de la décroissance de la fluorescéine induite par AHHP, en présence des ELF.



■ Valeurs moyennes d'ORAC ± SD (n=3).

* : $p < 0,0001$; valeurs comparées à ELF de *Vitis vinifera*.

Figure 48 : Activité antioxydante des ELF par le test ORAC.

La lecture des courbes de la décroissance de la fluorescence et de la valeur ORAC pour les ELF étudiés (figure 47, 48) montre que :

-Globalement à travers l'allure des courbes, il peut être observé que les ELF ralentissent plus la décroissance de la fluorescéine comparés au contrôle (blanc) ;

-L'effet protecteur de la fluorescéine vis-à-vis du radical AHHP est plus visible après un temps d'environ 5 minutes et se maintient jusqu'à la fin de l'expérience ;

-L'ELF de *Vitis vinifera* se distingue des trois autres extraits par son potentiel antioxydant (ORAC=2036,65±46,14 µM TE/g) significativement ($p<0,0001$) supérieur ;

-Un potentiel antioxydant modéré à faible est observé pour les ELFs de *Punica granatum* (ORAC=1328,59±11,72 µM TE/g), *Opuntia ficus-indica* (ORAC=1043,81±24,13 µM TE/g) et *Citrus aurantium* (ORAC=842,02±20,47 µM TE/g).

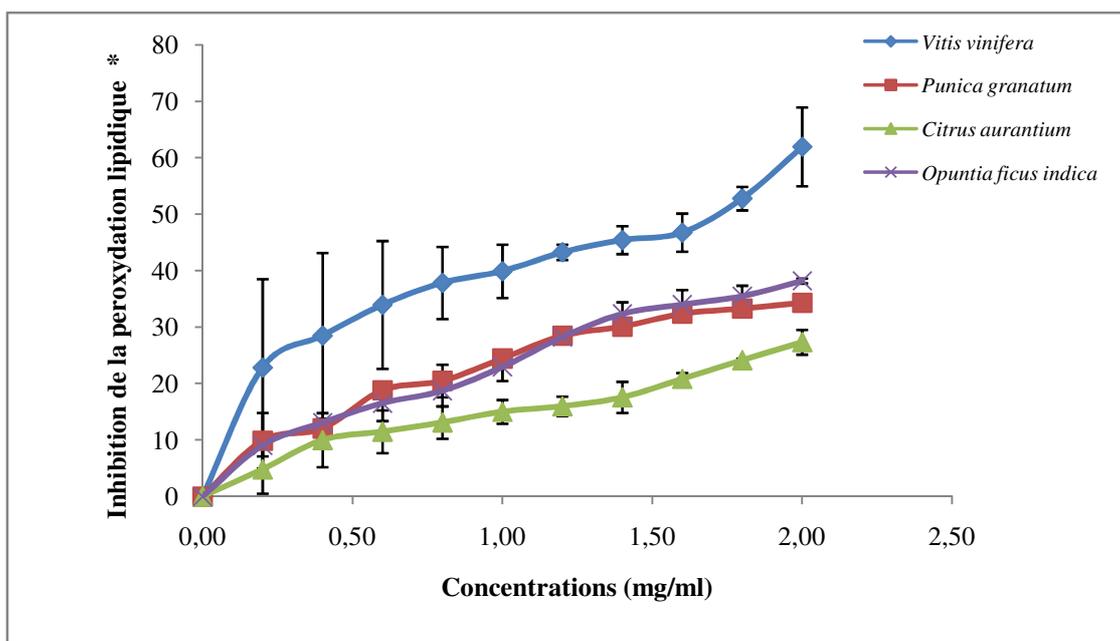
L'activité antioxydante des ELFs de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* a été évaluée en se basant sur la capacité de ces extraits à protéger la fluorescéine et de réduire la vitesse de sa dégradation.

Dans cette évaluation, les valeurs d'ORAC obtenues par l'ELF de *Vitis vinifera* (2036,65±46,14 µM TE/g), place cette espèce comme une bonne source antiradicalaire contre l'AHHP. Ce résultat va dans le sens des conclusions de plusieurs auteurs (Kedage *et al.*, 2007 ; Lutz *et al.*, 2011 ; Kelbek *et al.*, 2013 ; Liang *et al.*, 2014). Ces derniers soulignent la capacité antioxydante importante de l'extrait de *Vitis vinifera* et rapportent les valeurs élevées d'ORAC.

Selon de précédents travaux, les extraits de la peau du fruit d'*Opuntia ficus-indica* a donné une valeur de 42200 µM Tequi/g (Kuti *et al.*, 2004), alors que celui de la pulpe sans graines a présenté une valeur de 9,8±0,01µM TE/g (Albano *et al.*, 2015). La valeur d'ORAC trouvée dans notre étude en utilisant le fruit débarrassé de la peau est de 1041,81 µM TE/g. De ce qui précède, il peut être conclu que la peau constitue une source plus importante en substances antioxydantes comparé aux autres parties testés par notre étude et celle d'Albano *et al* (2015).

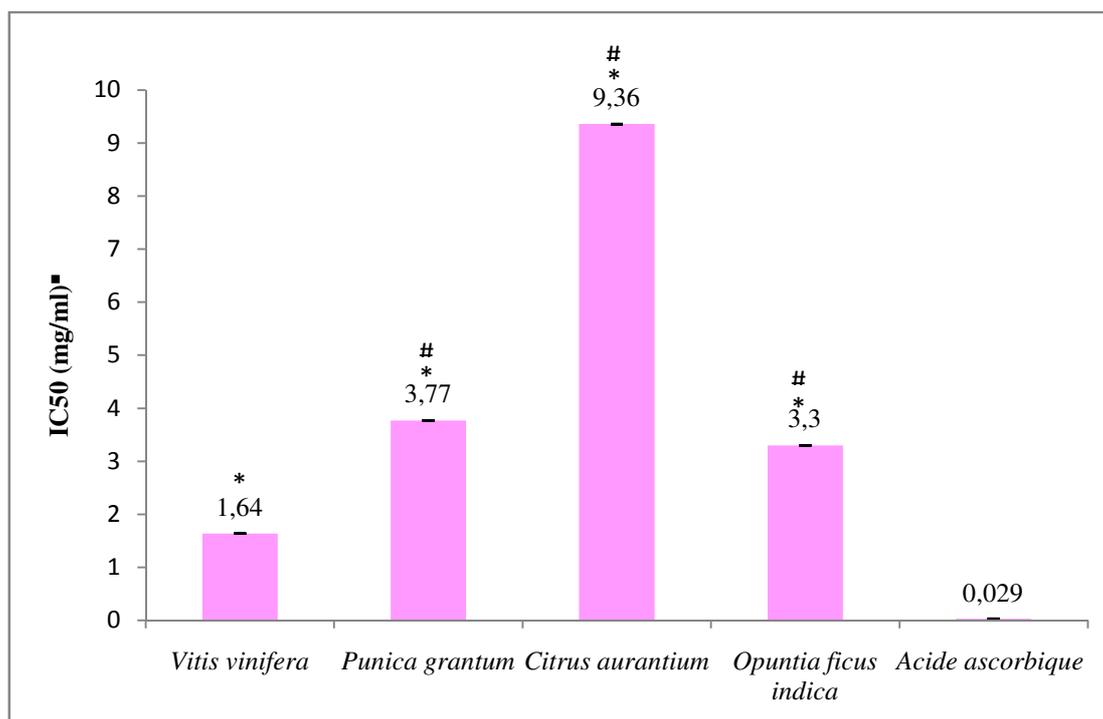
3-5/ Activité antioxydante au TBARS

La cinétique d'inhibition de la peroxydation lipidique en présence des ELFs de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* ainsi que les concentrations inhibitrices IC₅₀ sont exprimés dans les figures 49 et 50, respectivement.



*Les valeurs moyennes d'inhibition de la peroxydation lipidique \pm SD ($n=3$).

Figure 49 : Evolution de l'inhibition de la peroxydation lipidique en fonction des concentrations des ELF.



▪ Valeurs moyennes d'IC₅₀ \pm SD ($n=3$).

* : $p < 0,0001$; valeur comparée à l'acide ascorbique.

: $p < 0,0001$; valeur comparée à ELF de *Vitis vinifera*.

Figure 50 : Concentration inhibitrice (IC₅₀) des ELF par test TBARS.

La lecture des courbes des cinétiques d'inhibition de la peroxydation lipidique ainsi que les IC_{50} des ELF's (figure 49, 50) montre que :

- Les ELF's et l'acide ascorbique (substance antioxydante témoin) possèdent un pouvoir inhibiteur envers la peroxydation lipidique;
- L'effet inhibiteur des ELF's est proportionnel aux doses utilisées ;
- L'ELF de *Vitis vinifera*, a montré le pouvoir inhibiteur ($IC_{50}=1,64\pm 0,029$ mg/ml) supérieur à celui observé pour les ELF's de *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus indica* ;
- Un potentiel antioxydant modéré à faible est observé pour les ELF's de *Punica granatum* ($IC_{50}=3,77\pm 0,182$ mg/ml), *Opuntia ficus-indica* ($IC_{50}= 3,30\pm 0,016$ mg/ml) et *Citrus aurantium* ($IC_{50}=9,36 \pm 0,190$ mg/ml).

La figure 50 montre que :

- Le potentiel antioxydant de l'acide ascorbique ($IC_{50}=0,029\pm 0,0007$ mg/ml) est largement supérieur ($p<0,0001$) à celui des ELF's ;
- La capacité antioxydante d'ELF de *Vitis vinifera* est significativement ($p<0,0001$) supérieure à celle des autres ELF's ;
- Les valeurs obtenues pour les autres ELF's (*Punica granatum* ($IC_{50}=3,77\pm 0,182$ mg/ml), *Opuntia ficus-indica* ($IC_{50}= 3,30\pm 0,016$ mg/ml) et *Citrus aurantium* ($IC_{50}=9,36 \pm 0,190$ mg/ml) sont modérées à faibles

On déduit de ces résultats que l'ELF du fruit de *Vitis vinifera* exprime un caractère antioxydant appréciable, vis-à-vis de la peroxydation lipidique, pour l'ensemble des concentrations étudiées ($p<0,0001$).

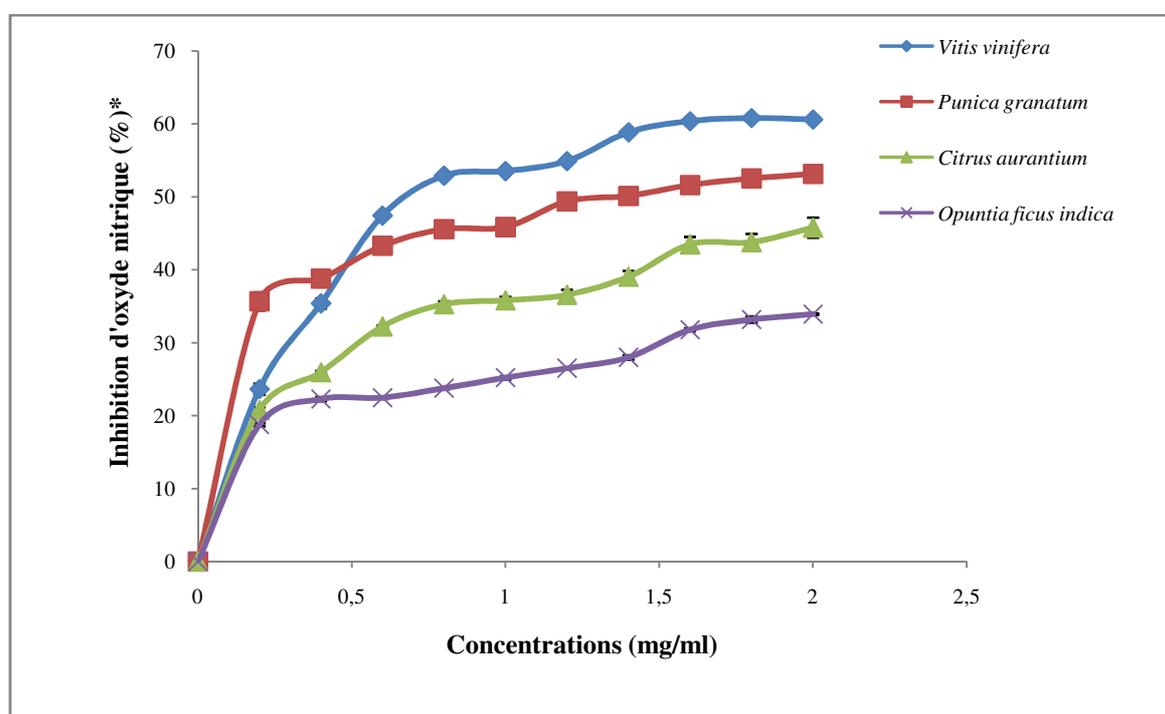
Marcinčáková et son équipe (2012) ont démontré en utilisant le test TBARS que 2 mg/ml de l'extrait de *Vitis vinifera* correspond à une activité antioxydante de l'ordre de $65,88\pm 5,34$ %. Cette valeur est comparable à celle trouvée par notre étude ($61,96\pm 6,99\%$). Pour la même concentration de 2mg/ml, les ELF's de *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* ont montré des valeurs d'inhibition de la peroxydation lipidique comparables, à savoir $34,38\pm 6,88\%$, $35,05\pm 0,78\%$ et $39,44\pm 0,24\%$, respectivement. Toutefois, le pouvoir inhibiteur des ces trois extraits reste au dessous de celui de l'extrait de *Vitis vinifera*

De nombreux travaux entrepris par la littérature ont soutenu la supposition que la capacité de modification de la peroxydation lipidique est strictement liée aux caractéristiques structurales

des antioxydants dont la lipophilie et la structure des composés phénoliques sont parmi les importants facteurs dont découlent les propriétés des antioxydants (Djeridane *et al.*, 2007).

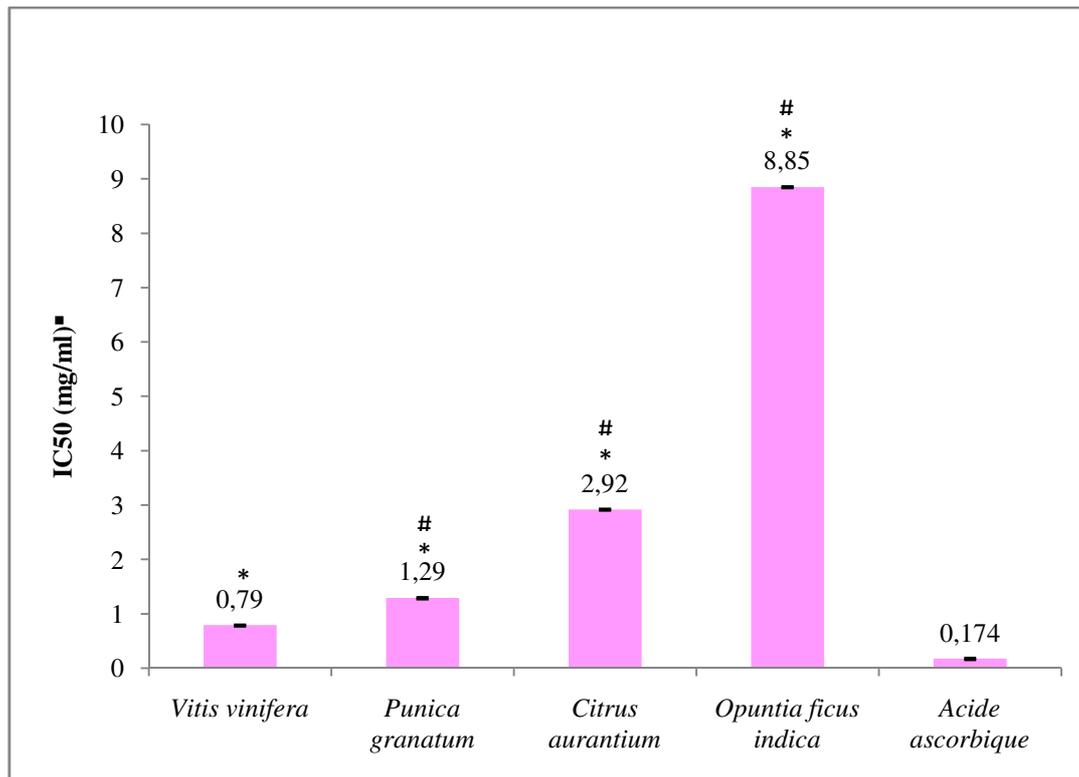
3-6/Activité antioxydante à l'oxyde nitrique (NO•)

La cinétique d'inhibition du radical azoté oxyde nitrique (NO•) en présence des ELF's de *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* ainsi que les concentrations inhibitrices IC₅₀ sont exprimés dans les figures 51 et 52, respectivement.



*Valeurs moyennes d'inhibition du radical azoté oxyde nitrique (NO•) ± SD (n=3).

Figure 51 : Cinétique de l'évolution de l'inhibition du radical azoté oxyde nitrique (NO•) en fonction de la concentration des ELF's.



■ Valeurs moyennes d'IC₅₀±SD (n=3)

* : $p < 0,0001$; valeur comparée à l'acide ascorbique (n=3).

: $p < 0,0001$; valeur comparée à ELF de *Vitis vinifera* (n=3).

Figure 52 : Concentrations inhibitrices (IC₅₀) des ELF's par test NO•.

La lecture des courbes des cinétiques d'inhibition du radical azoté NO• ainsi que les IC₅₀ des ELF's (figure 51, 52) montre que :

- Les ELF's et l'acide ascorbique (substance antioxydante témoin) possèdent un pouvoir inhibiteur envers le radical azoté oxyde nitrique (NO•);
- L'acide ascorbique possède un pouvoir inhibiteur (IC₅₀=0,174±0,016), significativement plus élevé ($p < 0,0001$) par rapport à ceux des ELF's ;
- L'effet inhibiteur des ELF's est proportionnel aux doses utilisées ;
- L'ELF de *Vitis vinifera*, a montré un pouvoir inhibiteur supérieur ($p < 0,0001$) à celui observé pour les ELF's de *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* ;
- Le pouvoir antioxydant enregistré pour les ELF's de *Punica granatum* (IC₅₀=1,29±0,006) et *Citrus aurantium* (IC₅₀=2,92±0,021) sont moindres que celui de *Vitis vinifera*

($IC_{50}=0,79\pm 0,009$) mais reste élevé comparé à *Opuntia ficus-indica* ($IC_{50}=8,85\pm 0,021$), qui a enregistré l'effet le plus faible ;

Les résultats obtenus permettent de déduire que l'ELF de *Vitis vinifera* possède un potentiel supérieur pour inhiber le radical azoté $NO\bullet$. Cette constatation est soutenue par les travaux entrepris dans la littérature, qui montrent que l'extrait de *Vitis vinifera* est un fort inhibiteur de la production du radical oxyde nitrique (Hassan et Nahla, 2010 ; D'Mello *et al.*, 2012).

D'autres auteurs ont également évalué le pouvoir inhibiteur du radical azoté par les ELF de *Punica granatum* et *Opuntia ficus-indica*. Gnanavel and Namasivayam (2015) ont montré que l'ELF de *Punica granatum* est doué d'un pouvoir antioxydant très important vis-à-vis du radical oxyde nitrique ($NO\bullet$). Cependant, les travaux de Saravankumar *et al* (2015) rapportent un potentiel modéré à faible d'ELF d'*Opuntia ficus-indica*. Nos résultats sur les deux extraits confortent cette tendance.

3-7/ Test de toxicité larvaire

Les valeurs de mortalités des larves de crevettes exprimées en pourcentage ainsi que les concentrations létales sont décrites dans le tableau XXIV et le tableau XXV respectivement.

Tableau XXIV : Pourcentage de mortalité des larves de crevettes en fonction des concentrations des ELF.

Extrait	Concentration des ELF (mg/ml)			
	0,1	0,25	0,5	1,0
<i>Vitis vinifera</i>	26,67±5,77	36,67±5,77	50,00±10	53,33±5,77
<i>Punica granatum</i>	6,67±5,77	6,67±5,77	10,00±0,00	20,00±10,00
<i>Citrus aurantium</i>	13,33±5,77	40,00±0,00	80,00±0,00	100,00±0,00
<i>Opuntia ficus-indica</i>	6,67±5,77	6,67±5,77	10,00±0,00	13,33±5,77
Sulfate de cuivre	100	100	100	100
Témoin	0	0	0	0

Tableau XXV : Concentrations létales (LC_{50}) des ELF.

ELF testé	LC_{50} (mg/ml)
<i>Vitis vinifera</i>	0,77±0,13
<i>Punica granatum</i>	> 1
<i>Citrus aurantium</i>	0,37±0,02
<i>Opuntia ficus indica</i>	> 1

En se référant à l'échelle de toxicité établie par Mousseux (1995), rapporté dans le tableau XXVI, les valeurs des LC₅₀ des extraits, sont supérieures à 0,1 mg/ml. Sur la base de cette référence, on peut déduire que les ELF's des espèces testées ne sont pas toxiques. En l'absence de précédentes études, on peut souligner que les extraits des fruits préparés par l'alcool n'induisent pas de toxicité décelable par le test *Brin shrimp*.

Tableau XXVI : Présentation de la correspondance entre LC₅₀ et la toxicité selon Mousseux (1995).

LC ₅₀ (µg/ml)	Toxicité	Symbole
LC ₅₀ ≥ 0,1	Absence	(-)
0,1 > LC ₅₀ ≥ 0,05	Faible	(+)
0,05 > LC ₅₀ ≥ 0,01	Moyenne	(++)
LC ₅₀ < 0,01	Forte	(+++)

3-8/ Evaluation de la toxicité aiguë chez les souris

Les résultats du suivi clinique pendant 14 jours des souris gavées avec différentes concentrations (500, 2500, 5000 et 10000 mg/kg), montrent que les ELF's de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* n'induisent pas de mortalité, ni perturbation dans le comportement (accès à la nourriture) ni perte de poids. L'examen macroscopique des organes vitaux des souris effectué après le sacrifice des animaux à la fin de l'expérience n'a révélé aucun changement morphologique (taille, forme, couleur, poids) des organes des souris traitées (cœur, foie, reins, poumons et rate) en comparaison avec ceux des souris témoins.

Selon l'échelle de toxicité d'Hodge et Sterner (1949) (tableau XXVII), les résultats obtenus de cette étude indiquent que les ELF's de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* sont non toxique chez les souris à la dose maximale de 10000 mg/kg.

Tableau XXVII : Echelle de toxicité des substances d'après Hodge et Sterner (1949).

Classe de toxicité	DL ₅₀ pour la souris ou le rat
Extrêmement toxique	<1 mg/kg
Très toxique	1 à 50 mg/kg
Moyennement toxique	50 à 500 mg/kg
Faiblement toxique	0,5 à 5 g/kg
Pratiquement non toxique	5 à 15 g/kg
Relativement sans danger	>15 g/kg

3-9/ Activité analgésique

Les résultats concernant l'effet analgésique évalué par les tests de torsion, plaque chauffante et immersion de la queue, sont exposés comme suit :

3-9-1/ Test de Torsion

Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau XXVIII

Tableau XXVIII : Réduction du nombre de crampes induites par l'acide acétique chez les lots traités en non traité (contrôle).

Groupes	Affectation	Dose (g/kg)	Nombre de crampes	Pourcentage d'inhibition des crampes (PIC %)
Groupe I	Contrôle	-	94,00±3,03	-
Groupe II	ELF de <i>Vitis vinifera</i>	1,0	59,67±4,76 ^{#■}	36,52±4,76
		2,0	31,33±5,95 ^{#■}	66,67±5,96
		3,0	09,67±1,97 ^{#■}	89,71±1,97
Groupe III	ELF de <i>Punica granatum</i>	1,0	51,33±0,82 ^{#■}	45,39±0,82
		2,0	27,33±5,43 [#]	70,93±5,43
		3,0	12,33±4,41 ^{#■}	86,88±4,41
Groupe IV	Acide acétyl salicylique	0,1	22,50±1,00 [#]	76,06±1,76

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm SD (Tukey HSD-test, n=6). [#] $p<0,0001$: par comparaison au témoin négatif. [■] $p<0,01$, ^{■■} $p<0,0001$: par comparaison à l'acide acétyl salicylique. PIC : pourcentage d'inhibition des crampes.

Il ressort de la lecture des données que :

-L'effet de l'injection par voie intrapéritonéale de l'acide acétique (1%) provoque au bout d'une période de 20 minutes une moyenne de campes égales à 94,00±3,03 chez le lot témoin ;

-Le nombre de crampes diminue significativement ($p<0,0001$) par rapport au contrôle, chez les lots de souris traités avec les ELF's et l'acide acétyle salicylique ;

-L'effet analgésique provoqué par les ELF's est dose dépendant ;

-L'effet analgésique provoqué par l'acide acétyle salicylique à une dose de 0,1 g/kg, est significativement supérieur à celui des ELF's de *Vitis vinifera* et de *Punica granatum* administrés à (1,0 et 2,0 g/kg) et (1,0 g/kg), respectivement;

-L'effet analgésique des ELF de *Vitis vinifera* (administrés à une dose >2,0 g/kg) et de *Punica granatum* (3,0 g/kg) s'est révélé significativement supérieur ($p<0,0001$) par rapport à l'acide acétyl salicylique (0,1 g/kg) ;

-Aucune différence significative dans la réduction des contractions n'est observée entre les lots traités par *Vitis vinifera* comparé à celui traité par *Punica granatum* aux doses de 2,0 et 3,0 g/kg. Cette différence est toutefois visible ($p<0,05$) à la dose de 1,0 g/kg, en faveur de *Vitis vinifera*.

3-9-2/ Tests de plaque chauffante et immersion de la queue

L'évaluation de l'effet analgésique des ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* et de l'acide acétyl salicylique ont été faites par les tests de plaque chauffante et immersion de la queue. Les résultats de ces évaluations sont exprimés dans le tableau XXIX

Tableau XXIX : Temps de réaction à une excitation thermique pour les lots traités et non traité (contrôle).

Groupes	Affectation	Doses (g/kg)	Temps de réaction (secondes)	
			Test de plaque chauffante	Test d'immersion de la queue
Groupe I	Contrôle	-	02,98±0,47	02,12±0,51
Groupe II	ELF de <i>Vitis vinifera</i>	1,0	03,16±0,82	02,38±0,61
		2,0	04,17±1,09	02,43±0,60
		3,0	12,77±2,79 ^{△△△##}	03,06±1,32
Groupe III	ELF de <i>Punica granatum</i>	1,0	04,13±0,60 [#]	02,39±0,49
		2,0	10,32±1,27 ^{△△△##§§}	03,31±0,96 [△]
		3,0	16,18±1,02 ^{△△△##§}	03,90±0,51 ^{△△}
Groupe IV	Acide acétyl salicylique	0,1	1,92±0,61 ^{△△}	2,80±1,17

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SD (Tukey HSD-test, n=6). ([△] $p<0,05$, ^{△△} $p<0,01$, ^{△△△} $p<0,001$): valeur vs contrôle ; ([#] $p<0,05$, ^{##} $p<0,001$): valeur vs acide acétyl salicylique. ([§] $p<0,01$, ^{§§} $p<0,0001$): valeur vs *Vitis vinifera*.

A la lecture des résultats :

a) Pour le test de la plaque chauffante, on peut remarquer que :

-Le temps de réaction dans le lot contrôle est de $2,98 \pm 0,47$ secondes

-Le temps de réaction du lot traité par l'acide acétyl salicylique à une dose de 0,1 g/kg est significativement inférieur à celui du contrôle ($p < 0,01$) ;

-L'ELF de *Punica granatum* a allongé d'une façon significative ($p < 0,0001$) le temps de réponse au stimulus thermique produit par la plaque chauffante, et ceci à une dose ($\geq 2,0$ g/kg). Alors que le même effet ne s'est produit pour *Vitis vinifera* qu'à une dose égale à 3,0 g/kg.

b) Pour le test d'immersion de la queue, on peut noter :

-Le temps de réaction dans le lot contrôle est de $2,12 \pm 0,51$ secondes

-Le temps de réaction du lot traité par l'acide acétyl salicylique à une dose de 0,1 g/kg est comparable à celui du contrôle ;

-Le lot traité par l'ELF de *Punica granatum* a montré un temps de réaction significativement plus important que celui du lot contrôle, et ceci à des doses de ($\geq 2,0$ g/kg).

Les données expérimentales obtenues par le test de la plaque chauffante, montrent que les ELF de *Punica granatum* et *Vitis vinifera* exercent un effet analgésique significatif comparé au contrôle. Toutefois, la première espèce exerce son effet dès 2,0 g/kg alors que l'effet de la seconde espèce se manifeste à une dose de 3,0 g/kg.

En ce qui concerne le test d'immersion de la queue, seul l'ELF de *Punica granatum* s'est montré doué d'un effet analgésique significatif par rapport au contrôle et ceci à une dose $\geq 2,0$ g/kg.

Selon les résultats de ces deux tests, il peut être déduit que l'ELF de *Punica granatum* possède un effet analgésique significativement supérieur à celui de *Vitis vinifera*.

Finalement, il est utile de souligner que dans notre cas, la dose de 0,1 g/kg d'acide acétyl salicylique, utilisée par plusieurs auteurs (Okpo *et al.*, 2001 ; Fadeyi *et al.*, 2004 ; Hamid *et al.*, 2004), s'est révélée dans notre étude inefficace à réduire la douleur et ceci dans les deux tests (plaque chauffante et immersion de la queue). Jacob et son équipe (2013) ont rapporté que l'acide acétyl salicylique agirait contre la douleur plutôt à des concentrations de l'ordre de 0,3 g/kg. Notre choix porté sur cette dose apparemment faible, nous a pas permis de procéder

à une comparaison du potentiel analgésique de nos extraits vis-à-vis d'une substance active témoin.

A l'exception de *Punica granatum*, aucune partie du fruit de *Vitis vinifera* n'a fait l'objet d'étude de l'activité analgésique. Bensaad *et al* (2013), Saad *et al* (2014) et Lamees et kah (2015) ont montré que l'extrait du fruit de *Punica granatum* a exercé une activité analgésique.

Notre étude a conclut que les ELF's de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* ont un effet analgésique central modéré dont l'action se fait au niveau périphérique, et cela peut être lié à l'activité antioxydante qui inhibe les médiateurs de la douleur. Les résultats phytochimiques effectués ont permis de mettre en évidence la présence de nombreux composés phénoliques, notamment des acides phénoliques, des flavonoïdes. Ces substances sont douées d'activité antiradicalaire et anti inflammatoire importantes (Jyoti *et al.*, 2009 ; Saad *et al.*, 2014). A ce titre, ils peuvent inhiber la production de Prostaglandine par blocage des enzymes spécifiques telles que les cyclooxygénases impliquées dans la genèse de la douleur (Le Bars *et al.*, 2001 ; Ferreira *et al.*, 2002 ; Negus *et al.*, 2006 ; Murshid *et al.*, 2014).

3-10/ Evaluation de l'effet cicatrisant des ELF's

Les ELF's de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* ont fait l'objet d'une évaluation de leur activité cicatrisante sur des plaies d'excision et brûlures pratiqués sur des lapins Néo-zélandais. L'effet des extraits est comparé par rapport à une pommade cicatrisante commerciale (Cicatryl®).

Les résultats obtenus de l'évolution de la cicatrisation des plaies d'excision, après application journalière des extraits, sont exprimés dans la figure 53 et le tableau XXX.

Progression de la contraction des plaies d'excision en fonction des jours

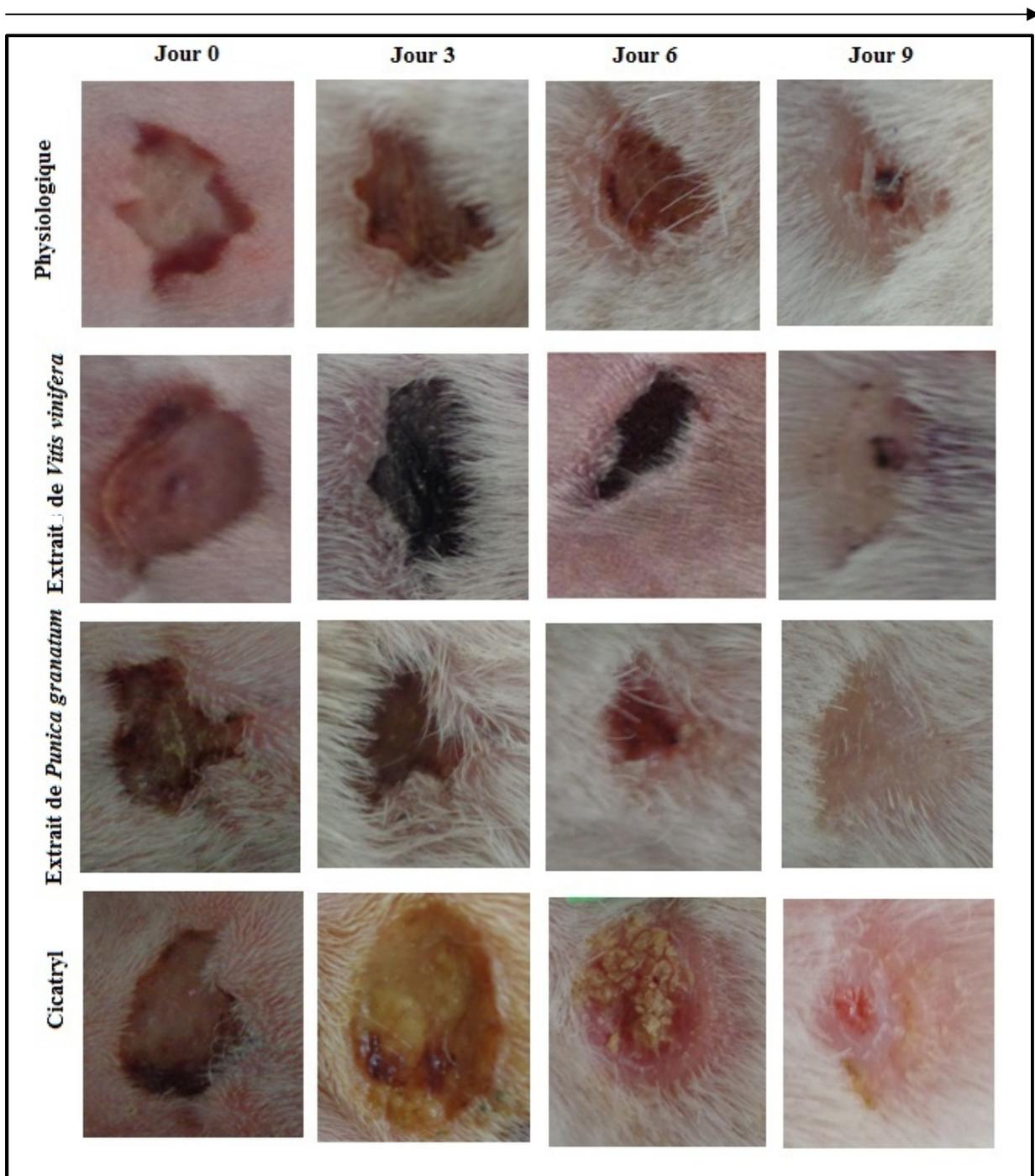


Figure 53 : Chronologie de la cicatrisation des plaies d'excision traitées et non traitées (contrôle) chez le lapin.

Tableau XXX: Evolution de la contraction des plaies d’excision chez le lapin traité et non traité.

		Contraction des plaies d’excision exprimée en % ^Δ		
Groupe	Affectation	Jour 3	Jour 6	Jour 9
Groupe I	Non traité	2,59±0,24	33,26±0,59	77,86±0,48
Groupe II	ELF <i>Vitis vinifera</i>	20,84±2,95 ^{#■}	44,52±1,36 ^{#■§}	92,03±0,58 ^{#■§}
Groupe III	ELF <i>Punica granatum</i>	21,96±2,48 ^{#■}	65,01±2,77 ^{#■}	100±0,00 ^{#■}
Groupe IV	Cicatryl [®]	9,67±2,42 [#]	49,32±2,07 [#]	81,18±0,74 [#]

^Δ Valeur moyenne ± écart type (n=6) ; [#] p<0,0001 vs contrôle ; [■] p<0,0001 vs Cicatryl[®] ;
[§] p<0,0001 vs *Punica granatum*.

Il ressort de la lecture du tableau XXX et de la figure 51 que :

- Les groupes traités par les deux extraits et la pommade Cicatryl[®] montrent une contraction des plaies plus rapide (à J3, J6 et J9) que celle observée dans le groupe contrôle ;
- A l’exception du groupe II à J6, les groupes traités par les ELF *Vitis vinifera* et *Punica granatum* montrent une progression de la cicatrisation plus rapide (p<0,0001) que celle observée pour le groupe témoin traité par Cicatryl[®] ;
- A partir de J6, la contraction des plaies est plus rapide dans le groupe traité par l’ELF de *Punica granatum* par rapport à celui de *Vitis vinifera* (p<0,0001).

Les résultats obtenus de l’évolution de la cicatrisation des brûlures, après application quotidienne des extraits, sont exprimés dans la figure 54 et le tableau XXXI.

Progression de la contraction des plaies de brûlures en fonction des jours

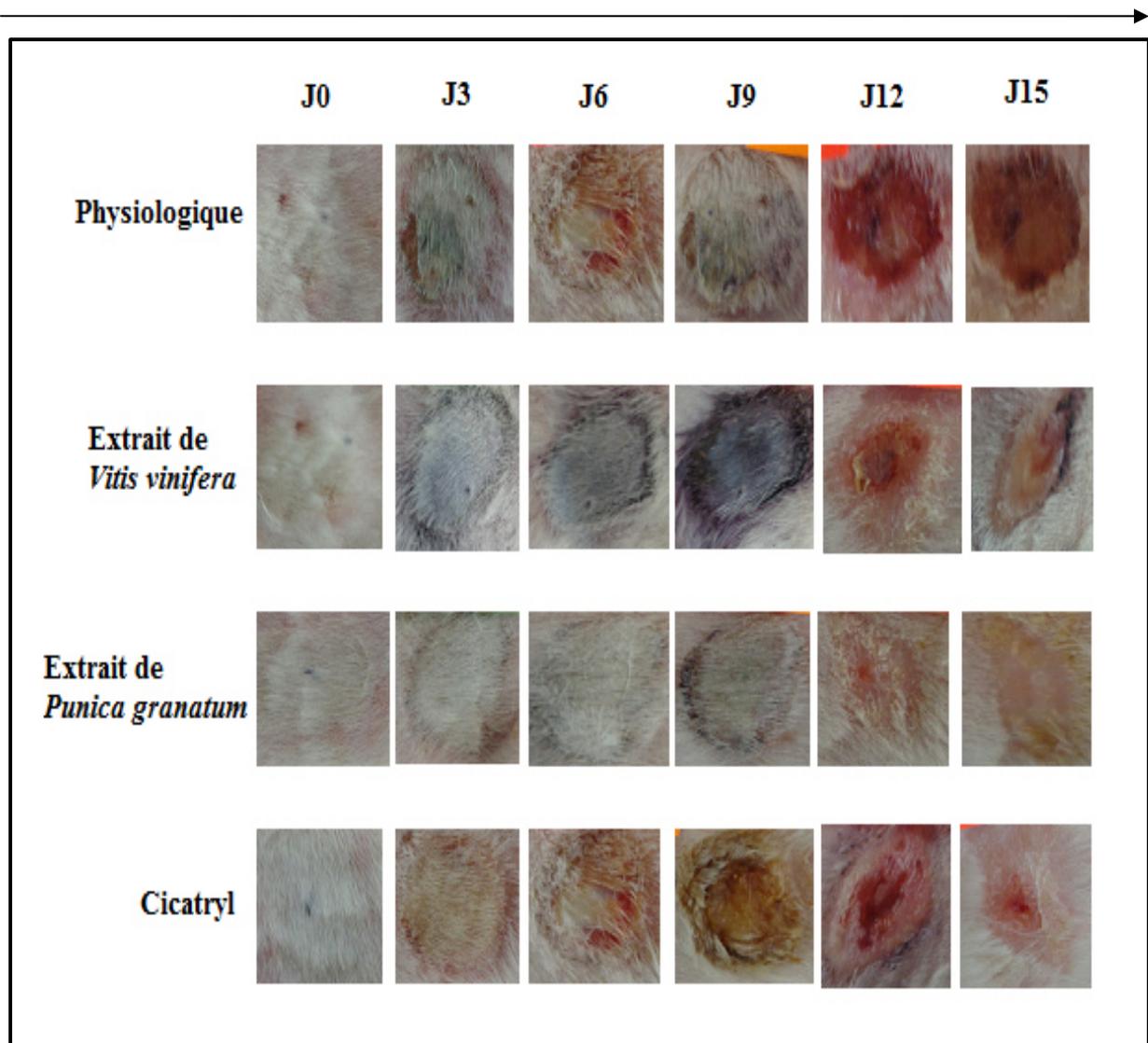


Figure 54 : Chronologie de la cicatrisation des brûlures traitées et non traitées (contrôle) chez le lapin.

Tableau XXXI: Evolution du pourcentage de contraction des plaies de brûlure chez le lapin traité et non traité.

		Contraction des plaies de brûlure exprimée en % ^Δ				
Groupe	Affectation	Jour 3	Jour 6	Jour 9	Jour 12	Jour 15
Groupe I	Contrôle	5,89± 1,64	11,91± 1,39	12,92± 1,37	30,12± 0,99	38,35± 0,72
Groupe II	ELF de <i>Vitis vinifera</i>	10,53± 2,15*■	18,94± 1,50**■§	20,76± 1,60**■§	65,56± 0,76**■§	93,55± 0,83**■§
Groupe III	ELF de <i>Punica granatum</i>	13,46± 3,31**■	23,73± 2,47**■	26,66± 2,81**■	76,59± 0,80**■	100,00± 0,00**■
Groupe IV	Cicatryl [®]	6,53± 0,80	7,35± 0,99*	20,88± 0,64**	53,23± 0,00**	78,12± 0,47**

^Δ valeur moyenne ± écart type ; * $p < 0,001$, ** $p < 0,0001$ valeur vs contrôle ; ■ $p < 0,05$, ■■ $p < 0,0001$ valeur vs Cicatryl[®] ; § $p < 0,0001$ valeur vs *Punica granatum*.

Il ressort de la lecture de la figure 54 du tableau XXXI que :

-Les groupes traités par les ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* et par Cicatryl[®] montrent d'une façon générale sur la période de traitement, une contraction des plaies de brûlures plus rapide par comparaison au contrôle. Toutefois, l'effet des ELF est significatif dès le 3^{ème} jour alors que celui de Cicatryl[®] est visible à partir du 6^{ème} jour ;

-Sur toute la période (J3→J15) les groupes traités par les ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* montrent une cicatrisation plus rapide que celle observée dans le lot traité par Cicatryl[®] ;

-Le lot traité par l'ELF de *Punica granatum* montre une contraction des plaies plus rapide ($p < 0,0001$) que celle observée avec l'ELF de *Vitis vinifera*. La fermeture des plaies (100% de contraction) est atteinte dès le 15^{ème} jour pour le lot traité par l'ELF de *Punica granatum* alors que celui du lot traité avec l'ELF de *Vitis vinifera* n'a atteint que 93%.

Aucune des plantes étudiées n'a fait l'objet d'une évaluation de son potentiel cicatrisant. A la lecture des résultats de l'évolution de la cicatrisation des plaies d'excision et de brûlures, il peut être observé que l'ELF de *Punica granatum* présente un effet cicatrisant significativement supérieur ($p < 0,0001$) à celui de *Vitis vinifera*. A la lumière des résultats obtenus, il ressort que les ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* ont montré une activité cicatrisante supérieure à celle de la crème Cicatryl[®], ceci est interprété par une diminution de la phase inflammatoire, une favorisation de la contraction des plaies et une réduction de la

période d'épithélialisation. Le mécanisme d'action peut être affecté par certaines substances bioactives ayant un effet cicatrisant et doués d'un potentiel antioxydant. Selon Martin (1996) et Palmeri *et al* (1995) les antioxydants qui réduisent les radicaux libres sont capables d'empêcher la dépréciation au niveau cellulaire par inhibition de l'inflammation qui conduit à l'appauvrissement de collagène, en offrant ainsi une protection contre les dommages de la peau.

3-11/ Evaluation de l'activité antihyperlipidémiant des ELF

Les ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* ont fait l'objet d'une étude *in vivo* chez des souris suralimentées en lipides (huile de tournesol) pour évaluer leur activité antihyperlipidémiant. Les résultats sont exprimés dans le tableau XXXII.

Tableau XXXII: Influence des ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* sur le profil lipidique des souris.

		Paramètres biochimiques (g/l) ⁰			
Groupe	Affectation	Triglycéride	Cholestérol	C-HDL	C-LDL
Groupe I	contrôle positif	2,16±0,11	3,83±0,10	0,27±0,02	2,38±0,08
Groupe II	contrôle négatif	1,18±0,07*	2,05±0,13*	0,47±0,06*	1,37±0,06*
Groupe III	ELF <i>V.vinifera</i> (0,1 g/kg)	0,95±0,05* [■]	1,85±0,09* [■]	0,55±0,04*	1,28±0,05*
Groupe IV	ELF <i>V. vinifera</i> (0,5 g/kg)	0,67±0,03* [■]	1,59±0,10* [■]	0,62±0,04*	1,10±0,09*
Groupe V	ELF <i>P. granatum</i> (0,1 g/kg)	0,87±0,04*	2,00±0,09*	0,55±0,04*	1,27±0,07*
Groupe VI	ELF <i>P. granatum</i> (0,5 g/kg)	0,54±0,04*	1,41±0,07*	0,64±0,04*	1,04±0,09*

Contrôle positif : souris en hyperlipidémie, **Contrôle négatif** : souris normales (ne recevant pas d'huile de tournesol), ⁰ valeur moyenne ± SD (Tukey HSD-test, n=6). * p<0,0001 : valeur vs contrôle positif. [■] p<0,05, [■] p<0,01: valeur vs *Punica granatum*.

L'analyse des résultats fait ressortir que :

-Les souris (contrôle positif) ayant reçu de l'huile de tournesol montre une hyperlipidémie (triglycéride, cholestérol, C-LDL et C-HDL) significative (p<0,0001) par rapport aux souris normales (contrôle négatif) ;

-Les lots traités par les ELF de *Vitis vinifera* et de *Punica granatum* ont montré une baisse significative ($p < 0,0001$) dans le taux des triglycérides, cholestérol, C-LDL et une augmentation significative ($p < 0,0001$) du taux de C-HDL par rapport au lot contrôle positif ;

-L'effet antihyperlipidémique des ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* est dose dépendant (0,1 g/kg et 0,5 g/kg) ;

-Les lots traités par 0,5 g/kg et 0,1 g/kg de l'ELF de *Punica granatum* ont montré des taux de triglycérides et cholestérol plus bas que ceux traités par les mêmes doses de l'ELF de *Vitis vinifera* ;

- Les lots traités par 0,5 g/kg et 0,1 g/kg de l'ELF de *Punica granatum* ont montré des taux de C-LDL et C-HDL comparables à ceux traités par les mêmes doses de l'ELF de *Vitis vinifera*.

Nos résultats concordent avec ceux de Masani et ses collaborateurs (2012) qui confirment que la consommation du jus du fruit de *Vitis vinifera* à raison de 0,1 et 0,5 g/kg, chez des souris rendues hyperlipidémiantes, diminue significativement les taux de triglycéride, du cholestérol et de C- LDL et augmentent le taux de C-HDL. Bhaskar et kumar (2012) et Sarker et son équipe (2012) confirment aussi l'influence des extraits des fleurs de *Punica granatum* sur le bilan lipidique des souris hyperlipidémiques par une réduction significative des taux de triglycéride, du cholestérol et C- LDL et une augmentation du taux de C-HDL.

De nombreux auteurs ont signalé que la consommation des substances riches en composés phénoliques améliore les profils lipidiques et lipoprotéiques, ce qui permettrait de prévenir les maladies cardiovasculaires et de réduire le risque d'athérosclérose (Martin et Andriantsiitohaina., 2002 ; Awika et Rooney Lloyd., 2004).

*Conclusion
générale*

Conclusion générale

Il est bien établi que les fruits constituent une source concentrée de composants avec des effets bénéfiques pour la santé humaine. Selon l’OMS, la consommation régulière de fruits, éventuellement de légumes, peut contribuer à réduire les facteurs de risque du cancer, des maladies cardiovasculaires, métaboliques et neuro-dégénératives.

La présente étude s’inscrit dans le cadre de la valorisation d’agroressources par leurs caractérisations moléculaires et leurs activités biopharmaceutiques. Elle s’intéresse particulièrement à quatre fruits cultivés localement ; il s’agit de *Vitis vinifera* L, *Punica granatum* L, *Citrus aurantium* L et *Opuntia ficus-indica* L.

Sur le volet phytochimique, l’analyse par HPLC a révélé la richesse des extraits des fruits étudiés en composés phénoliques, notamment en acides phénoliques et en flavonoïdes. L’analyse quantitative montre que les taux des phénols totaux, flavonoïdes et flavonols totaux, tanins condensés et hydrolysables d’ELF de *Vitis vinifera* sont significativement plus importants que ceux des autres fruits. D’autre part, l’extrait hydroalcoolique du fruit d’*Opuntia ficus-indica* s’est révélé contenir les quantités les plus faibles en ces constituants phénoliques.

Les résultats de l’analyse par HPLC-DAD/MS d’ELF de *Vitis vinifera* a montré un profil dominé par le resvératrol hexoside I (12,75%), l’acide caftarique (12,66%), l’acide *p*-coumarique hexoside (8,05%), l’acide dicaféoyl tartrique (7,25%), les dérivés de la quercétine (14,73%).

L’ELF de *Punica granatum* a révélé la présence dominante d’une coumarine dérivé de bargaptène (39,39%), de glycosides de la quercétine et de l’isorhamnétine ainsi que des dérivés d’acides vanillique, citrique et *p* coumarique. L’ELF de *Citrus aurantium* a montré la prédominance d’acide diféruloyl sinapique (22,02%), quercétine caféoyl glucosyl glucoside (12,52%), naringénine 7-O-rutinoside (12,27%) et la rutine (10,42%), en plus des dérivés de l’acide quinique. Le fruit d’*Opuntia ficus-indica* s’est révélé quant à lui particulièrement riche en acides phénols, notamment les acides quinique I (20,89%), caféoyl benzoïque (20,21%), et piscique (13,94%).

A travers cette analyse phytochimique, il peut être conclu que l’ELF de *Vitis vinifera*, qui s’est révélé relativement riche en composés phénoliques, par rapport aux autres ELF, pourrait constituer une source potentielle d’antioxydants.

Sur le volet biopharmacologique plusieurs activités ont été étudiées, à savoir les activités antioxydante, analgésique, cicatrisante et antihyperlipidémiant.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant les différents essais (DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, ORAC, TBARS, NO[•]) a montré que le potentiel inhibiteur envers les radicaux libres d'ELF de *Vitis vinifera* est le plus important comparé aux autres extraits. Ceci peut être corrélé avec sa teneur élevée en différents groupes de composés phénoliques, comme révélée par les précédentes analyses phytochimiques. L'ELF de *Punica granatum* s'est montré aussi doué d'un potentiel antioxydant qui reste toutefois moins important que celui de l'espèce précédente. Les autres extraits de *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* ont révélé des effets antiradicalaires modestes par rapport aux précédents extraits.

Au regard du potentiel antiradicalaire important, Les ELFs de *Vitis vinifera* et *Punica granatum*, ont été sélectionnés pour subir une évaluation de leur activités analgésique, cicatrisante, et antihyperlipidémiant.

Les ELFs de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* ont montré un effet analgésique sur les trois tests (torsion, plaque chauffante, immersion de la queue) par rapport au contrôle. Toutefois, le potentiel à réduire la douleur des deux extraits s'est révélé statistiquement comparable et s'est manifesté surtout dans le test de la torsion. Ce qui suggère que les deux extraits possèdent des phyto-constituants qui suppriment la douleur au niveau périphérique.

En plus, notre étude a conclu que les ELFs de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* ont un effet analgésique central modéré dont l'action se fait au niveau périphérique. Ceci peut être lié à l'activité antioxydante qui inhibe les médiateurs de la douleur.

D'autre part, les résultats de l'évaluation de l'activité cicatrisante chez le lapin ont montré que l'ELF de *Punica granatum* et un degré moindre celui de *Vitis vinifera* accélèrent le processus de cicatrisation des plaies d'excision et des brûlures par rapport au contrôle. Le pouvoir de ces plantes s'est révélé même supérieur à celui d'une crème cicatrisante commerciale (Cicatryl[®]).

A la lecture des résultats de l'activité antihyperlipidémiant, on a noté que les souris rendues expérimentalement dans une situation d'hyperlipidémie, ont vu leur profil lipidémique se normalise par rapport au contrôle.

Les résultats de la toxicité aiguë chez la souris démontrent l'innocuité des ELFs de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* pris *per os* à la dose maximale de 10 g/kg. Ce résultat est

conforté par l'évaluation *in vitro* de la cytotoxicité par le test d'*Artemia salina*, où les valeurs de DL50 sont considérées comme non toxique.

En conclusion, cette étude nous a permis,

-Sur le volet chimique :

D'établir la richesse des ELF's des plantes étudiées en composés phénoliques particulièrement l'extrait des fruits de *Vitis vinifera* ; ce dernier pourrait être exploité comme source potentiel d'antioxydant.

-Sur le volet pharmacologique :

Les évaluations expérimentales *in vitro* sur des biotests normalisés (DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, ORAC, TBARS, NO[•]) a permis de mettre en évidence un potentiel antiradicalaire pour les quatre extraits. Ceci est particulièrement notable pour l'ELF de *Vitis vinifera* et de *Punica granatum*. Les extraits de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* se sont par ailleurs, révélés aussi doués d'effet analgésique, cicatrisant et antihyperlipidémiant sur des modèles animaux.

-Sur le volet toxicologique :

Les ELF's de *Vitis vinifera* et de *Punica granatum* sont dénués de toxicité à court terme comme révélé par l'absence de signes toxiques à une dose maximale de 10 g/kg.

En perspective, il serait intéressant d'approfondir les investigations phytochimiques, toxicologiques et biologiques des fruits de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* afin de s'assurer de leur innocuité, de mettre en évidence d'autres activités bénéfiques pour la santé et de caractériser leurs principes actifs. Ces travaux complémentaires permettront éventuellement une phytostandardisation ultérieure, critère indispensable à la valorisation industrielle de ces produits en tant que compléments alimentaires à allégation de santé.

Cette proposition est confortée par le fait que ces deux espèces sont des espèces alimentaires et que les études que nous avons effectuées mettent en évidence, entre autres vertus, des pouvoirs antioxydants et antihyperlipidémique, et l'absence de toxicité à court terme.

*Références
bibliographiques*

1. **Abou-Elella F.M and Farouk Mohammed Ali R.** 2014. Antioxidant and anticancer activities of different constituents extracted from Egyptian prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica*) peel. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 3(2): 1-9.
2. **Adesegun S.A., Fajana A., Orabueze C.I and Coker H.A.B.** 2007. Evaluation of antioxidant Properties of *Phaulopsis Fascispsepala* CBCI (Acanthaceae). *Oxford Journal*. 6: 227-213.
3. **Aganga A.A and Mosase K.W.** 2001. Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capussa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 107-113.
4. **Alaerts G., Pieters S., Logie H., Van Erps J., Merino-Arévalo M., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J and Vander Heyden Y.** 2014. Exploration and classification of chromatographic fingerprints as additional tool for identification and quality control of several *Artemisia* species. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 95: 34-46.
5. **Albano C., Negro C., Tommasi N., Gerardi C., Mita G., Miceli A., De Bellis L and Blando F. B.** 2015. Phenols and antioxidant capacity in Cactus pear (*Opuntia ficus indica* L Mill) fruits from Apulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*. 4: 269-280.
6. **Ambigaipalan P., Costa de camargo A and Shahidi F.** 2017. Identification of phenolic antioxidants and bioactives of pomegranate seeds following juice extraction using HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Food chemistry*. 221:1883-1894.
7. **Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D and Trinajstić N.** 2003. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta ccaaa*.76 (1): 55-61.
8. **Araba M.** 2000. Les *Opuntias* à fruits comestibles dans certaines régions du Maroc. Actes IIème journées National de culture de cactus. El Kelaa des Sraghna. Maroc.
9. **Awika J.M and Rooney Lloyd W.** 2004. *Sorghum* phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*. 65: 1199-1221.

10. **Ayoola G.A., Coker H.A.B., Adesegun S.A., ADepeju-Bello K.O., Ezennia E.C and Atangbayila T.O.** 2008. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of some selected Medicinal plants used For Malaria Therap in southwestern Nigeria. *Tropical journal of pharmaceutical research.* 7(3): 1019-1024.
11. **Babero G.F., Liazid A., Palma M., Barroso C.G.** 2008. Ultrasound assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta.* 75(5): 1332-1337.
12. **Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A and Aruoma O.I.** 2004. Total phenol, flavonoïd, proanthocyanidins and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of science of food Agriculture.* 84: 1553-1561.
13. **Bansal M and Kaushal N.** Oxidative stress mechanisms and their modulation. 2014. Springer India edition. pp 19-53.
14. **Basharat S.** 2015. Le pouvoir antioxydant des additifs phytogéniiques. BIOMIN Holding GmbH. Austria. pp 1-5.
15. **Bhaskar A and Kumar A.** 2012. Antihyperglycemic, antioxidant and hypolipidemic effect of *Punica granatum L* flower extract in Streptozotocin induced diabetic rats. *Asian pacific journal of tropical biomedicine.* S1764-S1769.
16. **Baydar N.G., Özkan G and Sağdıç O.** 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera L*) extracts. *Food control.* 15: 335-339.
17. **Bekir J., Mars M., Souchard J.P and Bouajila J.** 2013. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. *Food and chemical toxicology.* 55: 470-475.
18. **Benhammou N., Atik Bekkara F and Panovska K.T.** 2007. Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* Desf. *Advanced in food science.* 29(3): 155-167.
19. **Bensaad L., Kah Hwi K., Alsereti M and Shahimi M.** 2013. Evaluation of the analgesic effects of Libyan fresh pomegranate fruit of *Punica granatum.* *Pharma nutrition.* 2: 75-119.

20. **Bensegueni A., Belkhiri A., Boulebda N and Keck G.** 2007. Evaluation de l'activité cicatrisante d'un onguent traditionnel de la région de Constantine sur les plaies d'excision chez le rat. *Science et technologie*. pp 83-87.
21. **Berhow M., Tisserat B., Kanés K and Vandercook C.** 1998. Survey of phenolic compounds. Technical bulletin number 1856.
22. **Bettaieb-Khiari F.** 2015. Valorisation des déchets cellulosiques tunisiens. Thèse de doctorat en Chimie. Université de Monastir et université de Grenoble.
23. **Bhandary S.K., Suchetha Kumari N., Vadisha S.B., Sharmila K.P and Mahesh P.B.** 2012. Preliminary phytochemical screening of various extracts of *Punica granatum* peel, whole fruit and seeds. *Nitte university journal of health sciences*. 2(4): 34-38.
24. **Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S and Kalayci O.** 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 5: 5-19.
25. **Blanc S.** 2012. Cartographie génétique et analyse de la résistance au Mildiou et à l'Oïdium de la vigne chez *Muscadinia rotundifolia*. Thèse de doctorat en Agronomie. Université de Strasbourg.
26. **Bloor S.J.** 2011. Overview of methods for analysis and identification of flavonoïdes. In : flavonoïdes and other polyphenols (Methods in enzymology, 335). (Edition Packer L). San Diego. California. USA. Academic press. pp 3-14.
27. **Boulekbache Makhoul L., Slimani S., and Madani K.** 2013. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globules* cultivated in Algeria. *Industrial crops and products*. 41: 85-89.
28. **Bralley E.E., Hargrove J.L., Greenspan P and Hartle D.K.** 2007. Topical anti-inflammatory activities of *Vitis rotundifolia* (*Muscadine grape*) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. *Journal of medicine and food*. 10 : 636-642.
29. **Bruneton J.** 1999. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. *Edition Technique et documentation*.

- 30. Bruneton J.** 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition Paris: Tec & Doc Lavoisier.
- 31. Cabiscol E., Tamarit J and Ros J.** 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiology*. 3: 3-8.
- 32. Castilla P., Echarri R., Davalos A., Cerrato F., Ortega H., Teruel J.L., Lucas M.F., Gomez-Coronado D., Ortuno J and Lasuncion M.A.** 2006. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and anti-inflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *American journal of clinical nutrition*. 84: 252-262.
- 33. Cathiard-Thomas M and Pezard C.** 1998. La santé par le raisin et la vinothérapie : prévention des cancers et des affections cardiovasculaires, soins anti-âge et minceur. Edition librairie de médicis. pp 122.
- 34. Chauchard P.** 2013. La grenade : organisation de la filière, opportunités et contraintes pour son développement. Mémoire d'ingénieur. Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage.
- 35. Cristofori V., Caruso D., Latini G., Dell'Agli M., Cammilli C., Rugini E., Bignami C and Muleo R.** 2011. Fruit quality of Italian pomegranate (*Punica granatum L*) autochthonous varieties. *European food research technology*. 232: 397-403.
- 36. Dhaouadi K., Raboudi F., Funez-Gomez L., Pamies D., Estevan C., Hamdaoui M and Fattouch S.** 2013. Polyphenolic extract of Barbary-fig (*Opuntia ficus indica*) syrup: RP-HPLC-ESI-MS analysis and determination of antioxidant, antimicrobial and cancer-cells cytotoxic potentials. *Food anal Methods*. 6: 45-53.
- 37. Dejian H., Boxin O., Maureen H.W., Judith A.F and Ronald L.P.** 2002. High-Throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of agriculture and food chemistry*. 50: 4437-4444.
- 38. Dembitsky Valery M. Poovarodom S., Leontowicz H., Leontowicz M., Vearasilp S., Trakhtenberg S and Gorinstein S.** 2011. The multiple nutrition properties of

- some exotic fruits, biological activity and active metabolites. *Food Research International*. 44: 1671–1701.
- 39. Demelin E.** 2012. Le raisin et ses applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Limoges.
- 40. Dhawan V.** 2014. Reactive oxygen and nitrogen species: general considerations. Reactive oxygen and nitrogen species: general considerations. *Springer Science and Business Media*. New York.
- 41. Didier C.** 1984. La culture des agrumes en Irak. *Edition IRFA Fruits*. 39 : 184-205
- 42. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J.F and Stocker P.** 2007. Screening of some Algerian medicinal plants for phenolic compounds and their antioxidant activity. *European food a research and technology*. 224: 801-809.
- 43. D’Mello P.M., Shetgiri P.P and Darji K.K.** 2012. Antioxidant activity of various bioactive polyphenolic fractions from indigenous medicinal plants. *Journal of global trends in pharmaceutical sciences*. 3(1): 519-531.
- 44. Dohou N., Yamni K., Griman and Idrissi Hassani L.M.** 2003. Etude de polyphénols des feuilles d’une endémique ibéro Marocaine, *Thymelaea lychoides*. *Acta Botanica Malacitana*. pp 233-239.
- 45. Downey M. O and Rochfort S.** 2008. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectra identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of chromatography A*. 1201: 43-47.
- 46. Dubois B.** 2015. Implication du stress oxydant dans plusieurs affections du cheval athlète : revue bibliographique. Thèse de doctorat en Vétérinaire. Université Claude Bernard-Lyon I.
- 47. El Gengaih S and Aboul Ella F.M.** 2013. Phytochemical investigation and radical scavenging activity of wastes of some grape varieties grown in Egypt. *Global journal of pharmacology*. 7(4): 465-473.
- 48. El-Hawary S., El-Fouly K., El Gohary H.M., Meselhy K.M., Salem A and Talaat Z.** 2012. Phytochemical and biological investigation of *Vitis vinifera L* (Flame cultivar), family Vitaceae cultivated in Egypt. *Nature and Science*. 10(10): 48-59.

- 49. El Mannoubi I., Barrek S., Skanji T et Zarrouk H.** 2008. Etude de la composition de la fraction volatile des graines du Figuier de Barbarie (*Opuntia ficus-indica*). *Journal de la société chimique de Tunisie*. 10: 61-67.
- 50. Ernould A.** 2008. Les vertus de l'oranger amer et l'oranger doux. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Nantes.
- 51. Espin J. C.** 2007. Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*. 68: 2986–3008.
- 52. Fadeyi O.O., Obafemi C.A., Adewunmi C.O and Iwalewa E.O.** 2004. Antipyretic, Analgesic, Anti-inflammatory and Cytotoxicity Effects of Four Derivatives of Acetylsalicylic acid and Anthranilic acid in mice and rats. *African Journal of Biotechnology*. 3(8):426 – 431.
- 53. Fang F., Li J.M., Zhang P., Tang K., Wang W., Pan Q and Huang W.** 2008. Effects of grapes variety, harvest date, fermentation vessel and wine aging on flavonoïd concentration in red wines. *Food research international*. 41: 53-60.
- 54. Farnood Shokouhi S.J., Tajik H and Mojtaba H.** 2012. Efficacy of topical application of alcoholic extract of yarrow in the healing process of experimental burn wounds in rabbit. *Comparative Clinical Pathology*. pp 177-181.
- 55. Favier A.** 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique Review. L'actualité chimique. Novembre. pp 108-115.
- 56. Fernández-López J.A., Almekla L., Obón J.M and Castellar R.** 2010. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant foods human nutrition*. 65: 253-259.
- 57. Ferreira S.H.** 2002. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. *International journal of clinical practice*. 128 : 2-10.
- 58. Fiorucci S.** 2006. Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Université de Nice.

- 59. Fischer U. A., Carle reinhold and Kammerer D. R.** 2011. Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *Food chemistry*. 127:807-821.
- 60. Floss H.G.** 1997. Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural product reports*. 14: 433-434.
- 61. Gagné J.** 2008. La céruloplasmine et l'oxyde nitrique dans la protection des cellules cardiaques. Mémoire de maîtrise en chimie. Université Québec de Montréal.
- 62. Galet P.** 2000. Précis de viticulture. Edition JF. 7^{ème} édition. pp 597.
- 63. Gaouar N.** 2011. Etude de la valeur nutritive de la caroube de différentes variétés Algériennes. Mémoire de Magistère. Université Abou Beker Belkaid-Telemcen.
- 64. Gattuso G., Barrera D., Gargiulli C., Leuzzi U and Caristi C.** 2007. Flavonoïd composition if Citrus juices. *Molecules*. 12: 1641-1673.
- 65. Georgiev V., Ananga A and Tsoleva V.** 2014. Recent advances and uses of grape flavonoïds as nutraceuticals. *Nutrients*. 6: 391-415.
- 66. Ghasemi K., Ghasemi Y and Ebrahimzadeh M.A.** 2009. Antioxidant activity and flavonoïd contents of 13 *Citrus* species peels and tissues. *Pakistan journal of pharmacology sciences*. 22 (3): 277-281.
- 67. Gnanavel K and Namasivayam E.** 2015. Antioxidant and free radical scavenging properties of *Punica granatum* fruits extract. *International journal of pharmacy*. 5(4): 1354-1359.
- 68. God J.M., Tate P and Larcom L.L.** 2007. Anticancer effects of four varieties of muscadine grape. *Medicinal food*. 10: 54-59.
- 69. Godevac D., Tešević V., Veličlović M., Vujisić L., Vajs V and Milosavljević S.** 2010. Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia. *Journal of Serbian chemical society*. 75(12): 1641-1652.
- 70. Gursoy N.** 2012. Influence of the seasonal conditions on phenolic composition and antioxidant activity of *Vitis vinifera L*. *African journal of microbiology research*. 6(43): 7059-7067.

- 71. Hadj Salem J.** 2009. Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut national polytechnique de Lorraine.
- 72. Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C et Chapelle J.P.** Le stress oxydant. 2007. *Rev Med Liège*. 62 (10): 628-638.
- 73. Halliwell B and Gutteridge J.M.C.** 2008. Free radicals in biology and medicine. Fourth edition. Oxford University Press.
- 74. Hamid H., Abdullah S., Asif A., Alam M and Ansari S.H.** 2004. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Uraria lagopodes*. *Pharmaceutical biology*. 42 (2): 114-116.
- 75. Harbone J.B.** 1993. The flavonoïds: advances in research since 1986. *Chapman and Hall London*. Pp 676.
- 76. Hariram Nile S., Hwan Kim D and Keum Y.S.** 2015. Determination of anthocyanin content and antioxidant capacity of different grape varieties. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 30(2): 60-68.
- 77. Hassan H.M.M and Nahla M.M.H.** 2010. In vitro antioxidant and free radical scavenging activities of red grape seed extracts. *Global journal of biotechnology and biochemistry*. 5(2): 106-115.
- 78. Heber D.** 2008. Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins (pomegranate). *Cancer Letters*. 269: 262–268.
- 79. Hébert M.E.B.** 2008. Etude du potentiel biopharmaceutique du *Solidago canadensis* Linné. Université de Québec.
- 80. Hennebelle T.** 2006. Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamelles productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées). Thèse de doctorat-France. pp 304.
- 81. Henrotin Y.** 2003. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 11(10): 747-755.

- 82. Hmid I.** 2013. Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punica granatum L*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse de doctorat-université de Béni Mellal-Maroc et université d'Angers-France.
- 83. Hmid I., Elothmani D., Hanine H., Oukabli A and Mehinagic E.** 2013. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum L*) cultivars grown in Morocco. *Arabian journal of chemistry*. 33(2): 374-381.
- 84. Hodge H.C and Sterner J.H.** 1949. Tabulation of toxicity classes. *American industrial hygiene association quarterly*. 10: 93-96.
- 85. Hoffman L.** 2003. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes ; analyse de l'interaction de la caféol-coenzyme A-3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Trnsférase (HCT). Thèse de doctorat en Biologie moléculaire et cellulaire. Université Louis Pasteur-Strasbourg I.
- 86. Hoffman L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Pollet B and Legrand M.** 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell*. 6(6): 1446-1465.
- 87. Hoque N., Razibul Habibi Md., Zafar Imam M., Jamiuddin A., and Sohel Rana Md.** 2011. Analgesic and anti-inflammatory potential of methanolic extract of *Glinusop positifolius L*. *Australian journal of basic and applied sciences*. 5(8):729-733.
- 88. Hudson T.S., Hartle D.K., Hursting S.D., Nunez N.P., Wang T.T.Y., Young H.A., Arany P and Green J.E.** 2007. Inhibition of prostate cancer growth by muscadine grape skin extract and resveratrol through distinct mechanisms. *Cancer research*. 67: 8396-8405.

- 89. Iacopini P., Baldi M., Storchi P and Sebastiani L.** 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, in vitro antioxidant activity and interactions. *Journal of food composition and analysis*. 21: 589-598.
- 90. Jacob V.** 2010. La chromatographie liquide haute performance (HPLC). IUT de chimie de Grenoble. Pp 1-3.
- 91. Jean-Denis J.B.** 2005. Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqué dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk and Curt). Thèse de doctorat en Biochimie. Université de Neuchâtel.
- 92. Jung K., Wallig M and Singletary K.** 2006. Purple grape juice inhibits 7, 12-dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and *in vitro* DMBA-DAN adduct formation. *Cancer let.* 233: 279-288.
- 93. Jyoti S., Ajay K.S and Anand S.** 2009. Analgesic and anti inflammatory activity of methanolic extract of *Vitis vinifera*. *Pharmacology*. 3: 496-504.
- 94. Kabel A.M.** 2014. Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition. *World journal of nutrition and health*. 2(3): 35-38.
- 95. Kanagarla V., Kuppast I.J., Veerashekar T and Laxman Reddy C.** 2013. A review on benefits and uses of *Vitis vinifera* (Grape). *Research and reviews in Biosciences*. 7(5): 175-180.
- 96. Kanoun K., Abbouni B., Bénine M.L., Benmahdi F.Z et Marouf B.** 2014. Etude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorce de *Punica granatum Linn* sur deux souches phytopathologiques : *Ascochyta rabiei* (Pass) LABR et *Fusarium oxysporium F SP Radicis-Lycopersici*. *European scientific journal*. 10(2): 301-315.
- 97. Karumi Y., Onyeyili P.A and Oyugbuaja V.O.** 2004. Identification of active principals of *M Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *Journal of Medicine Science*. pp 179-182.
- 98. Kaur M., Kaur A and Sharma R.** 2012. Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: a review. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2(7): 15-18.

- 99. Kedage V.V., Tilak J.C., Dixit G.B., Devasagayam T.P.A and Mhatre M.** 2007. A study of antioxidant properties of some varieties of grapes (*Vitis vinifera L.*). *Critical reviews in food science and nutrition.* 47(2): 175-185.
- 100. Kelebek H., Jourdes M., Selli S and Teissedre P.L.** 2013. Comparative evaluation of the phenolic content and antioxidant capacity of sun-dried raisins. *Journal of science food and agriculture.* 93: 2963-2972.
- 101. Kening Y., Vincenzo D.L and Normand B.** 1995. Creation of a metabolic sink of tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The plant cell.* 7: 1787-1799.
- 102. Kirkman H.N., Rolfo M., Ferraris A.M and Gaetani G.F.** 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH kinetics and stoichiometry. *Journal of biological chemistry.* 274: 13908-13914.
- 103. Koffi N., Beugré K., Guédé N.Z., Dossahoua T and Laurent A.** 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubo (Agboville, Côte d'Ivoire). *Sciences et Nature.* pp 1-15.
- 104. Koster R., Anderson M and Rehan H.M.S.** 1959. Acetic acid analgesic screening. *Federation proceeding.* 18: 412-418.
- 105. Kouakou S.L., Kouakou G.S., Dally Laba I and Brou J.K.** 2010. Evaluation de l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *Mitracarpus scaber zucc* (Rubiaceae), une plante médicinale de Côte d'Ivoire. *International journal of chemistry science.* 4(2): 456-463.
- 106. Kulkarni A.P and Aradhya S.M.** 2005. Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food chemistry.* 93: 319-324.
- 107. Kuti J.O.** 2004. Antioxidant compounds from four *Opuntia ficus-indica* cactus pear varieties. *Food chemistry.* 85(4):527-533.
- 108. Lago-Vanzela E.S., Da-Silva R., Gomes E., Garcia-Romero E and Hermosin-Gutiérrez I.** 2011. Phenolic composition of the Brazilian seedless table grape varieties BRS Clara and BRS Morena. *Journal of agricultural and food chemistry.* 59: 8314-8323.

109. Laguerre M., Lopez-Giraldo L.J., Lecomte J., Pina M and Villeneuve P. 2007. Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Oilseeds and fats. Crops and lipids*. 14(5): 278-292.
110. Lamees A.B.S., and Kah H.K. 2015. Phytochemical constituents and analgesic activity of ethyl acetate fraction of *Punica granatum L* (Punicaceae). *Tropical journal of pharmaceutical research January*. 14(1): 87-93.
111. Lazze M.C., Pizzala R., Pecharroman F.J.G., Garnica P.G., Rodriguez J.M.A., Fabris N and Bianchi L. 2009. Grape waste extract obtained by subcritical fluid extraction contains bioactive antioxidant molecules and induces antiproliferative effects in human colon adenocarcinoma cells. *Journal of medicinal food*. 12: 561-568.
112. Le Bars D., Gozariu M and Cadden S. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacology revision*. 53 (4): 597-652.
113. Leopoldini M., Russo N and Toscano M. 2011. The molecular basis of working mechanisms of natural polyphenolic antioxidants. *Food chemistry*. 125 (2): 288-306.
114. Liang Z., Cheng L., Zhong G.Y and Liu R.H. 2014. Antioxidant and antiproliferative activities of twenty-four *Vitis vinifera* grapes. *Plos one*. 9(8):1-10.
115. Livrea M.A and Tesoriere L. 2006. Health benefits and bioactive components of the fruits from *Opuntia ficus-indica L Mill*. *Journal of professional association for Cactus development* : 73-90.
116. Louvieux J. 2004. Mesure de l'efficacité d'extraits d'algues sur la vigne (*Vitis vinifera L*), en conditions contrôlées et au vignoble, validée par la mesure de l'activité photosynthétique et les analyses chimiques. Mémoire d'ingénieur. Université libre de Bruxelles.
117. Lutz M., Jorquera K., Cancino B., Ruby R and Henriquez C. 2011. Phenolic and antioxidant capacity of table grape (*Vitis vinifera L*) cultivars grown in Chile. *Journal of food science*. 76(7): 1088-1093.
118. Ma Y.Q., Chen J.C., Liu D.H and Ye X.Q. 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of Citrus peel extracts: effect of ultrasounds. *Ultrasonics sonochemistry*. 16 (1) : 57-62.

- 119. Mabrouki L., Zougari B., Bendhifi M and Borgi M. A.** 2015. Evaluation of antioxidant capacity, phenol and flavonoid contents of *Opuntia streptacantha* and *Opuntia ficus indica* fruits pulp. *Nature and technology. Sciences de l'environnement.* 13: 02-08.
- 120. Macheix J.J., Fleuriet A et Jay-Allemand C.** 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. pp 4-5.
- 121. Malešev D., Kuntić V.** 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 72(10): 921-939.
- 122. Manasathien J., Indrapichate K and Intarapichet K.O.** 2012. Antioxidant activity and bioefficacy of pomegranate *Punica granatum* Linn peel and seed extracts. *Global journal of pharmacology.* 6(2): 131-141.
- 123. Marcinčáková D., Bača M and Marcinčák S.** 2012. Antioxidant properties of selected ethanol plant extracts. *Folia veterinaria.* 56 (2): 3-7.
- 124. Martín A.** 1996. The use of antioxidants in healing. *Dermatol Surg.* 22 : 159-160.
- 125. Martin S and Andriantsiitohaina R.** 2002. Mécanisme de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* Edition Elsevier. 51 : 304-315.
- 126. Masani Y.A., Mathew N., Chakraborty M and Kamath J.V.** 2012. Effect of *Vitis vinifera* against Triton X 100 induced hyperlipidaemia in rats. *International research journal of pharmacy.* 3(12): 101-103.
- 127. Mata A., Ferreira J.P., Semedo C., Serra T., Duarte C.M.M and Bronze M.R.** 2016. Contribution to the characterization of *Opuntia spp.* Juices by LC-DAD-ESI-MS/MS. *Food chemistry.* 210: 558-565.
- 128. Mata Bilbao M.L., Andrés-Lacueva C., Jàuregui O and Lamuela-Raventós R.M.** 2007. Determination of flavonoids in a *Citrus* fruit extract by LC-DAD and LC-MS. *Food chemistry.* 101: 1742-1747.

- 129. Matés J.M., Pérez-Gómez C and Nunez De Castro I.** 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 32 (8): 595-603.
- 130. Mazher Asjad H. M., Shoaib Akhtar M., Bashir S., Din B., Gulzar F., Khalid R and Asad M.** 2013. Phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of six common Citrus plants in Pakistan. *Journal of pharmaceutical and cosmetic sciences*. 1(1): 1-5.
- 131. Medjedoub F.** 1996. Biologie de l'aleurode floconneux, *Aleurothrixus floccosus* Maskell (Homoptera, Aleurodidae) dans un verger d'grumes de la région de Draa Ben Khedda (Tizi-Ouzou). Magistère en Biologie et Ecologie des populations. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. pp 73.
- 132. Mérillon J.M., Fauconneau B., Waffo Teguo P., Barrier L., Vercauteren J and Huguet F.** 1997. Antioxidant activity of the stilbene Astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Clinical chemistry*. 43: 1092-1093.
- 133. Middha S.K., Usha T and Pande V.** 2013. A review on antihyperglycemic and antihepatoprotective activity of eco-friendly *Punica granatum* peel waste. *Evidence based complementary and alternative medicine*. 1-10.
- 134. Middleton E., Kandaswami C and Theoharides T.C.** 2000. The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*. 52(4): 673-751.
- 135. Miguel M.G., Neves M.A and Antunes M.D.** 2010. Pomegranate (*Punica granatum* L): A medicinal plant with myriad biological properties-A short review. *Journal of medicinal plants research*. 4(25): 2836-2847.
- 136. Mousseux M.** 1995. Test de toxicité sur les larves d'*Artemia salina* entretien d'un élevage de balanes. Université française de Pacifique. Centre universitaire de Nouvelle Calédonie. Deust. Aquaculture.
- 137. Mulas M and Mulas G.** 2004. Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. *Short and medium term priority environmental action programme*. Université des études de Sassari. Groupe de recherche sur la désertification.

- 138. Murshid G.M.M., Barman A.K and Rahman M.M.** 2014. Evaluation of antioxidant, analgesic and cytotoxic activities of the aerial part of *Cassia sophera* L.(Caesalpiniaceae). *International journal of phytopharmacology*. 5(5):383-389.
- 139. Nadal B.** 2010. Synthèse et évaluation de nouveaux agents de protection contre les rayonnements ionisants. Thèse de doctorat. Université Paris Sud XI.
- 140. Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R and Krishna D.R.** 2001. Bioflavonoides classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*. 33: 2-16.
- 141. Naveed M., Saeed M., Naeemuddin Gilani S., UlHaq I and Khan H.** 2012. Analgesic and anti-inflammatory profile of n-Hexane fraction of *Viola betonicifolia*. *Tropical journal of pharmaceutical research*. 11(6): 963-969.
- 142. Neffar S.** 2012. Etude de l'effet de l'âge des plantations de figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica* L Miller) sur la variation des ressources naturelles (sol et végétation) des steppes algériennes de l'Est. Cas de Souk-ahras et Tébessa. Thèse de doctorat en Biologie végétale. Université Badji Mokhtar d'Annaba.
- 143. Negus S.S., Vanderah T.W., Brandt M.R., Blisky E.J., Becerra L and Borsook D.** 2006. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenge. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 319: 507-514.
- 144. Nene B.I.S.A., Traore F., Zahoui O. S and SoronT.Y.** 2008. Composition chimique d'un extrait aqueux de *Bridelia ferruginea benth* 'euphorbiaceae et étude de ses effets toxicologiqueet pharmacologique chez les mammifères. *Afrique science*. pp 287-305.
- 145. Nicol M et Maudet M.** 2000. Caroténoïdes et vitamines A. Actualités. *Oléagineux, Corps gras, lipides*. 7(3) : 266-270.
- 146. Nirmala Grace J and Narendhirakannan R. T.** 2011. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of grapes (*Vitis vinifera* L) seed and skin extracts-muscat variety. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 3(4): 242-249.

- 147. Nogata Y., Sakamoto K and Shiratsuchi H.** 2006. Flavonoïd composition of fruit tissues of *Citrus* species. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70(1): 178-192.
- 148. Okoh S. O., Asekun O. T., Familoni O. B and Afolayan A.J.** 2014. Antioxidant and free radical scavenging capacity of seed and shell essential oils extracted from *Abrus precatorius L.* *Antioxidants.* 3: 278-287.
- 149. Okpo S.O., Fatokun F and Adeyemi O.O.** 2001. Analgesic and antiinflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. *Journal of ethnopharmacology.* 78: 207-211
- 150. Olas B., Wachowicz B., Tomczak A., Erler J., Stochmal A and Oleszek W.** 2008. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of *Aronia melanocarpa*, seeds of grape and bark of *Yucca schidigera* *in vitro.* *Platelet.* 19(1): 70-77.
- 151. Osorio-Esquivel O., Ortiz-Moreno A., Garduño-Siciliano L., Álvarez V. B and Hernández-Navarro M. D.** 2012. Antihyperlipidemic effect of methanolic extract from *Opuntia ficus joconostle* seeds in mice fed a hypercholesterolemic diet. *Plant foods hum nutr.* 67: 365-370.
- 152. Oyedemi S.O., Bradely G., and Afolayan A.J.** 2010. In vitro and in vivo antioxidant activities of aqueous extract of *Strychnos henningsii* Gilg. *African journal of pharmacy and pharmacology.* 4(2): 70-78.
- 153. Palmeri B., Glauco G and Palmeri G.** 1995. Vitamin E added silicone gel sheets for treatment of hypertrophic scars and keloids. *International journal of Dermatology.* 34:506-509.
- 154. Perestrelo R., Lu Y., Santos S. A.O., Silvestre A. J.D., Neto C. P., Câmara J. S and Rocha S. M.** 2012. Phenolic profile of serial and tinta negra *Vitis vinifera L* grape skins by HPLC-DAD-ESI-MS novel phenolic compounds in *Vitis vinifera L* grape. *Food chemistry.* 135: 94-104.
- 155. Pharm-Huy L.A., He H and Pharm-Huy C.** 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical sciences.* 4(2): 89-96.

156. **Quezel P et Santa S.** 1963. Nouvelles flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (tome II). Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris. France.
157. **Raskin I., Ribnicky D.M., Komarnytsky S., Ilic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., Moreno D.A., Ripoll C., Yakoby N., O'Neal J.M., Cornwell T., Pastor I and Fridlender B.** 2002. Plants and human health in the twenty first century. *Trends in Biotechnology*. 20(12): 522-531.
158. **Reyes-Aguero J.A., Aguirre J.R and Valente-Banuet A.** 2006. Reproductive biology of *Opuntia*. A review: *Journal of Arid environments*. 64: 549-589.
159. **Rice-Evans C.A., Miller N.J and Paganga G.** 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radic Bio Med*. 7: 933-956.
160. **Rizk A.M.** 1982. Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterrapia*. Pp 35-42.
161. **Rufai B.Y and Fatimah S.** 2015. Preliminary phytochemical investigations with quantitative fractionation of orange pulp (*Citrus aurantium* Var Dulcis L): natural product waste as medicine. *Global journal of medical research: Pharma, drug discovery, toxicology and medicine*. 15 (5): 1-7.
162. **Saad L.B., Hwi K.K and Quah T.** 2014. Evaluation of the antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Punica granatum*. *African journal of traditional compounds and alternative medicine*. 11(3): 228-232.
163. **Safaa Y. Q., Ahmed N.A and Mona A. B.** 2010. Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the holly quran. *European journal of biological sciences*. 2(1).
164. **Sainvitu P., Nott K., Richard G., Blecker C., Jérôme C., Wathelet J.P., Paquot M and Deleu M.** 2012. Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignin secoisolariciresinol: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 16 (1): 115-124.
165. **Sakagami H., Hashimoto K., Suzuki F., Ogiwara T., Satoh K., Ito H., Hatano T., Takashi Y and Fujisawa S.** 2005. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*. 66: 2108-2120.

- 166. Sanogo R., Maiga A et Diallo D.** 2006. Activités analgésique et anti-inflammatoire des extraits de *Maytenus senegalensis*, *Stereospermum kunthianum* et *Trichilia emetic* utilisées dans le traitement traditionnel des dysménorrhées au mali. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*. XIV : 123-136.
- 167. Saonere Suryawanshi J.A.** 2011. An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases. *African journal of plant science*. 5(7): 390-395.
- 168. Saravankumar A., Ganesh M., Peng M.M., Aziz A.S and Jang H.T.** 2015. Comparative antioxidant and antimicrobial activities of *Opuntia ficus indica* fruit extracts from summer and rainy seasons. *Frontiers in life science*. 8(2): 182-191.
- 169. Sarker M., Mahmud Z.A., Saha S.K and Sultan Tihi N.** 2012. Antihyperlipidemic activity of flowers of *Punica granatum* in Poloxamer-407 induced hyperlipidemic mice model. *Pharmacognosy journal*. 3(27): 66-70.
- 170. Sarni-Manchado P et Cheynier V.** 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. pp 2-10.
- 171. Scalbert A and Williamson G.** 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of nutrition*. 130: 2073-2085.
- 172. Sebki S.** 2014. Contribution à l'étude de la sensibilité au phylloxéra radicole *Phylloxera vastatrix* (Homoptera : Phylloxeridae) des cépages de *Vitis vinifera L. ssp. Vinifera* autochtones d'Algérie. Mémoire de magistère en sciences de la vigne et préservation des ressources phytogénétiques. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- 173. Shankar Uma S., Umesh Kumar S., Abhishek S., Niranjana S and Puspak J.S.** 2010. Screening of *Terminalia bellirica* fruits extracts for its analgesic and antipyretic activities. *Jordan journal of biological sciences*. 3(3):121-124.
- 174. Sidana J., Saini V., Sumitra D., Nain P and Bala S.** 2013. A review on *Citrus*-"the bone of nature". *International journal of pharmaceutical science revision research*. 18(2):20-27.
- 175. Simon J.L., Eggenberger W., Koblet W., Mishler M and Schwarzenbach J.** 1992. Viticulture. Edition Payot. Lausanne.

- 176. Singh S., Maumder D.K., and Rehan H.M.S.** 1996. Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holybasil) and its possible mechanism of action. *Journal of Pharmacy Pharmacology*. 54:19-26.
- 177. Singletary K.W., Stansbury M.J., Giusti M., Breemen R.B.V., Wallig M and Rimando A.** 2003. Inhibition of rat mammary tumorigenesis by concord grape juice constituents. *Journal of agriculture and food chemistry*. 51: 7280-7286.
- 178. Soro T.Y., Néné-bi A.S., Zahoui O.S., Yapi A and Traoré F.** 2015. Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). *Journal of animal and plant sciences*. 24 (3): 3802-3813.
- 179. Spichiger R.E., Savolainen V., Figeat M et Jeanmonod D.** 2004. Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. *Editions Presses polytechniques et universitaires romandes*. Troisième édition. Pp 413.
- 180. Srividya N and Chandra M.** 2014. Evaluation of nutraceutical properties of some common fruits of Karnataka. *International journal of pharmaceutical sciences*. 27(1): 349-353.
- 181. Stefova M and Ivanova V.** 2011. Analytical methodology for characterization of grape and wine phenolic bioactives. In : Fruit and cereal bioactives : sources, chemistry, and applications. CRC Press. Taylor and Francis group.409-427.
- 182. Subsamanian S., Stacey G and Yu O.** 2007. Distinct crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science*. 12(7): 282-283.
- 183. Sutton B.C., Ting I.P and Sutton R.** 1981. *Plant physiol*. 68(3): 784-787.
- 184. Swain T and Hillis E.** 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I-The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the science of food and agriculture*. 10(1): 63-68.
- 185. Taber R.I., Greenhouse D.D., Rendel J.K and Irwin S.** 1969. Agonist and antagonist interaction of opioids on acetic acid induced abdominal stretching in mice. *Journal of Pharmacology*. 169: 29-37.

- 186. Taguemout M.** 2013. Contribution à la caractérisation morphologique des pépins de quelques cépages *Vitis vinifera ssp vinifera* autochtones d'Algérie. Mémoire de magistère. Université Mouloud Mammeri deTizi-Ouzou.
- 187. Taibur R., Ismail H., Towhidul Islam M.M and Haossain Uddin S.** 2012. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 3: 997-1019.
- 188. Talukder M.E.U. Jannatul A., Talka B.E., Sayedul I., Atiar R and Robiul H.B.** 2013. In vitro antioxidant potential of *Momordica charantia* fruit extracts. *British journal of pharmaceutical research*. 3(4): 936-971.
- 189. Thanan R., Oikawa S., Hiraku Y., Ohnishi S., Ma N., Pinlaor S., Yongvanit P., Kawanishi S and Murata M.** 2015. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *International journal of molecular sciences*. 16: 193-217.
- 190. Thapakorn B and Niramom U.A.** 2015. Optimization of extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red grape (*Vitis vinifera L*) pomace. *Journal of food and science technology*. 52 (2): 783-792.
- 191. Thomas M.** 2011. Nouvelles méthodologie d'extraction, de fractionnement et d'identification : application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de doctorat en chimie analytique-Phytochimie l'université d'Orléans.
- 192. Toé A.M., Benoit-Guyod J.L., Seigle-Murandi F and Steiman R.** 2005. Evolution de la toxicité du pentachlorophenol en cours de dégradation par des deuteromycetes isolés du sol. *J. soc ouest afri. chim.* 20 : 61-75.
- 193. Tomar A., Mall M and Rai P.** 2013. Pharmacological importance of *Citrus* fruits. *International journal of pharmaceutical sciences and research*. 4(1):156-160.
- 194. Toure H.A., Bouatia M., Idrissi M.O and Draoui M.** 2015. Phytochemical screening and antioxidant activity of aqueous-ethanolic extracts of *Opuntia ficus indica*. *Journal of chemical and pharmaceutical research*. 7(7): 409-415.
- 195. Trease E.G and Evans W.C.** 1978. Pharmacognosy. 11th edition, Balliere Tindall. London. Pp 115-222.

- 196. Tyaghi S. N., Rakshit., Singh A., Raghvendra ., Sexena A and Patel B. D.** 2010. In vitro antioxidant activity of methanolic and aqueous extract of *Flacourtia indica* Merr. *American-Eurasian journal of scientific research*. 5(3): 201-206.
- 197. Van Acker S.A.B.E., Van Den Berg D.J., Tromp M.N.L., Griffioen D.H., Bennenkom W.P.V., Van Der Vijgh W.J.F and Bast A.** 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoïds. *Free radical biology and medicine*. 20: 331-342.
- 198. Vuorela S.** 2005. Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics. Département of applied chemistry, microbiology and food chemistry. University of Helsinki. pp : 9-70.
- 199. W-Erdman J., Balentine J.D., Arab L., Beecher G., Dwyer J.T., Folts J., Harnly., Hollman J.P., L-Keen C., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G and Burrowes J.** 2007. Flavonoïds and health: proceeding of the ILSI north America flavonoïds workshop. *Journal of Nutrition*. 137: 718-737.
- 200. Waksmundzka-Hajnos M and Sherma J.** 2011. High performance liquid chromatography in phytochemical ience. *Chromatographic science series*. 447-478.
- 201. Weidner S., Rybarczyk A., Karamac M., Krol A., Mostek A., Grebosz J and Amarowicz R.** 2013. Differences in phenolic composition and antioxidant properties between *Vitis coignetiae* and *Vitis vinifera* seeds extracts. *Molecules*. 18: 3410-3426.
- 202. Winkel-Shirley B.** 2001. Flavonoïd biosynthesis. A chlorful model for genetics biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant physiology*. 126: 285-493.
- 203. Wu M., Zhang H., Zhou C., Jia H., Ma Z and Zou Z.** 2015. Identification of the chemical constituents in aqueous extract of *Zhi-Qiao* and evaluation of its antidepressant effect. *Molecules*. 20: 6925-6940.
- 204. Yeddes N., Chérif J.K., Guyot S., Sotin H and Ayadi M.T.** 2013. Comparative study of antioxidant power, polyphenols, flavonoïds and betacyanins of the peel and pulp of three Tunisian *Opuntia* forms. *Antioxidants*. 2: 37-51.

Annexes

Annexe 1: courbes d'étalonnages pour le dosage des différents métabolites secondaires

Figure 1 : courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

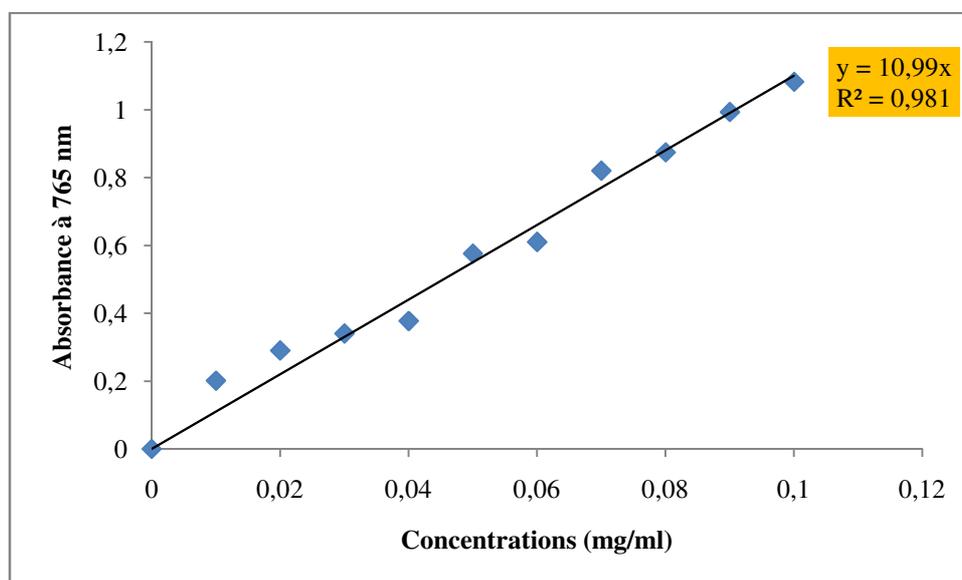


Figure 2: courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

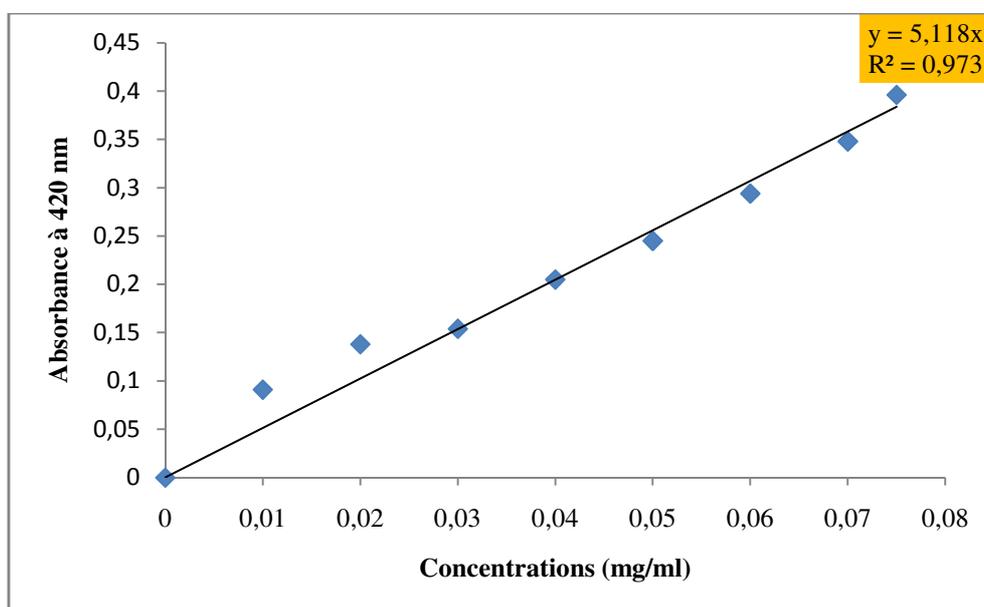
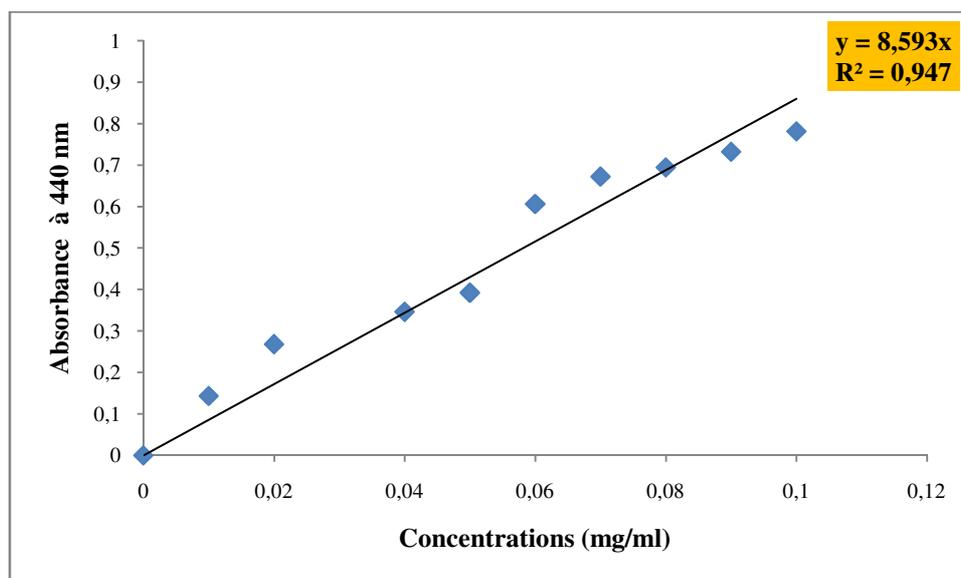


Figure 3 : courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonols.

Annexe 2 : spectres de masse de différents standards en mode d'ionisation négatif

Figure 1 : spectres de masse d'acide gallique en mode d'ionisation négatif

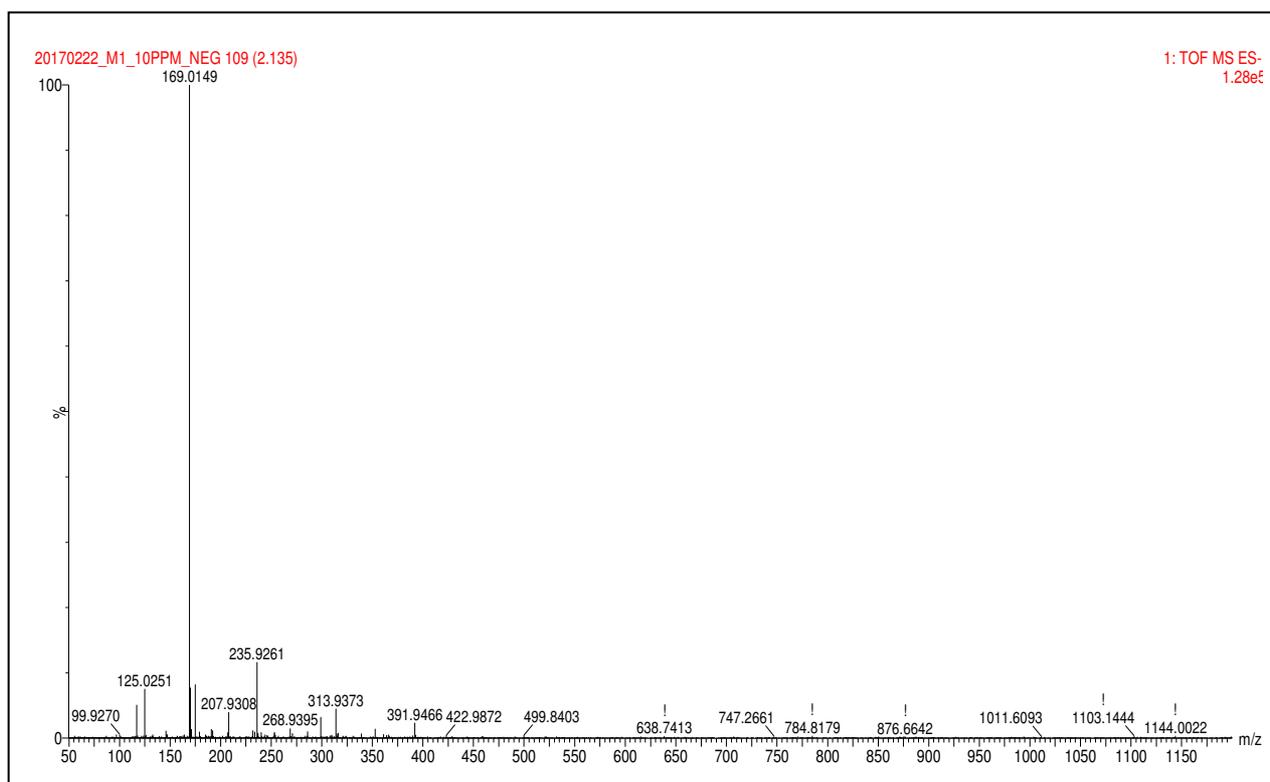


Figure 2 : spectres de masse d'acide caféique en mode d'ionisation négatif

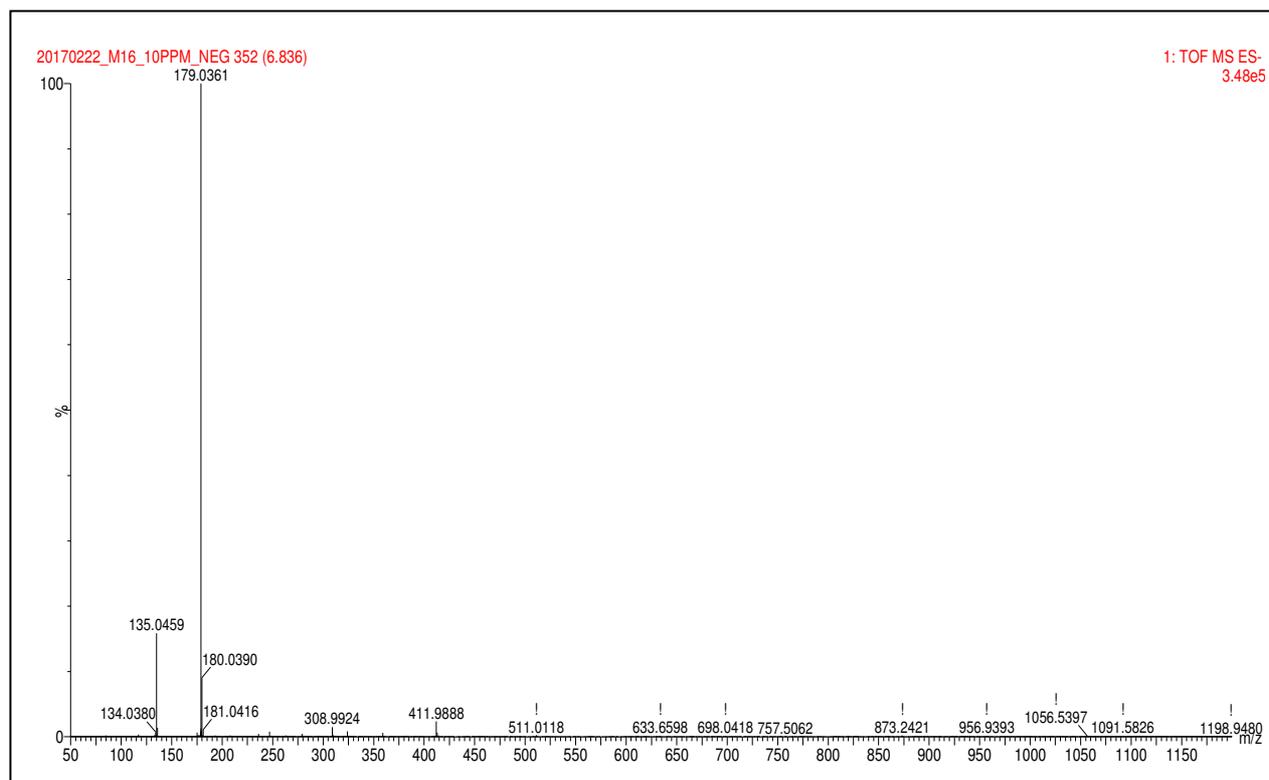


Figure 3 : spectres de masse d'acide malique en mode d'ionisation négatif

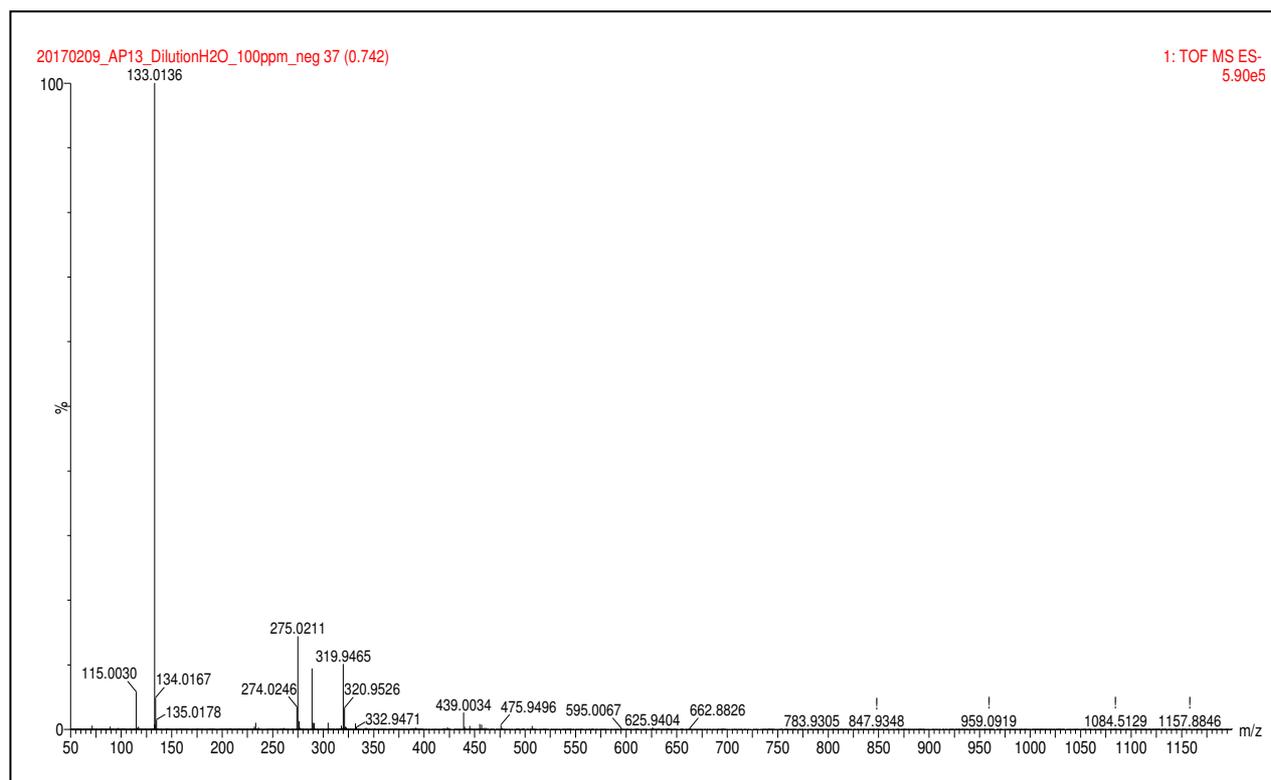
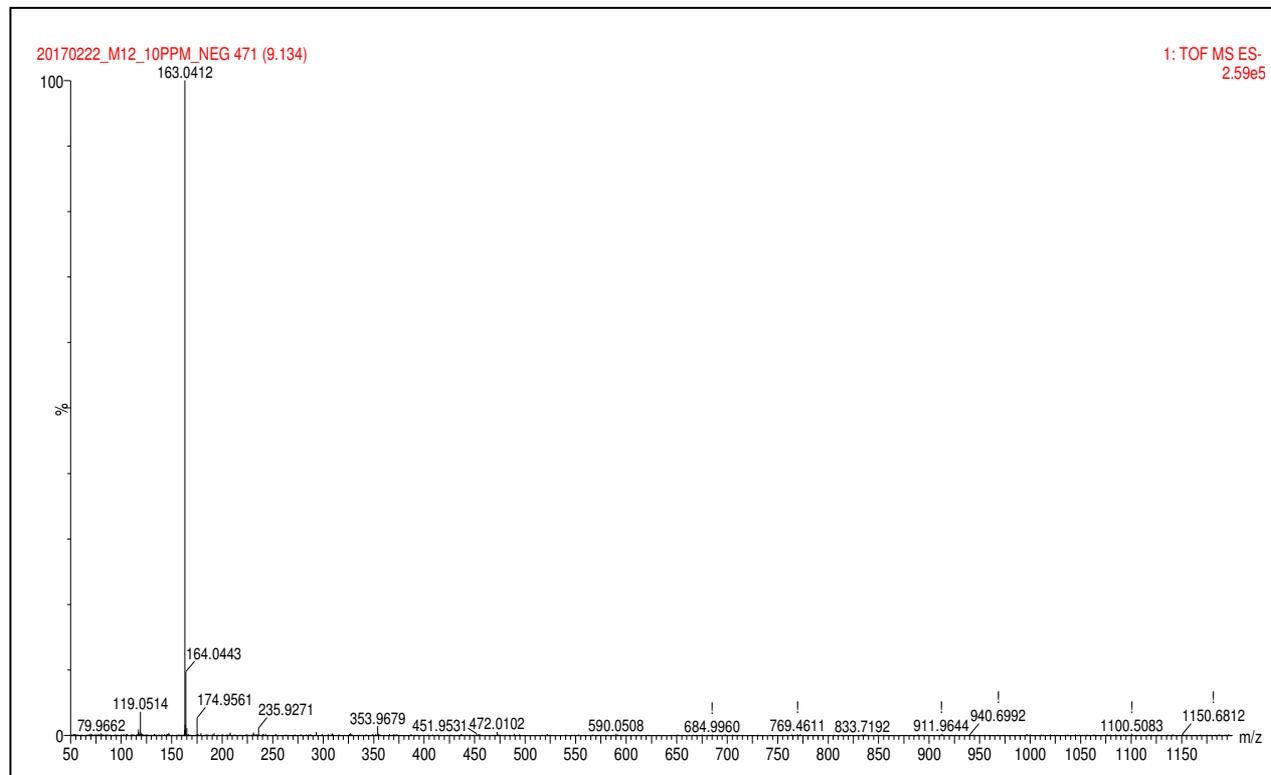
Figure 4 : spectres de masse d'acide *p* coumarique en mode d'ionisation négatif

Figure 5 : spectres de masse d'acide quinique en mode d'ionisation négatif

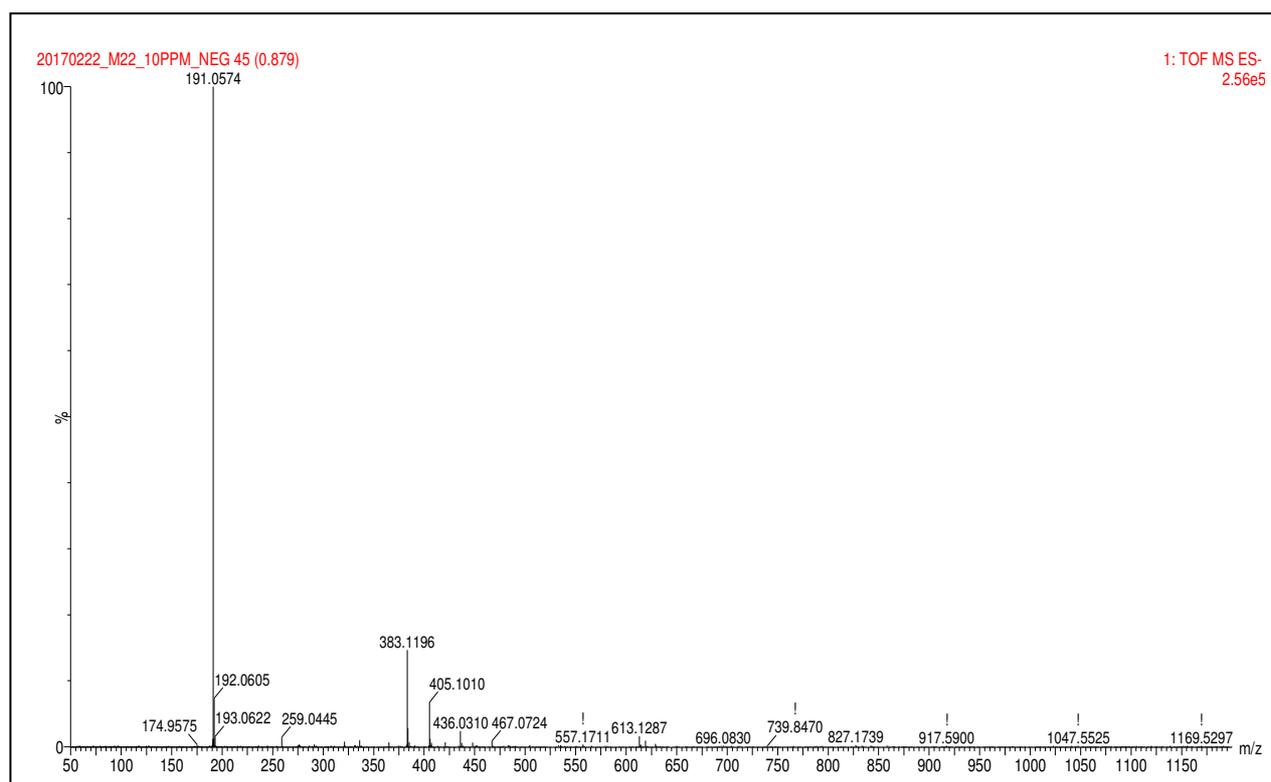


Figure 6 : spectres de masse d'acide sinapique en mode d'ionisation négatif

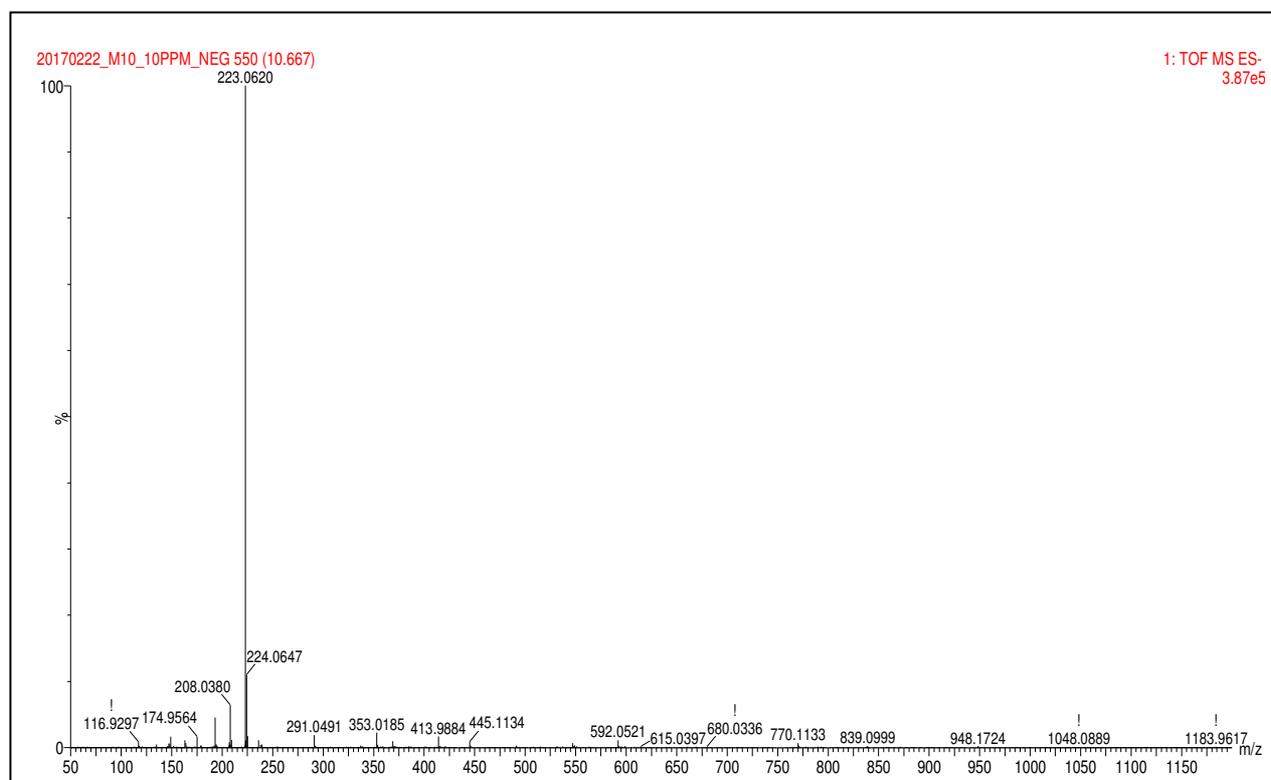


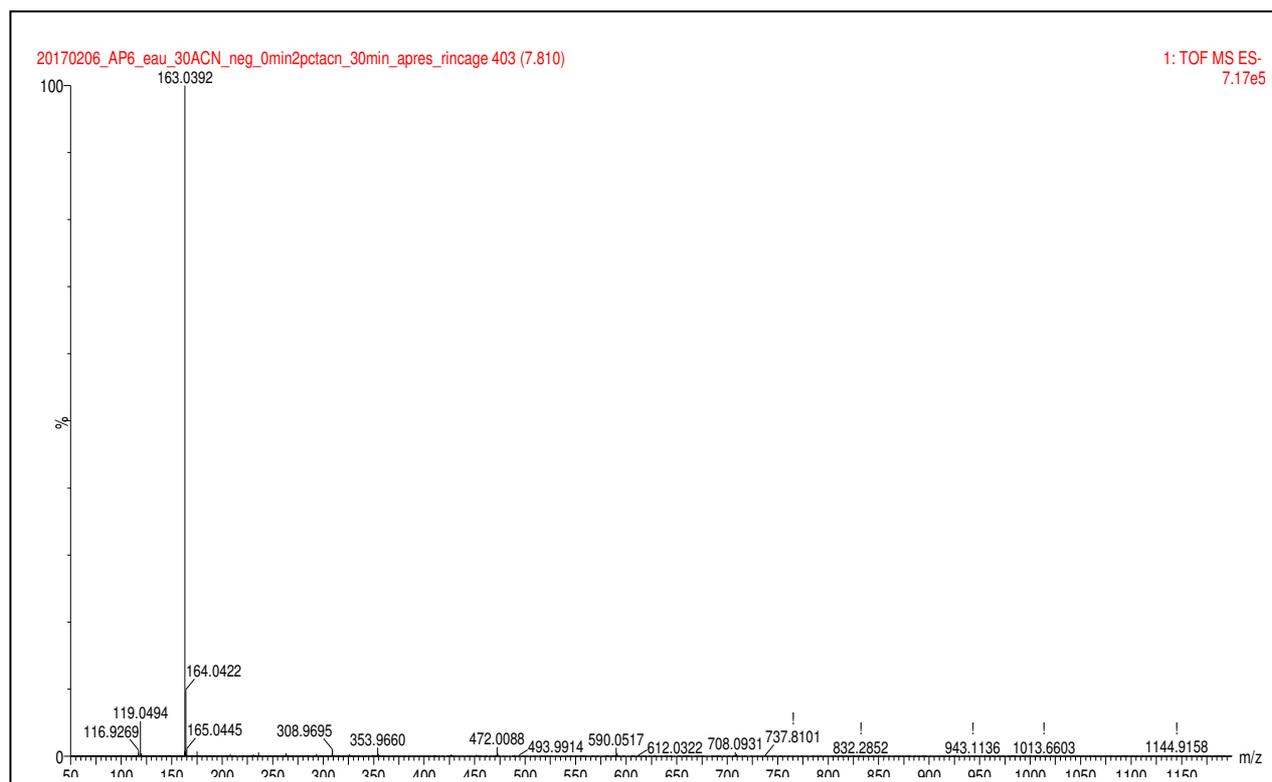
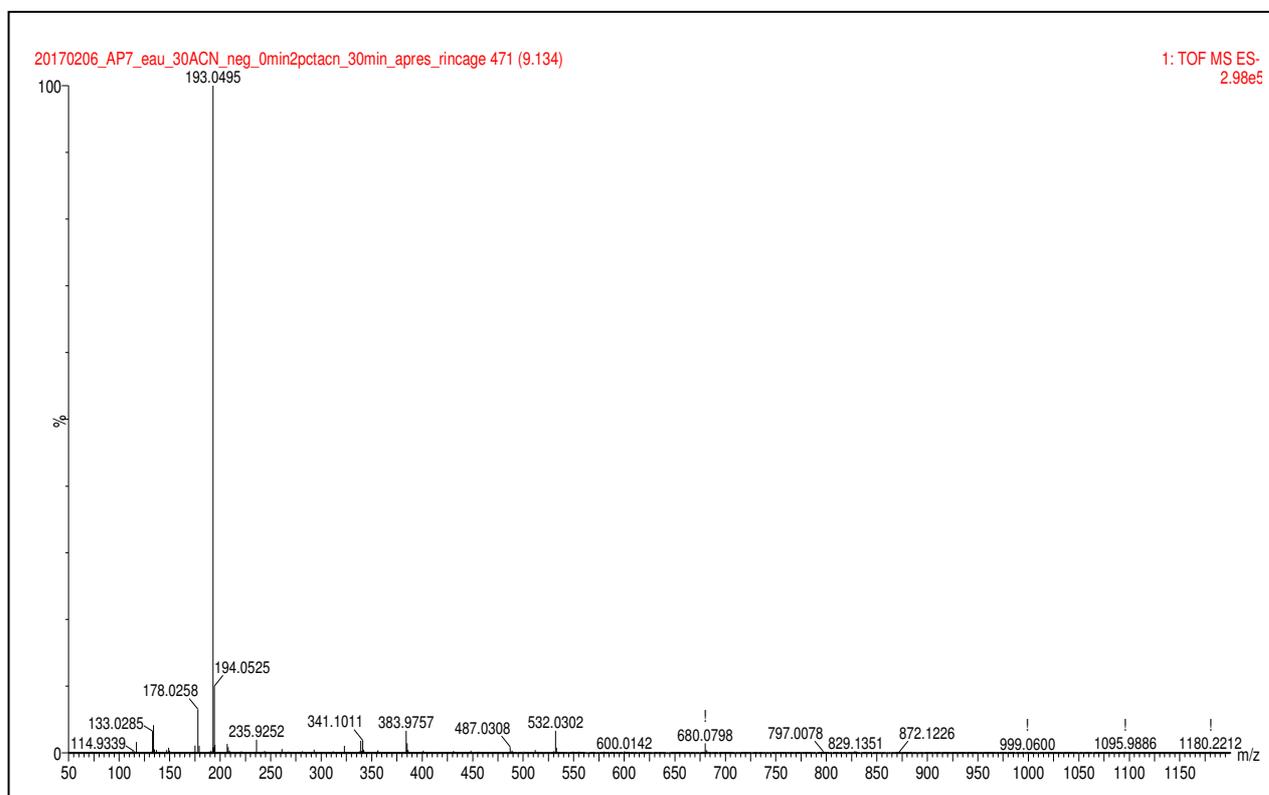
Figure 7 : spectres de masse d'acide hydroxy cinnamique en mode d'ionisation négatif**Figure 8** : spectres de masse d'acide 3 hydroxy 4 méthoxy cinnamique en mode d'ionisation négatif

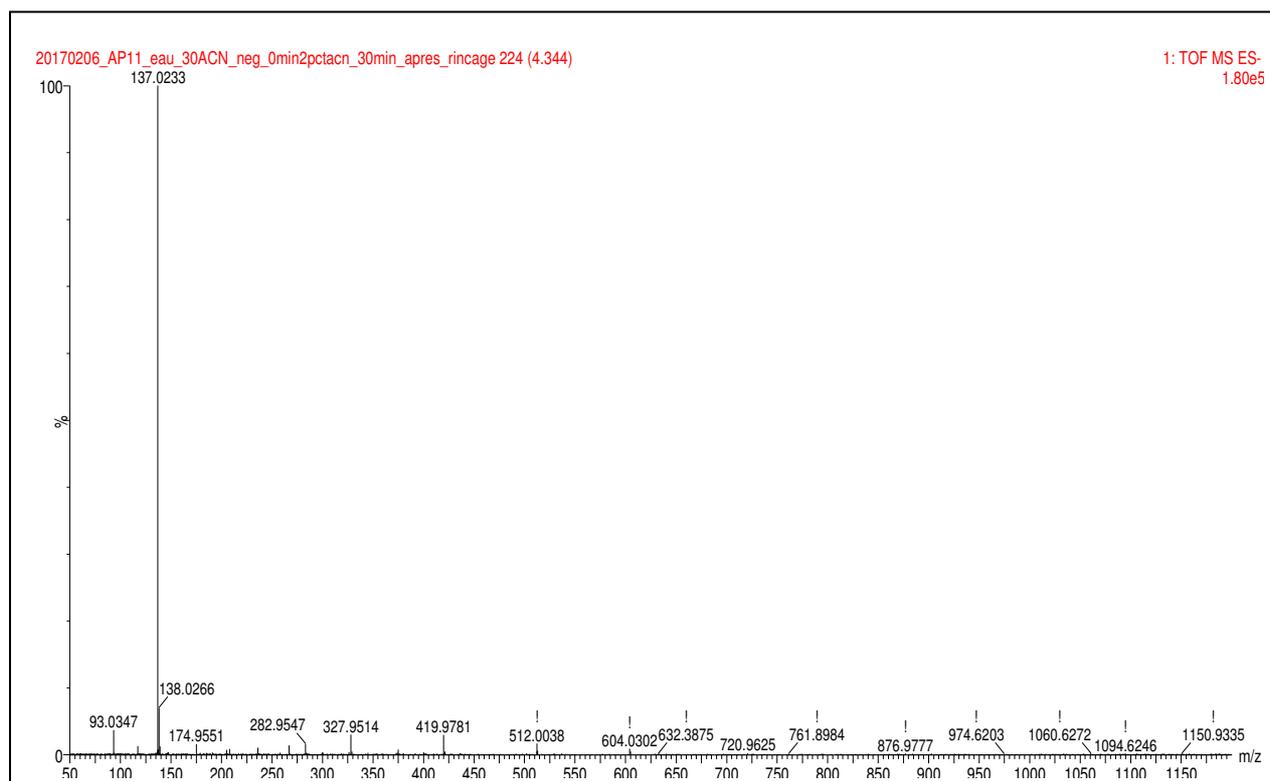
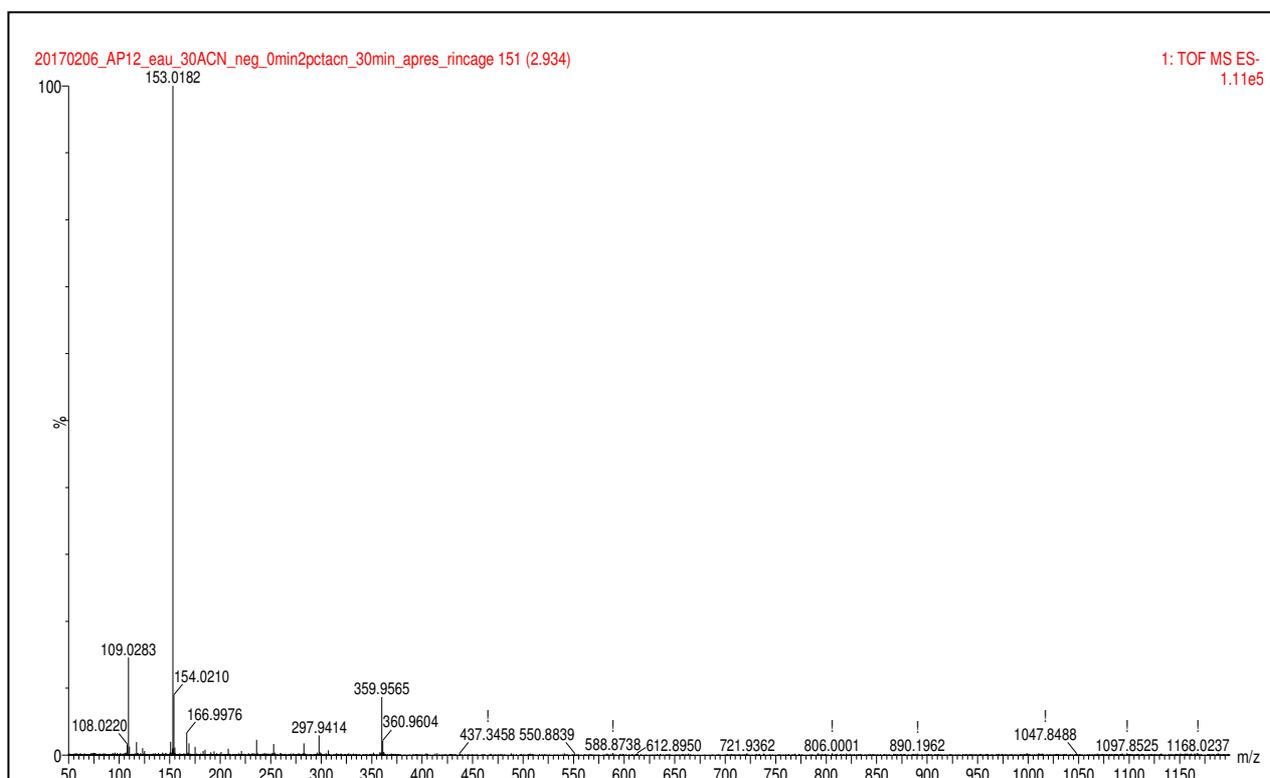
Figure 9 : spectres de masse d'acide hydroxy benzoïque en mode d'ionisation négatif**Figure 10** : spectres de masse d'acide dihydroxy benzoïque en mode d'ionisation négatif

Figure 11 : spectres de masse d'acide citrique en mode d'ionisation négatif

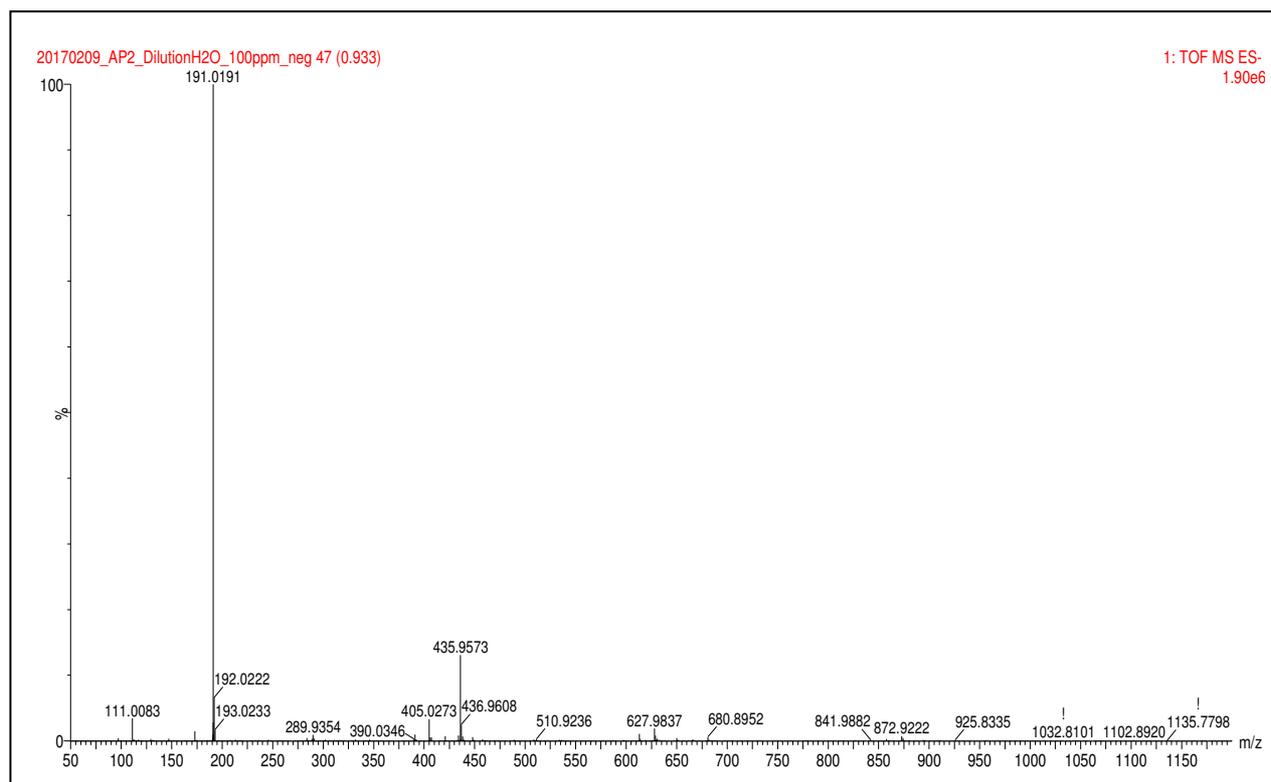


Figure 12 : spectres de masse de la rutine en mode d'ionisation négatif

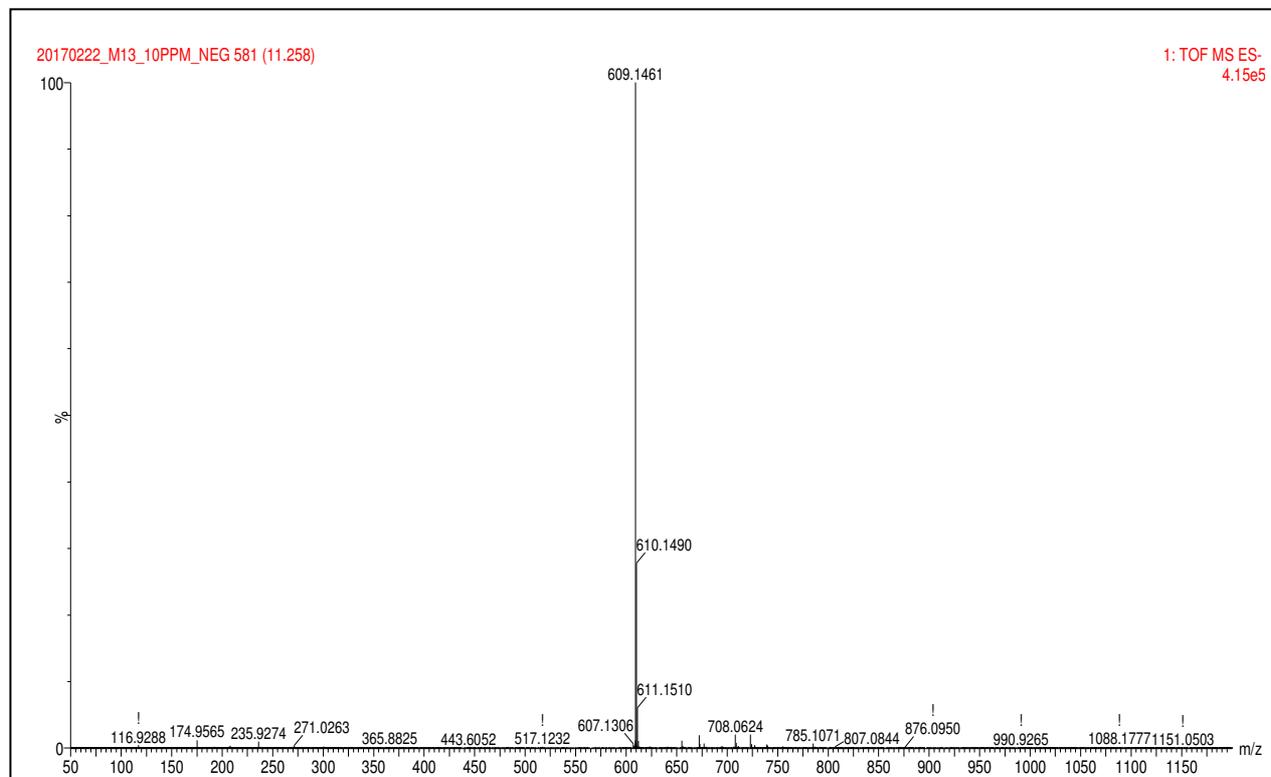


Figure 13 : spectres de masse de la quercétine en mode d'ionisation négatif

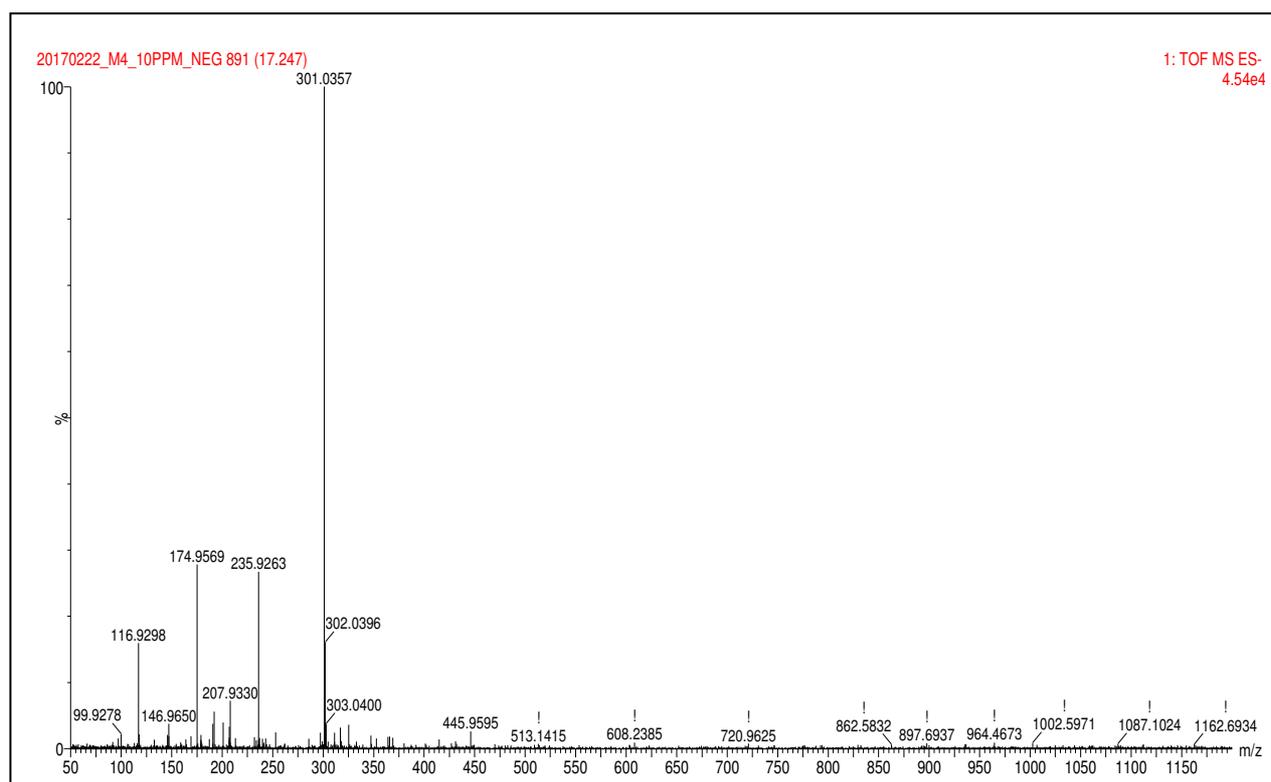


Figure 14 : spectres de masse de la quercétrine en mode d'ionisation négatif

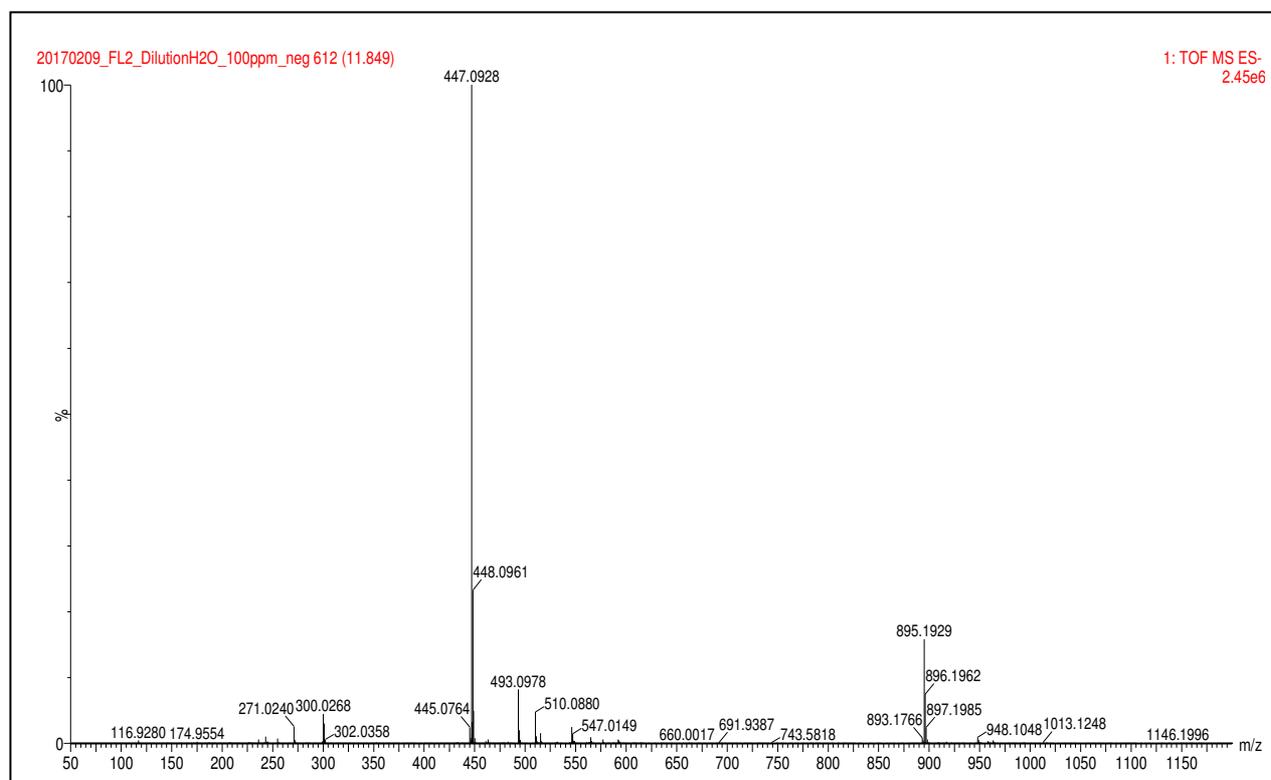


Figure 15 : spectres de masse de la lutéoline en mode d'ionisation négatif

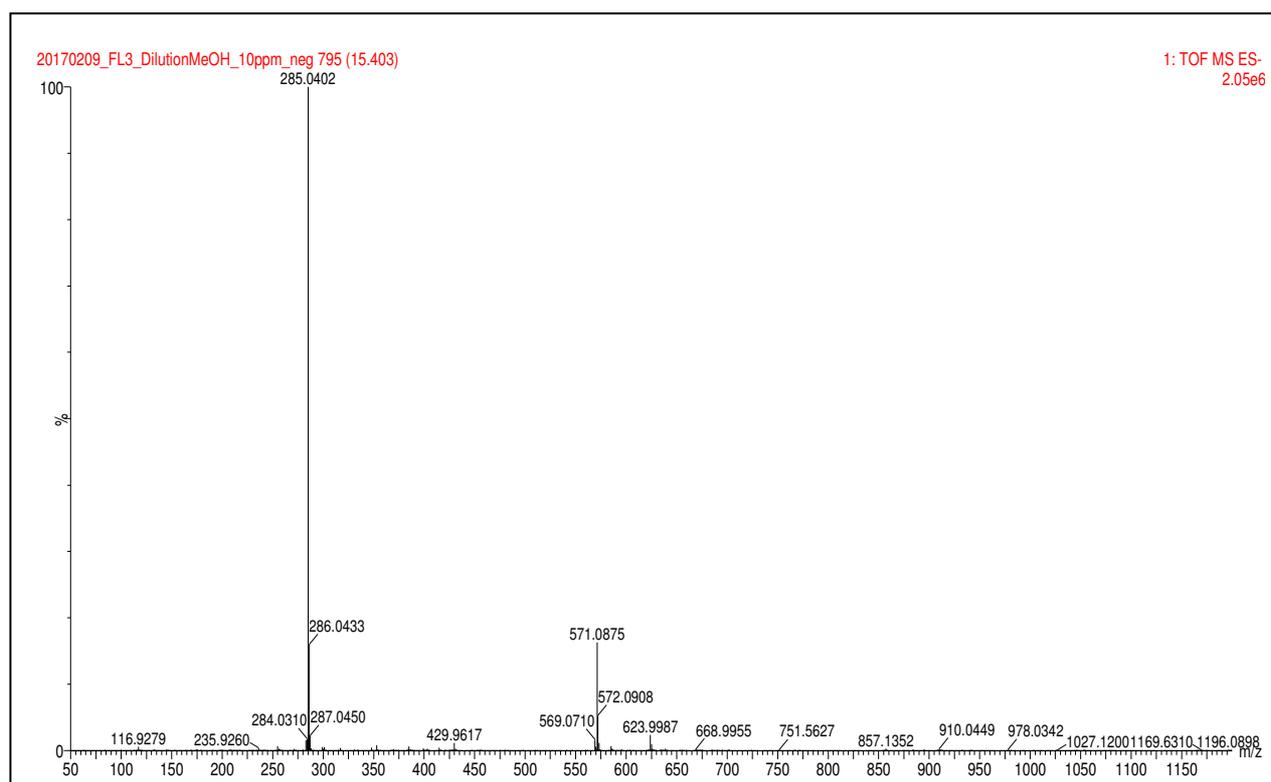


Figure 16 : spectres de masse de la naringénine en mode d'ionisation négatif

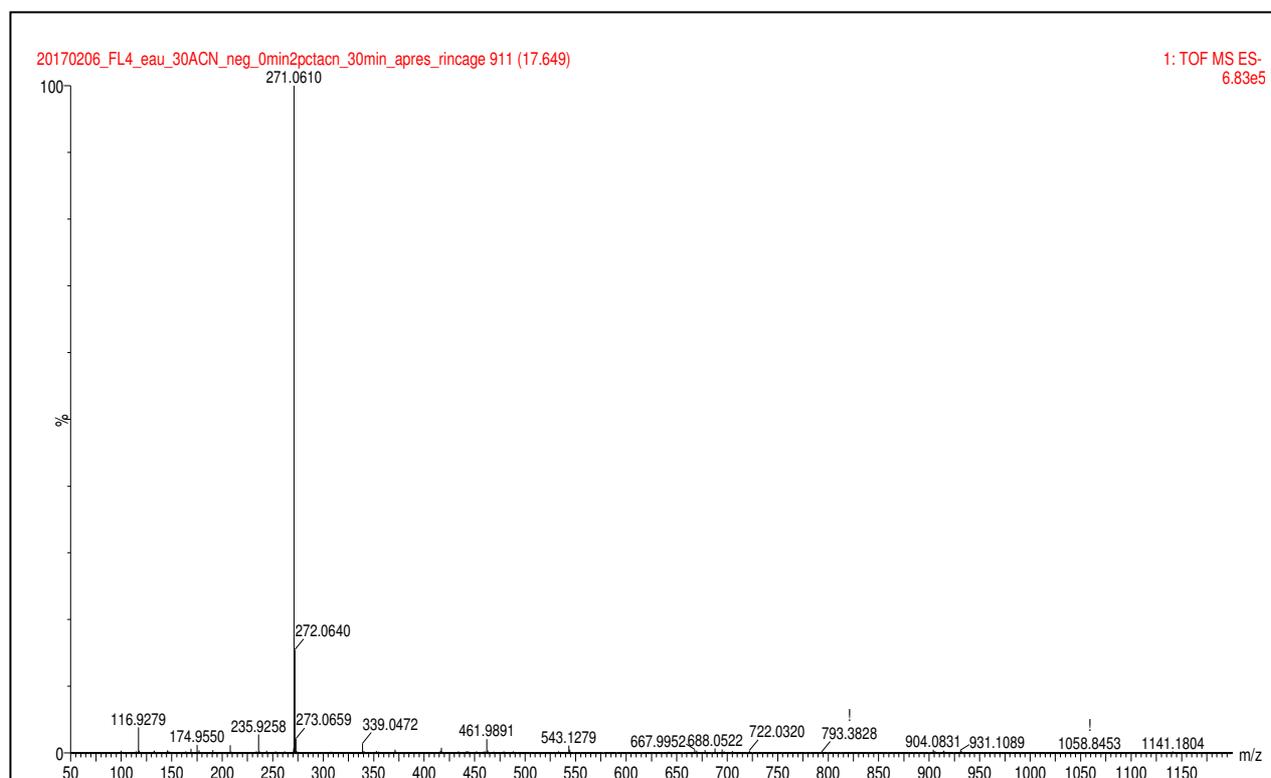


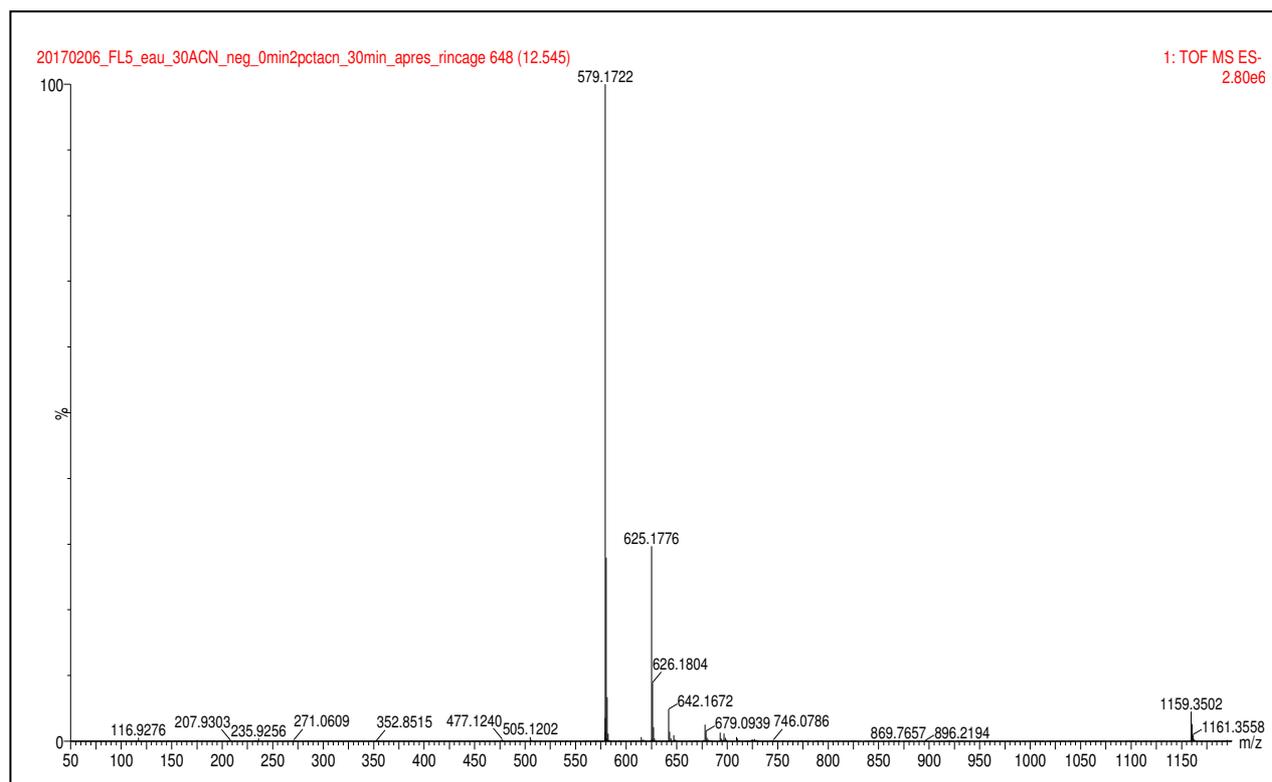
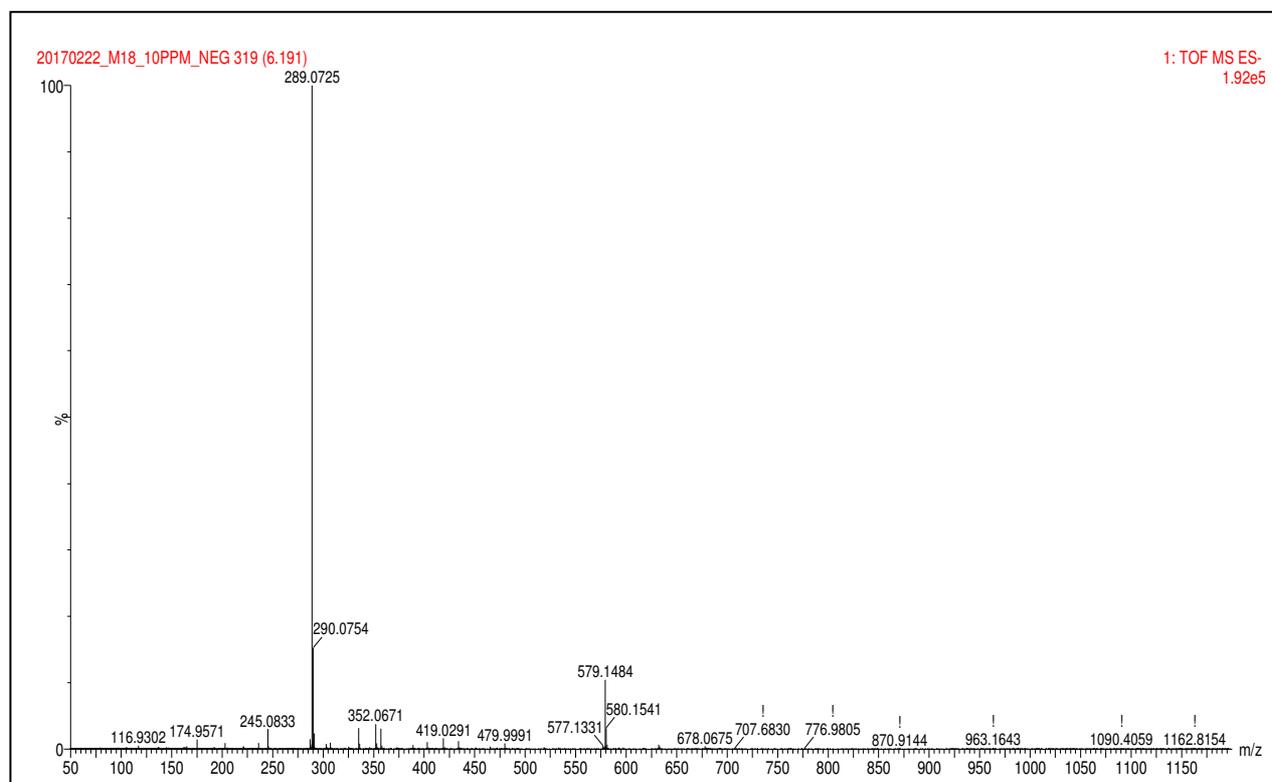
Figure 17 : spectres de masse de la naringine en mode d'ionisation négatif**Figure 18** : spectres de masse de la catéchine et l'épicatéchine en mode d'ionisation négatif

Figure 19 : spectres de masse de l'épigallocatechine gallate en mode d'ionisation négatif

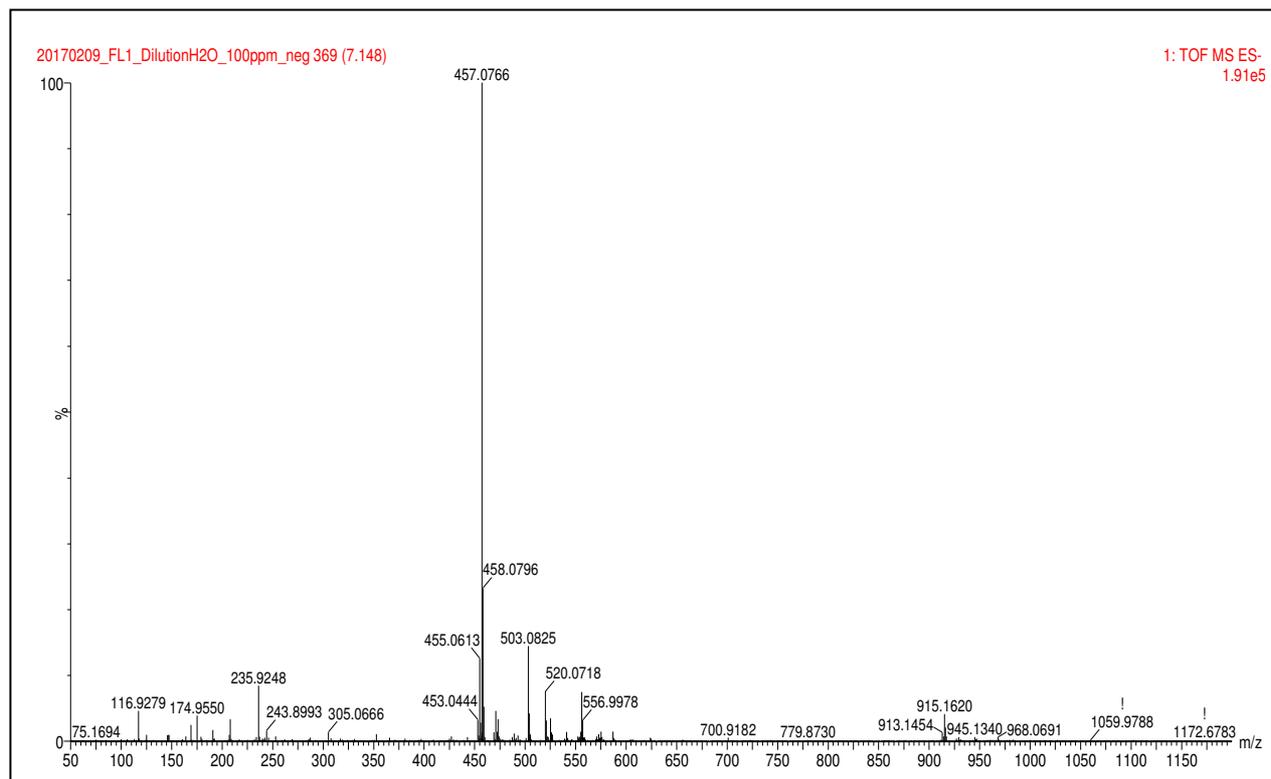
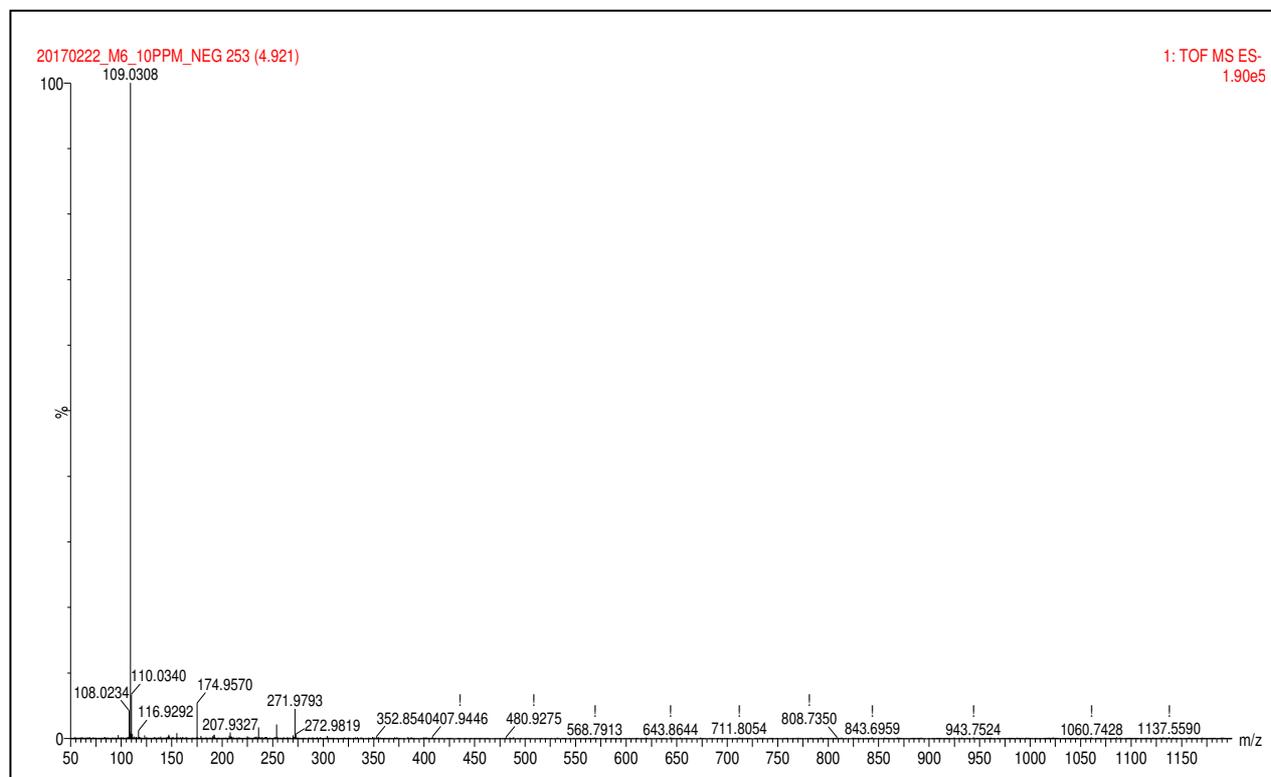


Figure 20 : spectres de masse de la pyrocatéchine en mode d'ionisation négatif



Résumés

Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de valorisation d'agroressources de quatre fruits cultivés localement en Algérie ; *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* et *Opuntia ficus-indica* par leurs caractérisations moléculaires et leurs activités biologiques.

Les fruits sélectionnés ont subi une extraction hydroalcoolique. Les extraits obtenus ont été évalués pour leurs activités antioxydante, analgésique, cicatrisante et antihyperlipidémiantes ainsi que leur potentiel toxique.

Une analyse chromatographique par HPLC-DAD-ESI/MS a été réalisée et complétée par une évaluation quantitative du contenu des extraits en phénols totaux, flavonoïdes, flavonols, tanins condensés et hydrolysables. Les résultats de l'analyse quantitative montrent que les taux des composés phénoliques d'ELF de *Vitis vinifera* sont significativement plus importants que ceux des autres fruits. Les résultats de l'analyse par HPLC-DAD-ESI/MS ont révélé un profil dominé par une coumarine dérivée de bargaptène pour l'ELF de *Punica granatum* et par les acides phénoliques et les flavonoïdes pour les autres ELF.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* (DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, ORAC, TBARS, NO[•]) a montré que le potentiel antioxydant d'ELF de *Vitis vinifera* est le plus important comparé aux autres extraits. L'ELF de *Punica granatum* s'est montré aussi doué d'un potentiel antioxydant qui reste toutefois moins important que celui de l'espèce précédente.

Les ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* ont montré un effet analgésique sur les trois tests (torsion, plaque chauffante, immersion de la queue) dont le potentiel à réduire la douleur des deux extraits s'est révélé statistiquement comparable et s'est manifesté surtout dans le test de la torsion. D'autre part, les résultats de l'évaluation de l'activité cicatrisante chez le lapin ont montré que l'ELF de *Punica granatum* et un degré moindre celui de *Vitis vinifera* accélèrent le processus de cicatrisation des plaies d'excision et des brûlures par rapport au contrôle, et s'est révélé même supérieur à celui d'une crème cicatrisante commerciale (Cicatryl[®]). A la lecture des résultats de l'activité antihyperlipidémiantes, on a noté que les ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* normalisent le profil lipidémique chez des souris rendues hyperlipidémiantes par rapport au contrôle. Les résultats de la toxicité aiguë chez la souris démontrent que les ELF de *Vitis vinifera* et *Punica granatum* sont dénués de tous signes de toxicité aux doses maximales prescrites.

Mots clés : *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium*, *Opuntia ficus-indica*, composés phénoliques, activités biopharmacologiques.

Abstract

The present work was based on the valorization of agrosources of four fruits grown locally in Algeria; *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium* and *Opuntia ficus-indica* by the determination of their molecular characterizations and biological activities.

The hydroalcoholic extracts of the selected fruits were evaluated for their antioxidant, analgesic, healing and antihyperlipidemic activities as well as their toxic potential.

A chromatographic analysis by HPLC-DAD-ESI/MS was performed and supplemented by a quantitative evaluation of the total phenols, flavonoids, flavonols, condensed and hydrolysable tannins. The results of the quantitative analysis show that the levels of the of *Vitis vinifera* fruit extract on phenolic compounds are significantly higher than those of other fruits. The results of the HPLC-DAD-ESI/MS analysis revealed a chromatographic profile dominated by a coumarin for the extract of *Punica granatum* and by the phenolic acids and flavonoids for the other extracts.

The antioxidant activity (DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP, ORAC, TBARS, NO[•]) evaluated *in vitro* showed that the antioxidant potential of the *Vitis vinifera* extract is the most important compared to the other extracts. The *Punica granatum* extract has also a potential antioxidant activity but it remains less important than that of the previous species.

The *Vitis vinifera* and *Punica granatum* extracts showed an analgesic effect on the three tests (torsion, hot plate and tail immersion), of which the potential to reduce the pain was statistically comparable in both extracts and was most evident in the torsion test. On the other hand, the results of the evaluation of the healing activity in the rabbits showed that the *Punica granatum* extract and at lesser degree that of *Vitis vinifera* accelerate the process of healing of excisional wounds and burns compared to the control, and was even superior to that of commercial healing cream (Cicatryl[®]). The results of the antihyperlipidemic activity showed that the *Vitis vinifera* and *Punica granatum* extracts normalized the lipidemic profile in mice made hyperlipidemic compared to the control. Finally, the results of the acute toxicity in mice demonstrated that the *Vitis vinifera* and *Punica granatum* extracts are free of any signs of toxicity at the maximum dose prescribed.

Key words: *Vitis vinifera*, *Punica granatum*, *Citrus aurantium*, *Opuntia ficus-indica*, phenolic compounds, biopharmacological activities.

المخلص

يهدف هذا العمل إلى تبيين الموارد الزراعية لأربعة فواكه تزرع محليا بالجزائر كالعنب *Vitis vinifera* ، الرمان *Punica granatum* ، البرتقال المر *Citrus aurantium* و التين الشوكي *Opuntia ficus-indica* و هذا من خلال الاطلاع على خصائصها الجزيئية و أنشطتها البيولوجية. هذه الثمار المختارة خضعت لعملية استخلاص للمستخلص الهيدروكولي و من ثم تقييم أنشطتها المضادة للأكسدة ، نشاطها المسكن للألم ، نشاط تسريع عملية التآم جروح الشق و الحرق ، بالإضافة إلى نشاطها في تخفيض مستويات الدهون بالدم فضلا عن إمكانيتها السمية.

الفحص الفيتوكيميائي النوعي تم إجراؤه عن طريق التحليل الكروماتوغرافي المقترن بمطياف الكتلة-HPLC-DAD ESI/MS حيث استكمل هذا العمل من خلال التقييم الكمي لمحتوى الفينول الكلي ، الفلافونيدات ، الفلافونات ، الدباغيات المكثفة و القابلة للتجزؤ.

أظهرت نتائج التحليل الكمي أن مستويات المركبات الفينولية للعنب أكثر بكثير من تلك التي في الفواكه الأخرى. أما نتائج التحليل الكروماتوغرافي فقد بينت أن الرمان غني بنوع معين من الكومارين المعروف بالبارجابيتين في حين أن باقي مستخلصات الفواكه قد بينت غناها بالأحماض الفينولية و الفلافونيدات. أما بالنسبة للنشاط المضاد للأكسدة (DPPH[•] ، ABTS^{•+}, FRAP, ORAC, TBARS, NO[•]) فقد بينت النتائج أن قدرة مستخلص العنب ضد الأكسدة هي أكثر أهمية بالنسبة للمستخلصات الأخرى يليه مستخلص الرمان.

أظهرت نتائج النشاط المسكن للألم من خلال الاختبارات الثلاثة (الالتواء، اللوحة الساخنة و غمر الذيل) أن مستخلصات العنب و الرمان لها القدرة على الحد من الألم خاصة بالنسبة لاختبار الالتواء. من ناحية أخرى، أظهرت نتائج تقييم نشاط شفاء الأرنب أن مستخلص الرمان و بدرجة اقل مستخلص العنب يساهمان في تسريع عملية الشفاء من الجروح و الحروق مقارنة مع الشاهد بالإضافة إلى أنهما كانتا متفوقتان حتى على كريم الشفاء التجاري[®] Cicatryl. من خلال قراءة نتائج النشاط المضاد لارتفاع مستويات الدهون بالدم تبين أن مستخلصات فواكه العنب و الرمان تساهم بشكل كبير في تخفيض مستوياته بالمقارنة مع الشاهد. نتائج السمية الحادة في الفئران تثبت أن مستخلصات العنب و الرمان خالية تماما من أي علامات للسمية في الجرعات القصوى المقررة.

الكلمات المفتاح : العنب *Vitis vinifera* ، الرمان *Punica granatum* ، البرتقال المر *Citrus aurantium* ، التين الشوكي *Opuntia ficus-indica* ، الانشطة البيوفارماكولوجية، المركبات الفينولية

Nom : ZEGHAD ep BOUOUDEN Prénom : NADIA	Date de soutenance : 27 / 02/ 2018
Titre : Evaluation des propriétés biopharmacologiques, standardisation chimique et valorisation des agroressources fonctionnelles cas de <i>Vitis vinifera</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>Citrus aurantium</i> et <i>Opuntia ficus indica</i>	
Nature du diplôme : Thèse doctorat en sciences.	Option : biotechnologie végétale
Résumé Le présent travail s'inscrit dans le cadre de valorisation d'agroressources de quatre fruits cultivés localement en Algérie ; <i>Vitis vinifera</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>Citrus aurantium</i> et <i>Opuntia ficus-indica</i> par leurs caractérisations moléculaires et leurs activités biologique. Les fruits sélectionnés ont subi une extraction hydroalcoolique. Les extraits obtenus ont été évalués pour leurs activités antioxydante, analgésique, cicatrisante et antihyperlipidémiant ainsi que leur potentiel toxique. Une analyse chromatographique par HPLC-DAD-ESI/MS a été réalisée et complétée par une évaluation quantitative du contenu des extraits en phénols totaux, flavonoïdes, flavonols, tanins condensés et hydrolysables. Les résultats de l'analyse quantitative montre que les taux des composés phénoliques d'ELF de <i>Vitis vinifera</i> sont significativement plus importants que ceux des autres fruits. Les résultats de l'analyse par HPLC-DAD-ESI/MS ont révélé un profil dominé par une coumarine dérivé de bargaptène pour l'ELF de <i>Punica granatum</i> et par les acides phénoliques et les flavonoïdes pour les autres ELFs. L'évaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> (DPPH [•] , ABTS ^{•+} , FRAP, ORAC, TBARS, NO [•]) a montré que le potentiel antioxydant d'ELF de <i>Vitis vinifera</i> est le plus important comparé aux autres extraits. L'ELF de <i>Punica granatum</i> s'est montré aussi doué d'un potentiel antioxydant qui reste toutefois moins important que celui de l'espèce précédente. Les ELFs de <i>Vitis vinifera</i> et <i>Punica granatum</i> ont montré un effet analgésique sur les trois tests (torsion, plaque chauffante, immersion de la queue) dont le potentiel à réduire la douleur des deux extraits s'est révélé statistiquement comparable et s'est manifesté surtout dans le test de la torsion. D'autre part, les résultats de l'évaluation de l'activité cicatrisante chez le lapin ont montré que l'ELF de <i>Punica granatum</i> et un degré moindre celui de <i>Vitis vinifera</i> accélèrent le processus de cicatrisation des plaies d'excision et des brûlures par rapport au contrôle, et s'est révélé même supérieur à celui d'une crème cicatrisante commerciale (Cicatryl [®]). A la lecture des résultats de l'activité antihyperlipidémiant, on a noté que les ELFs <i>Vitis vinifera</i> et <i>Punica granatum</i> normalisent le profil lipidémique chez des souris rendues hyperlipidémiantes par rapport au contrôle. Les résultats de la toxicité aïgue chez la souris démontrent que les ELFs de <i>Vitis vinifera</i> et <i>Punica granatum</i> sont dénoués de tous signes de toxicité aux doses maximales prescrites.	
Mots clés : <i>Vitis vinifera</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>Citrus aurantium</i> , <i>Opuntia ficus indica</i> , activités antioxydantes, activités biopharmacologiques.	
Laboratoires de recherche : Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie. Institut des sciences Vétérinaires. Université Constantine 1. Algérie. En collaboration avec le laboratoire de chimie analytique, chimiométrie appliquée et modélisation moléculaire. Vrije Universiteit Brussels. Belgique.	
Président : Encadreur : Co-Encadreur : Examineurs :	Baka Mebarek Prof Université Des Frères Mentouri-Constantine1 Belkhiri Abdelmalik Prof Université Salah Boubnider-Constantine 3 Demeyer Kristiaan Prof Vrije universiteit-Brussel- Belgique Akkal Salah Prof Université Des Frères Mentouri-Constantine1 Yahia Abdelouaheb Prof Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf- Mila Djerrou Zouhir MCA Université 20 Août 1955-Skikda
Année universitaire : 2017/2018	