

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Science Biologique
Option : Pharmacologie Moléculaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Caractérisation de l'activité antioxydante des extraits de *Eriobotrya japonica L*

Présenté par :

M^{elle} ATIK ZID Samia & M^{me} KHALDI Wassila

Soutenu le : **14 juin 2015**

Devant le jury composé de :

M^r BRIBI N.

M^{elle} ADRAR S.

M^{me} BOUCHEFFA S.

M^{me} BENSALÉM S.

MAA

MAB

MAA

Docteur

Président

Encadreur

Examinatrice

Invité

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Tout d'abord, on aimerait remercier Dieu le tout-puissant, de nous avoir donné la force et la patience de pouvoir mener ce travail à terme.

On voudrait témoigner notre reconnaissance à M^{lle} Adrar S. pour avoir encadré ce mémoire. On la remercie particulièrement pour son souci de formation, sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ces encouragements, ces conseils et suggestions et tout ça dans la bonne humeur.

Nos remerciements notre copromotrice, M^{me} Bensalem S. pour son grand soutien tout la période de préparation du notre mémoire, son aide inestimable, son sérieux et sa gentillesse.

On exprime ensuite nos estime et nous remerciements à :

Mr Bribi N. pour avoir accepté de présider le juré de ce mémoire, et pour le temps qu'il nous a bien voulu nous consacrer pour ce mémoire.

M^{me} Bouchfa S. pour nous avoir fait l'honneur de juger ce modeste travail et de nous faire ainsi bénéficier de leur compétence.

Nos remerciement également tous les étudiants de notre promotion pharmacologie moléculaire.

Nous exprimons notre gratitude à tous nos enseignants rencontrés tout au long de nos années d'étude.

Dédicace

A l'aide de DIEU, le tout puissant, ce travail est achevé ;

Nombreuses sont les personnes à qui je voudrais dédier ce travail et que je souhaite remercier seulement pour m'avoir soutenue et aidé à réaliser ce travail mais aussi pour avoir donné un sens à ma vie.

Je dédie ce travail à mes chers parents qui ont toujours été présents pour me soutenir, veiller à mon éducation et m'encourager à bien travailler dans tout ce que j'entreprends et plus particulièrement dans mes études. Je leur suis très reconnaissante. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

A mes sœurs : Hamida, Nassira, Sihame.

A mes chères frères : Hakim, Hamza, Youcef.

A mon chère : Chadli Amiri.

A toute ma famille.

A mes ami(es) : Besma, Zahra, Wassila, Nabila, Rahima, Sara, Wissale, Rima.

A mes enseignants de primaire jusqu'à l'université et tous les étudiants de notre promotion Master II Pharmacologie Moléculaire 2015.

A tous, je vous souhaite tous le bonheur du monde et votre soleil éclaire tant et brille d'amour au quotidien.

Samia

Dédicaces

*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds,
Je dédie ce modeste travail*

A mes chers parents

A mon très cher mari Yacine et toute sa famille

A mes très chers frères Fateh et Abd raouf

*A mes très chères sœurs : Nacera, Salima, Chafia
Sabiha et Kenza*

*A mes chers amis :
Samia, Tahou , Warda , Karima , Nabila, Sarah, Kahina
chahra , Lilia*

A toute ma famille et A tous ceux qui m'aiment

WASSILA

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION1

Chapitre I : Recherche bibliographique

I.1-GENERALITE SUR *ERIOBOTRYA JAPONICA L*

I.1.1- HISTORIQUE.....3

I.1.2-DESCRETION BOTANIQUE DE *ERIOBOTRYA JAPONICA L*.....3

I.1.2.1-CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES PARTIES DE LA PLANTE.....4

I.1.2.2-CLASSIFICATION BOTANIQUE DE LA PLANTE.....5

I.1.2.3-NOMS VERMACULAIRES DE L'ESPECE.....5

I.1.3-DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE LA PLANTE.....5

I.1.4-COMPOSITION BIOCHIMIQUE DE LA PLANTE.....6

I.1.5-USAGE THERAPEUTIQUE DE LA PLANTE.....8

I.1.6-ACTIVITES BIOLOGIQUE DE LA PLANTE.....8

I.1.7-TOXCICITE DE *ERIOBOTRYA JAPONICA L*.....9

I.2-RADICAUX LIBRES.....10

I.2.1-DEFINITION.....10

I.2.2-LES ESPECES OXYDANTES EN BIOLOGIE11

I.2.2.1-LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE (ERO).....11

I.2.2.2-LES ESPECES REACTIVES DE L'AZOTE (ERN).....12

I.2.3-PINCIPALES SOURCES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET DE L'AZOTE.....12

I.2.3.1-SOURCES ENDOGENES12

I.2.3.2-SOURCES EXOGENES13

I.2.4-ROLES PHYSIOLOGIQUES DES RADICAUX LIBRES	14
I.2.5-STRESS OXYDANTE	15
I.2.5.1-DEFINITION.....	15
I.2.5.2-CONSEQUENCES DU STRESS OXYDANT.....	15
I.2.5.2.1-LA PEROXYDATION LIPIDIQUE	16
I.2.5.2.2-L'OXYDATION DE L'ADN.....	17
I.2.5.2.3-L'OXYDATION DES PROTEINES.....	17
I.2.5.3-PATHOLOGIQUES LIEES AU STRESS OXYDANT.....	18
I.3-LES ANTIOXYDANTES	19
I.3.1-DEFINITION.....	19
I.3.2-LES DIFFERENTES TYPES DES ANTIOXYDANTS.....	19
I.3.2.1-LES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES	19
I.3.2.2-LES ANTIOXYDANTS NON ENZYMATIQUES.....	21
I.3.2.3-LES COMPOSES PHENOLIQUES.....	23
I.3.2.3.1-DEFINITION.....	23
I.3.2.3.2-LES PRNCIPALES CLASSES DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	24

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1-PREPARATION DU MATEREIL VEGETALE.....	30
II.2-SECHAGE ET BROYAGE.....	30
II.3-EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX.....	31
II.4-DOSAGE DES DIFFERENTS GROUPES DE COMPOSES PHENOLIQUES.....	32
II.4.1-DOSAGE DES COMPOSES POLYPHENOLIQUES TOTAUX (PPT).....	32
II.4.2-DOSAGE DES FAVONOIDES TOTAUX (FVT).....	34
II.4.3-DOSAGE DES TANINS CONDENSES.....	35
II.5-ACTIVITES ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS.....	36
II.5.1- ACTIVITES SCAVENGING DU RADICAL DPPH°	36
II.5.2-ACTIVITES SCAVENGING DU RADICAL ABTS ^{°+}	37

II.6-CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE.....	39
II.7-ETUDE STATISTIQUE.....	41

Chapitre III : Resultats et Discussion

III.1-RENDEMENT DE L'EXTRACTION.....	42
III.2-DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	43
III.2.1-DOSAGE DES PHENOLS TOTAUX.....	43
III.2.2-DOSAGE DES FLAVONOIDES.....	44
III.2.3-DOSAGE DES TANINS CONDENSES.....	46
III.3-ACTIVITES ANTIOXYDANTS DE <i>ERIOBOTRYA JAPONICA L</i>	47
III.3.1-L'ACTIVITE SCAVENGING DU RADICAL DPPH'.....	47
III.3.2-L'ACTIVITES SCAVANGING DU RADICAL ABTS ^{•+}	49
III.4-CARACTERISATION DES EXTRAITS DES FEUILLES DE <i>ERIOBOTRYA JAPONICA L</i>	52
III.5-CARACTERISATION DE L'ACTIVITES ANTIOXYDANTE.....	58
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	64
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	66
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS : 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ARN : Acide Ribonucléique.

CAT : La catalase.

CCM : Chromatographie sur couche mince

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl.

ERN : Espèces réactives de l'oxygène.

ERN : Espèces réactives d'azote.

GRH : La glutathion réductase.

GRH : La glutathion réductase.

GSSG : Glutathion-disulfure.

GPx : La glutathion peroxydase.

H₂O₂ : Le radical peroxyde.

HO₂[•] : Radical perhydroxyle.

NADPH : Nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate.

NO[•] : Monoxyde d'azote.

NO₂[•] : Dioxyde d'azote.

O₂^{•-} : L'anion radicalaire superoxyde.

¹O₂ : L'oxygène singule.

ONOO[•] : Le peroxydinitrite.

OH[•] : Radical hydroxyle.

RL : Radicaux libres.

RO[•] : Radical alkoxy.

ROO[•] : Radical peroxy.

SOD : Superoxyde dismutase.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photographie des parties aérienne d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	4
Figure 2 : Distribution géographiques d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	5
Figure 3 : Structures chimiques des triterpènes dans les feuilles d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	6
Figure 4 : Structure des sesquiterpènes trouvé dans les feuilles d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	7
Figure 5 : Structure des flavonoïdes glycosidiques trouvé dans les feuilles d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	7
Figure 6 : Molécule d'oxygène comme un Radical libre.....	10
Figure 7 : Mécanisme de production des ROS et RNS.....	11
Figure 8 : Les sources des radicaux libres.....	14
Figure 9 : la balance Radicaux libres/antioxydants.....	15
Figure 10 : Lésions cellulaires induites par les radicaux libres.....	16
Figure 11 : Mécanisme de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux.....	16
Figure 12 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire.....	17
Figure 13 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des après attaque radicalaire.....	18
Figure 14 : Répartition des principales défenses antioxydants dans la cellule.....	19
Figure 15 : Schéma des défenses antioxydants enzymatique.....	12
Figure 16 : Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux libres.....	22
Figure 17 : Structure chimique de la vitamine E.....	22
Figure 18 : Structure des caroténoïdes.....	23
Figure 19 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)avec l'une des structures de base des tannins hydrolysables.....	26

Figure 20 : Les tannins condensés.....	26
Figure 21: Structure de base des flavonoïdes.....	27
Figure 22 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R [*]) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable.....	28
Figure 23 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métallique.....	29
Figure 24 : Photographie personnel des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i>	30
Figure 25 : Photographies personnels des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> (A) et de la poudre obtenir des feuilles(B).....	30
Figure 26 : Schéma d'extraction d' <i>Eriobotrya Japonica L</i>	31
Figure 27 : Protocole de dosage des polyphénols totaux.....	33
Figure 28 : Protocole de dosage des flavonoïdes.....	34
Figure 29 : Réaction chimique de la vanilline avec les tanins condensés.....	35
Figure 30 : Protocole de dosage des pro-anthocyanidines.....	35
Figure 31 : Forme libre et réduite du DPPH.....	36
Figure 32: Formation et piégeage du radical ABTS ^{o+} par un antioxydant donneur de H.....	38
Figure 33 : Dépôt des extraits sur le chromatographe.....	40
Figure 34 : Develloppement chromatographique d'une plaque.....	40
Figure 35 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i>	43
Figure 36 : Représentation graphique des teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya japonic L</i>	44
Figure 37 : Représentation graphique des teneurs en pro anthocyanidines des extraits des feuilles.....	46
Figure 38 : Activité scavenging du radical DPPH [*] des extraits d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> et des standards (BHA et l'acide ascorbique).....	47
Figure 39 : Activité scavenging du radical DPPH ^o radical à différents concentration d'extrait organique chloroforme et d'extrait organique d' hexane d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	49

Figure 40 : Activité scavenging du DPPH [°] à différents concentration de l'acide ascorbique et de la BHA.....	49
Figure 41 : Activité inhibitrice du radical ABTS ^{°+} par les extraits d' <i>Eriobotrya japonica L</i> et de standard trolox.....	49
Figure 42 : Activité inhibitrice du radical ABTS ^{°+} par les extraits d' <i>Eriobotrya japonica L</i> et de standard trolox.....	50
Figure 43 : Activité inhibitrice du radical ABTS ^{°+} à différentes concentration d'extrait éthanolique et des extraits aqueux des feuilles d' <i>Eriobotrya japonica L</i>	51
Figure 44 : Profil chromatographique des extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> réalisé a lumière du jour.....	52
Figure 45 : Vue sous UV de la plaque chromatographique des extraits de feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i>	53
Figure 46 : Profil chromatographique de tous les extraits de feuilles et de <i>Eriobotrya Japonica L</i> , pulvérisé avec la vanilline sulfurique.....	54
Figure 47 : Profil chromatographique des extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> réalisé a lumière du jour	55
Figure 48 : Vue sous UV de la plaque chromatographique des extraits de feuilles d' <i>Eriobotrya Japonica L</i>	56
Figure 49 : profil chromatographique des extraits d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> . pulvérisée avec la vanilline sulfurique.....	58
Figure 50 : Profil chromatographique des extraits d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> pulvérisée avec le DPPH	59
Figure 51 : profil chromatographique des extraits d' <i>Eriobotrya japonica L</i> , pulvérisée avec l'ABTS	60
Figure 52 : profil chromatographique des extraits d' <i>Eriobotrya Japonica L</i> . pulvérisée avec le DPPH	61
Figure 53 : profil chromatographique des extraits d' <i>Eriobotrya japonica L</i> , pulvérisée avec l'ABTS	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales caractéristiques des différentes parties d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	4
Tableau II : Principaux noms vernaculaires d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	5
Tableau III : Composition biochimique des fruits.....	6
Tableau IV : Les principales espèces oxygènes réactives.....	11
Tableau V : Les principales espèces réactives azotées.....	12
Tableau VI : Principaux acides hydroxybenzoïques.....	24
Tableau VII : Principaux acides hydroxycinamiques.....	25
Tableau VIII : Principaux types de coumarines.....	25
Tableau IX : Principales classes des composés phénoliques.....	27
Tableau X : Les taux d'extraction des extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	42
Tableau XI : Les taux d'extraction des feuilles d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	43
Tableau XII : Les IC ₅₀ de l'extrait éthanolique, extrait du chloroforme aqueux et d'hexane aqueux l'extrait aqueux des feuilles <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	51
Tableau XIII : Les couleurs des bandes des extraits sous UV et leur correspondance en composés phytochimiques.....	54
Tableau XIV : les couleurs des bandes des extraits après révélation avec la vanilline sulfurique.....	55
Tableau XV : Les couleurs des bandes des extraits sous UV et leur correspondance en composés phytochimiques.....	57
Tableau XVI : les couleurs des bandes des extraits après révélation avec la vanilline sulfurique.....	58

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les plantes médicinales ont toujours eu une place importante dans l'arsenal thérapeutique. De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires, qui sont largement utilisés en thérapeutique, comme des agents préventifs antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiseptiques, diurétiques (**Bourgaud et al., 2001 ; Kar, 2007**).

La production de radicaux libres est compensée par leur élimination grâce aux antioxydants de l'organisme. Chez tout individu, il existe, en permanence un équilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défense (antioxydants), si cet équilibre est rompu, le stress oxydatif apparaît, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles. Il semble donc intéressant de soutenir la défense antioxydante de l'organisme pour éviter cette rupture. C'est pourquoi les chercheurs se sont reconvertis vers la phytothérapie. En effet, les plantes médicinales représentent un réservoir immense en métabolites secondaires qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques capables d'entraver l'action de ces radicaux libres (**Pincemail, 1998 ; Valko, 2007**).

Eriobotrya japonica L est une plante médicinale qui appartient à la famille des Rosacées, bien connue en Japon et en Chine. Actuellement, cette plante est largement cultivée en Algérie, elle est connue pour ses nombreuses effets bénéfiques sur plusieurs maladies (la bronchite chronique, la fièvre, la toux...) (**Hideyuki et al., 2000 ; Takuhiro et al., 2013**).

Par conséquent, notre travail sera porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L*.

Cette étude est présentée en deux parties :

- La partie théorique qui englobe et rassemble des généralités sur la plante *Eriobotrya japonica L* ainsi les radicaux libres et leur effets néfastes sur l'organisme d'une part et les antioxydants qui sont destinés à les neutraliser d'autre part.
- La partie pratique aura pour objectif la détermination des teneurs en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes et tannins) et l'évaluation de l'activité antioxydante vis-à-vis du radical DPPH[•] et l'ABTS^{•+}.

- Finalement, Nous allons également essayer de fractionner et caractériser les polyphénols présents dans les extraits et leurs potentiels anti-radicalaires contre deux radicaux synthétiques (DPPH[•], ABTS^{•+}) par chromatographie sur couche mince (CCM).

Des dosages des composés phénoliques et une caractérisation des extraits ont été réalisés afin d'établir des corrélations entre les différentes activités étudiées et les composés phénoliques.

Chapitre I :

*SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE*

I.1-GENERALITES SUR ERIOBOTRYA JAPONICA L :**I.1.1-HISTORIQUE:**

Eriobotrya japonica a été employée depuis longtemps comme une plante medicinale, bien connue au Japon et en Chine (**Hideyuki et al., 2000 ; Hamada et al., 2004**), elle a été présentée comme un arbre ornementale en VXIII éme siecle (**Germana et al., 2006**).

Elle a été cultivée pendant plus de 2000 ans et maintenant elle est commercialement cultivée dans plus de 30 pays dans le monde entier, y compris le Japon, la Turquie, l'Espagne, le Brésil...ect (**Zhang et al., 2015**), sa culture en Asie orientale est très antique tandis que la diffusion de la récolte vers l'Europe avait lieu plus récemment, en 1784 où on l'a établie dans les jardins botaniques de Paris (**Vilanova et al., 2001**).

La Chine, le Japon et le nord Inde sont les régions principales de diversité génétique d'*Eriobotrya japonica* dans le monde. On l'estime qu'elle a été apportée en Turquie, Algérie et le Liban depuis 150-200 ans (**Demir, 1987**), ainsi que la Chine est le plus grand producteur du monde avec plus de 314.000 tonnes. En dépit de la conduite de la Chine dans la production, l'Espagne explique 84% d'exportations dans le monde entier (**Caballero et et Ferná ndez, 2004**).

I.1.2-DESCRIPTION BOTANIQUE D'ERIOBOTRYA JAPONICA L :


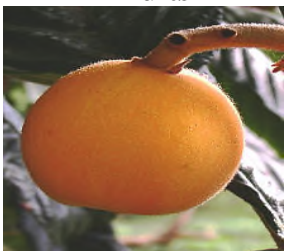


Eriobotrya japonica est un arbuste à feuilles persistantes ou un petit arbre avec les feuilles étroites qui sont vert-foncé sur les extrémités et ont une couleur plus légère sous la surface, il atteint 6-8m d'hauteur (Figure 1) (**Orwa et al., 2000 ; Cha et al., 2011**). Il fleurit à l'automne ou au début de l'hiver, et ses fruits mûrissent à la fin de l'hiver ou au début du printemps (**Delfanian et al., 2015**), il est bien adapté pratiquement à tous les sols qui ont le bon drainage interne et par conséquent se développe également bien dans l'acide et les sols alcalins (**El-Refaey et El- Dengawy, 2005**). En général, on peut le trouver dans les climats maritimes entre l'altitude 20°et 35°au nord et au sud, mais il peut croître à l'altitude 45° (**Chalaka et al., 2014**).



Figure 1: Photographie des parties aérienne d'*Eriobotrya japonica* L (i).

I.1.2.1-CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES PARTIES DE LA PLANTE :

Tableau I : Principales caractéristiques des différentes parties d'*Eriobotrya japonica* L.

Organe	Caractéristique	Référence
<p>Feuille</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -persistantes -Forme : ovale -Vennation des feuilles:Pinnate -Couleur : verte -Langueur : 21 à 32cm 	<p>(Edouard et al., 1993)</p> <p>(Orwa et al., 2009)</p> <p>(Goulas et al., 2014)</p>
<p>Fruits</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Forme : arrondi, ovale, avec une peau lisse ou duveteuse -Couleur : orange, jaune -Longueur : 2,5 à 8cm -chaque fruit soutient 1 à 5 graines 	<p>(Edouard et al., 1993)</p> <p>(Orwa et al., 2009)</p> <p>(Mesojo et al., 2010)</p> <p>(Ercislia et al., 2012)</p>
<p>Fleurs</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Parfum : plaisant -Couleur : blanche -Largueur : 1,2cm -Contient 5 pétale 	<p>(Edouard et al., 1993)</p> <p>(Ferrerres et al., 2009)</p> <p>(Orwa et al., 2009)</p>
<p>Graines</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -couleur : brunes tendant ver le noir -sont grande et occupent 20 à 30% de volume de fruit -forme : oblongue de 1-2cm de long 	<p>(Orwa et al., 2009)</p> <p>(Mesejo et al., 2010)</p> <p>(Garima et Casimir, 2010)</p>

I.1.2.2-CLASSIFICATION BOTANIQUE DE *ERIOBOTRYA JAPONICA* L :

- **Régne** : Végétal.
- **Classe** : Dicotylédones (Tonellie et Gallouin, 2013).
- **Ordre** : Pomée (Tonellie et Gallouin, 2013).
- **Famille** : Rosaceae (Delfania et al., 2014).
- **Sous-famille** : Maloideae (Mesejo et al., 2007).
- **Genre** : *Eriobotrya* (Lin, 2007).
- **Espèce** : *Eriobotrya japonica* L.

I.1.2.3-NOMS VERNACULAIRES DE L'ESPECE :

Tableau II : Principaux noms vernaculaires d'*Eriobotrya japonica* L.

Langue	Nom et Référence
Arabe	Zaroure
Kabyle	Hab l'emlouk
Français	Bibassier ou prune japonaise, Néflier du japon (kazunori et al., 2007 ; Lin et al., 2007)
Anglais	Loquat (Edouard et al., 1993)

I.1.3-DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE DE LA PLANTE :

Eriobotrya japonica est un arbre provenant des régions fraîches de la Chine et du Japon de sud-est, il se développe dans le climat subtropical et dans les tropiques, et très bien adapté aux pays à température douce et dans les secteurs où du citron est cultivé (Demir, 1987 ; Lin et al., 1999 ; Esmaili et al., 2012). Il est maintenant également cultivé dans les régions méditerranéennes ainsi que en Australie, Afrique du sud, Amérique du sud, la Californie, en Inde et le nord d'Inde (Figure 2) (Esmaili et al., 2012).



Figure 2 : Distribution géographique d'*Eriobotrya japonica* L (Orwa et al., 2009).

I.1.4-COMPOSTION BIOCHIMIQUE D'ERIOBOTRYA JAPONICA L :

➤ **LES FRUITS :**

Le néfle est un fruit comestible composé de plusieurs éléments, il est riche en vitamines A et B, substances minérales, sels, et les sucres (Shahi-Gharahlar et al., 2009 ; Ercislia et al., 2012).

Tableau (III) : Composition biochimique des fruits du néflier.

l'eau	d'hydrates de carbone	de fibre	de graisse	d'autres composants
78%	10,6%	10,2%	0,5%	0,4%

➤ **LES FEUILLES :**

Les feuilles d'*Eriobotrya japonica* contiennent beaucoup de composants bioactifs tels que des triterpènes, sesquiterpines, composés phénoliques ou les polyphénols (flavonoïdes, tannins), glycosides de mégastignane (Ju-Sang et al., 2011 ; Xiao-Hang et al., 2012).

✓ **LES TRITERPENES :**

Les feuilles de cette plante contiennent une série de triterpènes, y compris l'acide tormentique (AT), l'acide ursolique (AU), l'acide maslinique (AM), et l'acide oleanolique (AO) (Figure 3) (Hui-ya et al., 2010 ; Xiao-Hang et al., 2012).

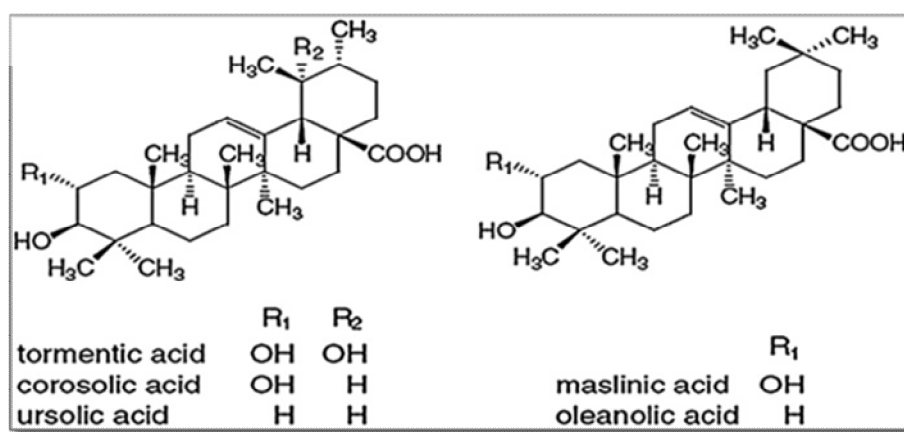


Figure 3 : Structures chimiques des triterpènes dans les feuilles d'*Eriobotrya japonica* L (Hui-ya et al., 2010).

✓ **LES HUILLES ESSENTIELS :**

Il existe plusieurs genres d'huiles essentielles dans les feuilles d'*Eriobotrya japonica*, comme le nérolidol, le farnesol, l' α -pénène, la β -pénène, le camphène, la β -myrcène, le p-cymène, le linalol, l'oxyde trans-linalol, l' α -ylangène, l' α -frnesene, la β -farmésène, le camphre, le nérol, l' α -cadinol, le cis - β , γ hexénol, ainsi que, 61 à 70% est représenté par nérolidol (Zheng et al., 1998).

✓ **LES SESQUITERPENES :**

Beaucoup de sesquiterpènes ont été trouvés dans les feuilles d'*Eriobotrya japonica*, dont la plupart d'entre eux sont des sesquiterpènes glycosides caractérisés par le nérolidol ou isohumbriol comme l'aglycones et par les chaînes oligosaccharidique ramifiées constituées d'Al-rhamnopyranoxyl et de B-D-glicopyranosyl (Figure 4) (Chen et Li, 2008).

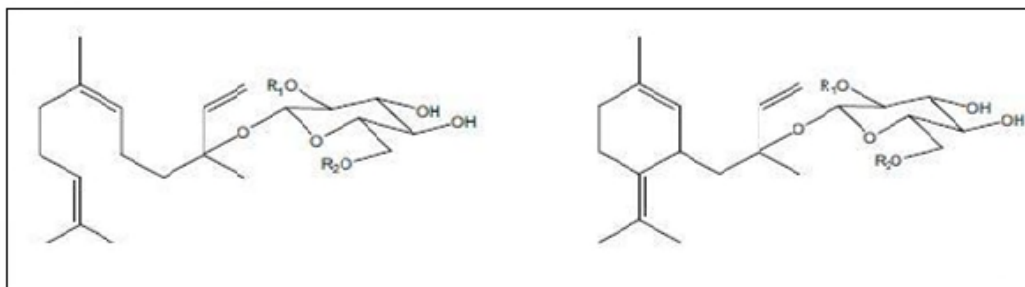


Figure 4 : Structure des sesquiterpènes trouvés dans les feuilles d'*Eriobotrya japonica L* (Chen et Li, 2008).

✓ **LES POLYPHENOLES :**

L'extrait hydrophile des feuilles d'*Eriobotrya japonica* fournit une source riche en composés phénoliques polaires tels que les flavonoïdes glycosidiques (Figure 5), les procyanidines (Matalka et al., 2012).

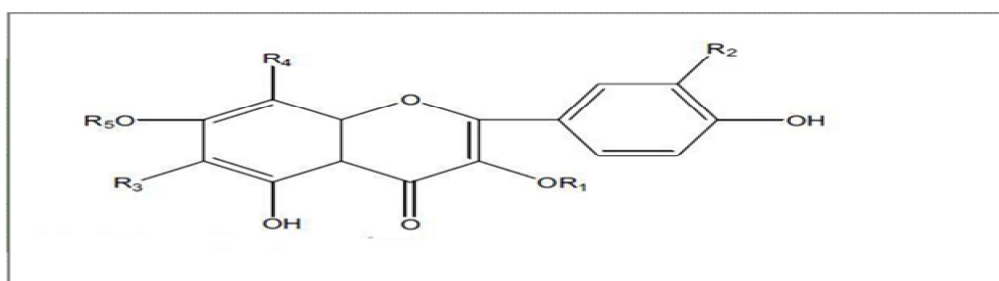


Figure 5: Structure des flavonoïdes glycosidiques trouvés dans les feuilles d'*Eriobotrya japonica L* (Chen et Li., 2008).

➤ **AUTRES CONSTITUANTS :**

Il y a d'autres constituants isolés dans les feuilles de la plante tels que : les vomifoliol-9-O-β-D-glucopyranoside, 3-oxo-α-ionyl-9-O-β-D-glucopyranoside, 3-oxo-α-ionyl-9-O-β-D-apiofuranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranoside et vomifoliol-9-O-β-D-apiofuranosyl-(1-6) -β-D-glucopyranoside (de **Tommasi et al., 1992**), acide chlorogénique, acide 3-O-caffeoylquinique, acide 4-O-caffeoylquinique, acide 4-O-p-coumaroylquinique (**Ito et al., 2000**), amygdaline, acide tartarique, acide citrique (**Zheng et al., 1998**).

I.1.5-USAGE THERAPEUTIQUES DE LA PLANTE :

Eriobotrya japonica est une plante médicinale bien connue en Asie de l'Est, ses feuilles ont été utilisées traditionnellement pour le traitement de plusieurs maladies comprenant les maladies de la peau, les maladies respiratoires, y compris la toux, l'asthme et la bronchite chronique, la douleur et les maladies inflammatoires telles que le mal de tête, la fièvre. Aussi bien que pour les désordres gastro-entériques, les tumeurs, les problèmes de foie, et la néphropathie...ect (**Hideyuki et al., 2000 ; Cha et al., 2011 ; Kim et al., 2011 ; Xiao-Hong et al., 2012**).

I.1.6-LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE LA PLANTE :

Actuellement, diverses études pharmacologiques sont concentrées sur les feuilles d'*Eriobotrya japonica* puisqu'elles sont une source riche en composés phénoliques et en triterpènes qui possèdent des effets bénéfiques (**Hui-ya et al., 2010 ; Jan-sang et al., 2011 ; Xiao-Hong et al., 2012**).

➤ **ACTIVITE ANTIOXYDANTE :**

Selon **Yanping et al., (2008), Jung et al., (1999), Phyu et al., (2013)**, l'administration d'extrait éthanolique des feuilles d'*Eriobotrya japonica* et les fractions solubles de la plante (le thé de la plante) à des rats ont démontré une forte activité inhibitrice du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl), de la peroxydation lipidique et de suppression des espèces Réactives de l'Oxygéné (ERO) cellulaires.

➤ **ACTIVITE ANTIDIABETIQUE :**

Les sesquiterpènes glycosidiques et les triterpènes polyhydroxylés ont produit une inhibition marquée de glucosurie chez les souris génétiquement diabétique. En outre, ces

triterpènes polyhydroxylés (acide corosolique, acide pomolique) sont capable de réduire la glycémie chez des rats sains (**de Tommasi et al., 1991 ; Li et al., 2004**).

Li et al., (2007), ont démontré que l'extrait éthanolique (70%) des feuilles d'*Eriobotrya japonica* exerce un effet hypoglycémiant significatif chez les souris diabétiques traités avec l'alloxane et les sesquiterpènes totaux abaissent la glycémie que sa soit pour les souris normales ou les diabétique traité par l'alloxane.

➤ **ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE :**

Les acides de triterpènes dérivés des feuilles d'*Eriobotrya japonica* (extrait brut) sont des composés efficaces qui pourraient supprimer la réponse inflammatoire induite par LPS (lipopolysaccharide) en empêchant la production de l'oxyde nitrique (NO^{*}) dans les LPS et les prostaglandines E2 (PGE2) chez les rats (**Phyu et al., 2013 ; Takuhiro et al., 2013**).

➤ **ACTIVITE ANTICANCEREUSE :**

L'extrait des feuilles d'*Eriobotrya japonica* a plusieurs effets anticancéreux comprenant la cytotoxicité forte dans le cancer du col de l'utérus et le cancer des pommons, empêche l'adhérence, la migration et l'invasion du cancer du sein et la migration des cellules de mélanome (**Kim et al., 2011 ; Takuhiro et al., 2013**).

Takuhiro et al., (2013), ont montré que les triterpènes des feuilles d'*Eriobotrya japonica* ont des effets antiprolifératifs sur des cellules humaines de leucémie mais pas dans les cellules fibroblastes de la peau normale, et cela se fait par dysfonctionnement mitochondriale et par l'activation des caspases.

➤ **ACTIVITE ANTI-VIRALE :**

L'acide 3-O-trans-caffeoyltormentique isolé de feuilles d'*Eriobotrya japonica* peut réduire l'infection au rhinovirus mais inefficace contre HIV-1 et la replication du virus sindbis (**de Tommasi, 1992**).

1.1.7-TOXICITE D'ERIOBOTRYA JAPONICA L :

Selon **Shafi et Tabassum (2013)**, l'administration orale d'extrait éthanolique des graines d'*Eriobotrya japonica* à des doses uniques (500, 1000,1200, 2000 mg/kg) à des souris peut indiquer que la DL₅₀ est plus grande que le poids corporelle 2000 mg/kg et l'extrait peut être sans risque donné jusqu'à cette dose et sans n'importe quel effet toxique chez les souris.

I.2-RADICAUX LIBRES :

I.2.1-DEFINITION :

Un radical libre est une espèce chimique, neutre ou chargée, caractérisée par un électron libre dit « célibataire » sur son orbitale externe. L'électron célibataire est conventionnellement représenté par un «•» (Vergely et Rochette, 2003), c'est un élément très réactif du fait de la tendance de cet électron à se réappairier ce qui déstabilise d'autres molécules (Ghisolfi-Marque *et al.*, 1996). Il possède une durée de vie extrêmement courte (10^{-9} - 10^{-6} S) (figure 6) (Tessier et Marconnet, 1995 ; Vergely et Rochette, 2003).

Ils peuvent se former au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radicalaire (Kocechlin-Ramonatxo, 2006). En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Ghisolfi-Marque *et al.*, 1996).

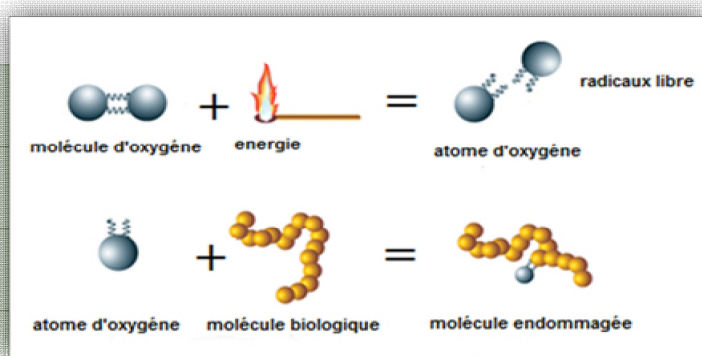


Figure 6 : Molécule d'oxygène comme un Radical libre (Ohare, 2007)

I.2.2-LES ESPECES OXYDANTES EN BIOLOGIE:

Dans le domaine de la biologie, les espèces radicalaires les plus importantes sont les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote (ERN) (Figure 7) (Vergely et Rochette, 2003 ; Delattre *et al.*, 2005a ; Lien Ai Pham-Huy *et al.*, 2008). Les ERO/ERN sont connus pour jouer un rôle bivalent dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être nocifs ou salutaires aux systèmes vivants. Ils peuvent être produits par des sources endogènes et exogènes (Figure 8) (Valko *et al.*, 2006 ; Lien Ai Pham-Huy, 2008).

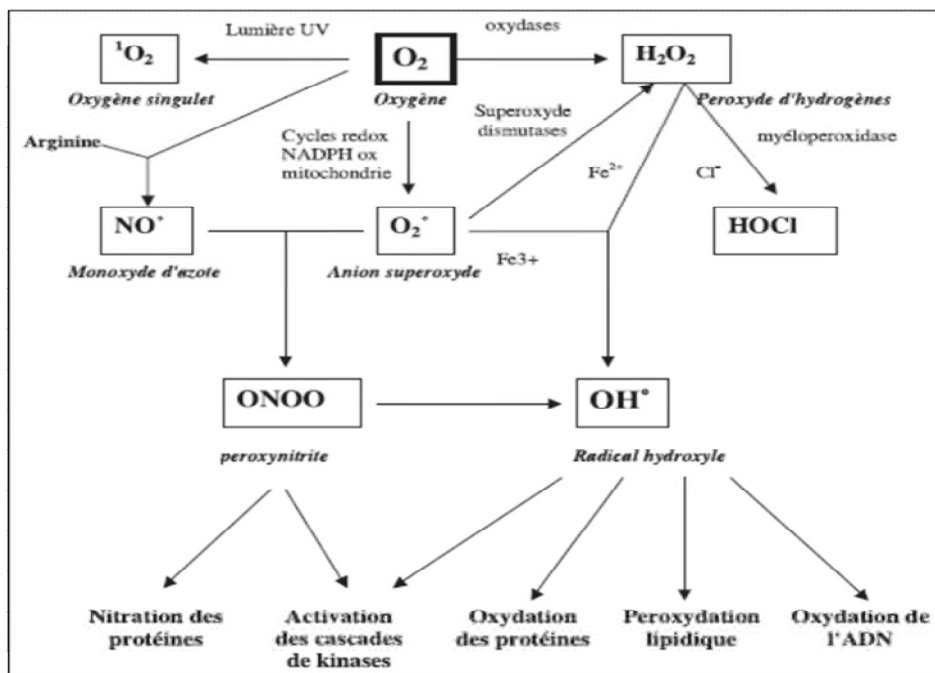


Figure 7 : Mécanisme de production des ERO et ERN (Hazout et al., 2008)

I.2.2.1-ESPECES REACTIVES DE L’OXYGENE (ERO) :

Tableau IV : Les principales espèces réactives de l’oxygéné :

Les espèces réactives oxygénées radicalaires		Les espèces oxygénées non radicalaires	
Radical	Réactions	Espèces	Réactions
Radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)	$^{\circ}O-O^{\circ} + e^- \rightleftharpoons O-O^{\circ} (O_2^{\bullet-})$ (Halliwell, 1997 ; Stief, 2003).	L’oxygène singulet (1O_2)	$^{\circ}O-O^{\circ} \rightleftharpoons ^1O_2$ (sous l’action de la lumière). (Choe et Min, 2005 ; Hennebelle, 2006 ; Rao P et al., 2011)
Radical hydroxyle (OH^{\bullet})	La réaction d’Haber Weiss : $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightleftharpoons OH^{\bullet} + OH^- + O_2$ La réaction de Fenton : $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightleftharpoons Fe^{+3} + OH^{\bullet} + OH^-$ (Vergely et al., 2003 ; Ré et al., 2005)	Le peroxyde d’hydrogène (H_2O_2)	(Halliwell et al., 1984 ; Stief, 2000 ; 2003). $O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2 + O_2$ $O_2^- + 2H^+ \rightleftharpoons H_2O_2$
Radical perhydroxyle (HO_2^{\bullet})	est obtenu après protonation de $O_2^{\bullet-}$ à pH inférieur à 4,8 (pKa ($HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$) = 4,8) (Hool et clin, 2006)		
radical peroxyde (ROO^{\bullet})	$R^{\bullet} + O_2 \rightleftharpoons ROO^{\bullet}$ (Rezaire, 2012)		
radical alkoxyde (RO^{\bullet})	$RO_2H \rightleftharpoons RO^{\bullet} + OH$		

I.2.2.2-LES ESPECES REACTIVES AZOTEES (ERN) :

Tableau V : Les principales espèces réactives azotées :

Espèces radicalaires azotées		Espèces non radicalaires azotées	
Radical	Réactions	Espèce	Réactions
monoxyde d'azote (NO•) (Barouki, 2006)	L- Arginine + O2 \rightleftharpoons	dioxyde d'azote (NO ₂ •)	2NO• + O ₂ \rightleftharpoons 2NO ₂ • (Halliwell, 1997 ; Wiernsperger, 2003; Lee et al., 2004)
	L-Citrulline +NO•	Le peroxydinitrite (ONOO•)	NO• + O ₂ • \rightleftharpoons ONOO• (Knight, 1999 ; Wiernsperger, 2003)

I.2.3-PRINCIPALES SOURCES DES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE ET DE L'AZOTE :

I.2.3.1-SOURCES ENDOGENES :

➤ **NADPH OXYDASE :**

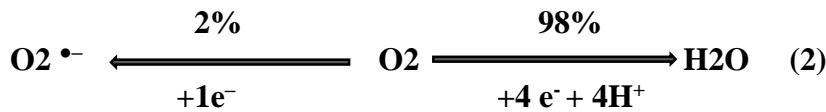
La NADPH oxydase est une enzyme cellulaire initialement retrouvée dans les cellules phagocytaires, à l'origine de la production extracellulaire d'anions superoxydes nécessaires à la destruction d'éléments étrangers qui seront finalement phagocytés (Parihar et al., 2008). Des études récentes ont montré que les NADPH oxydases des cellules vasculaires constituent une source majeure d'ERO, particulièrement, du radical superoxyde O₂•⁻ par transfert d'un électron sur l'oxygène (Bonnefont-Rousselot et al., 2002).



➤ **LA MITOCHONDRIE :**

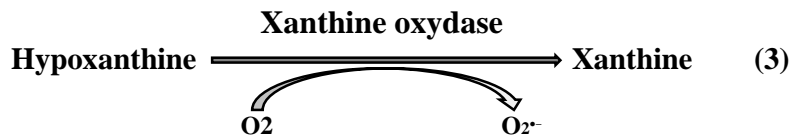
Elle est considérée comme une des principales sources d'ERO dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Pervaiz et Clement, 2007). Dans la mitochondrie à l'état physiologique, il existe lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, une fuite d'électrons au niveau du complexe I et III, à l'origine de la

production de l'O₂^{•-} (Ballinger, 2005). Aussi la plupart du H₂O₂ cellulaire provient des mitochondries par dismutation d'O₂^{•-} (Beaudeau et al., 2006).



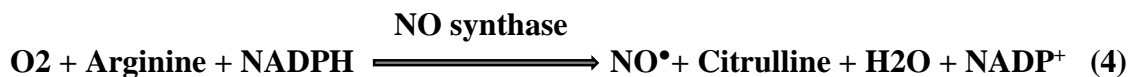
➤ **XANTHINE OXYDASE :**

La xanthine oxydase fait partie d'un autre système enzymatique capable de générer le O₂^{•-} par transfert d'un électron sur l'oxygène (Bonfont-Rousselot et al., 2002). Dans les situations d'hypoxie ou d'ischémie suivie de reperfusion, l'activation intracellulaire de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase va provoquer une formation importante de O₂^{•-} en présence d'oxygène (réaction 3) (Goudable et Favier, 1997 ; Deby-Dupont et al., 2002).



➤ **L'OXYDE NITRIQUE SYNTHETASE :**

La NO synthase est une flavoenzyme calcium dépendante qui va produire du NO[•] grâce à l'oxydation de la L-arginine par l'oxygène (réaction 4) (Bérard, 1997 ; Huet et Duranteau, 2008).



I.2.3.2-SOURCES EXOGENES :

Les radicaux libres (RL) également peuvent être produits dans le cas des rayonnements UV et des radiations ionisantes, des toxiques présents dans notre environnement (suie, goudron, tabac, polluants industriels, des pesticide, des métaux lourds s,) ou des carences nutritionnelles (Fontaine et al., 2002 ; Pincemail, 2002 ; Favier, 2003 ; Rao P et al., 2011).

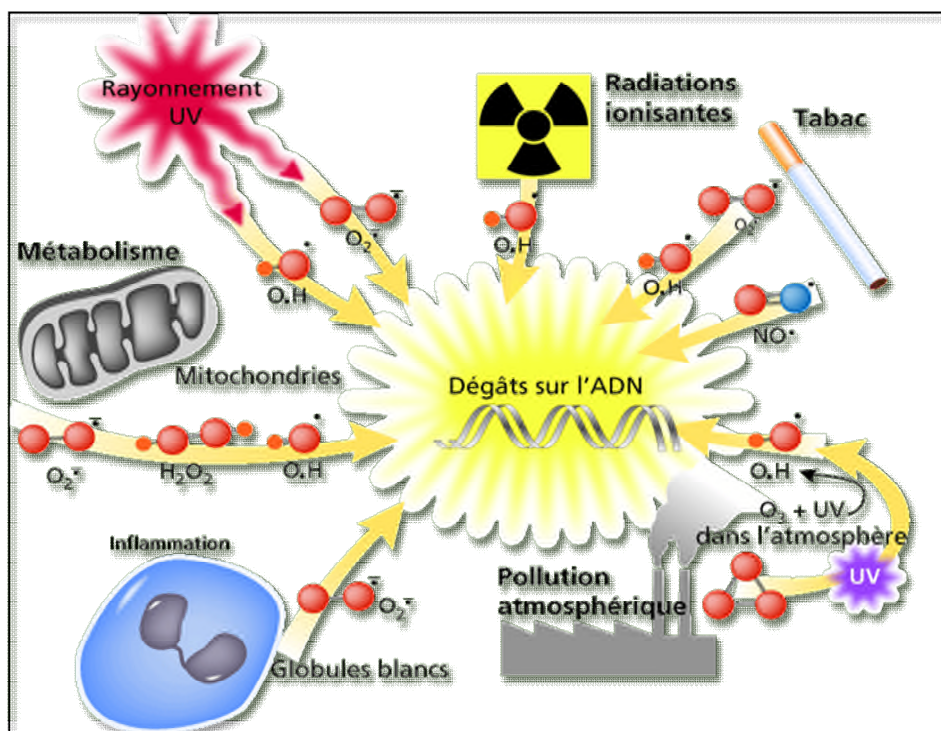


Figure 8 : Les sources des radicaux libres (Ohare, 2007).

I.2.4-ROLES PHYSIOLOGIQUES DES RADICAUX LIBRES :

Dans un système biologique, les radicaux libres peuvent avoir des effets opposés, et ce en fonction de leur lieu de formation et des quantités produites. Les R-L lorsqu' ils sont formés en faibles concentrations, participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule et à la régulation des gènes. Jouant ainsi un rôle important comme seconds messagers, dans le contrôle des processus cellulaires physiologiques tels que la croissance, la migration, la sénescence, l'apoptose ou la survie des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2002 ; Favier, 2003 ; Flourie et *al.*, 2006 ; Ardestani et Yazdanparast, 2007 ; Huet et Duranteau, 2008).

A titre d'exemple, l'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) sont des médiateurs régulant certaines fonctions biologiques telles que la vasodilatation capillaire, la prolifération ou encore la signalisation nerveuse (Favier, 2003).

I.2.5-STRESS OXYDANT:

I.2.5.1-DEFINITION :

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des ERO et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (Sayre et al., 2005 ; Bloomer et al., 2008 ; Browne et al., 2008 ; Power et al., 2010). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink et al., 2008). Ce qui produit des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires (Figure 9) (Gammoudi et al., 2013).

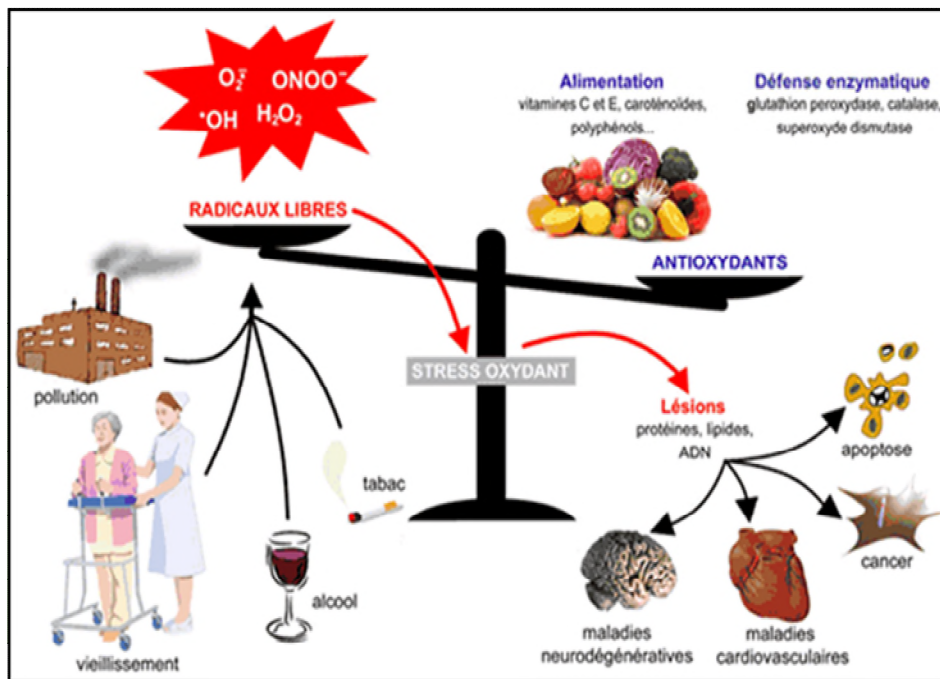


Figure 9 : La balance Radicaux libres/antioxydants (Sandrine et Morandat, 2013).

I.2.5.2-CONSEQUENCES DU STRESS OXYDANT :

Les molécules biologiques : protéines, les lipides, glucides et l'ADN sont sujettes à l'attaque radicalaire, provoquant ainsi un dysfonctionnement dans les activités vitales des cellules à l'origine du développement de diverses pathologies (Figure 10) (Koechli-Ramonatxo, 2002 ; Pincemail, 2004 ; Halliwell, 2007 ; Jacob, 2007).

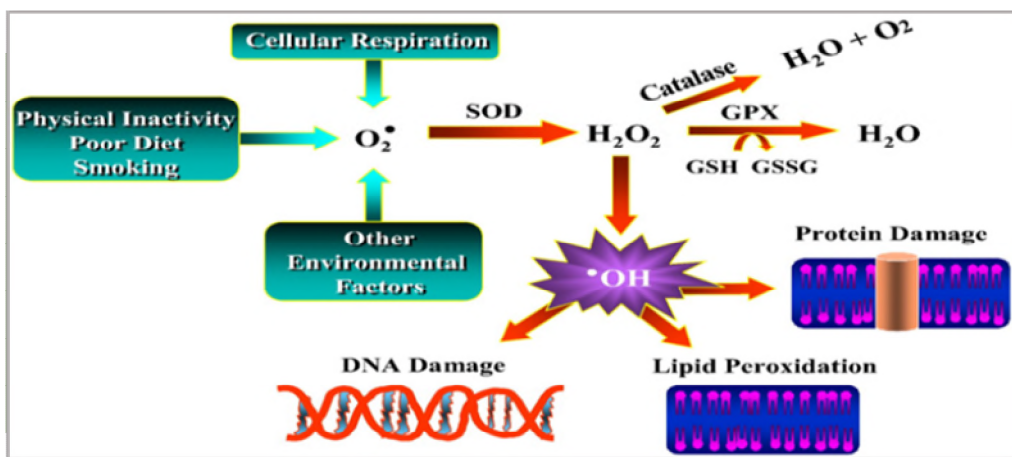


Figure 10 : Lésions cellulaires induites par les radicaux libres (Roberts et Sindhu, 2009).

I.2.5.2.1-LA PEROXYDATION LIPIDIQUE :

Les membranes cellulaires riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) (acides linoléique, linolénique et arachidonique) sont très sensibles à l’oxydation en raison de leur degré élevé d’insaturation cellulaire phospholipidique déclenche une réaction en chaîne appelé lipoperoxydation cellulaire. Cette attaque des lipides peut concerner aussi bien les phospholipides membranaires que les lipoprotéines circulantes, avec évidemment des conséquences différentes. En effet, l’atteinte des phospholipides membranaires va entraîner une modification de la fluidité membranaire, altérer les systèmes de transfert d’ions ainsi que le fonctionnement de nombreux transporteurs, récepteurs et affecter les voies de transduction des signaux (Figure 11) (Pamplona *et al.*, 2000 ; Favier, 2003 ; Lacolley *et al.*, 2007 ; Duranteau et Huet, 2008 ; Sachdev et Davies, 2008).

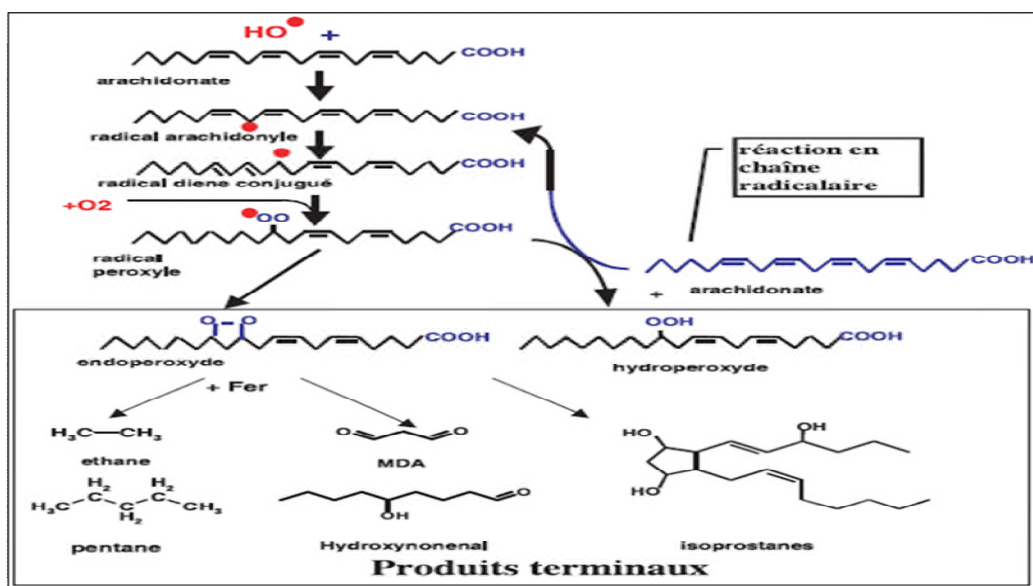


Figure 11 : Mécanisme de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux (Favier, 2003).

I.2.5.2.2-OXYDATION DE L'ADN :

L'ARN et l'ADN constituent des cibles cellulaires importantes pour les attaques radicalaires (Halliwell et Gutteridge, 2007). Les lésions induites par les radicaux libres au niveau de ces molécules peuvent consister en des modifications de bases, des cassures simple-brin ou double-brin de la chaîne oligonucléotidique, ou des pontages avec des résidus protéiques (Favier, 1997 ; Duranteau et Huet, 2008). Les modifications observées après action du radical hydroxyle sont très nombreuses et peuvent consister en une conversion des bases ou oxydation du désoxyribose entraînant une coupure des brins. Ces dénaturations peuvent avoir de graves conséquences sur la réplication du génome (Figure 12) (Sohal et al., 2002 ; Shimizu, 2004 ; Halliwell et Gutteridge, 2007 ; Amiard, 2013).

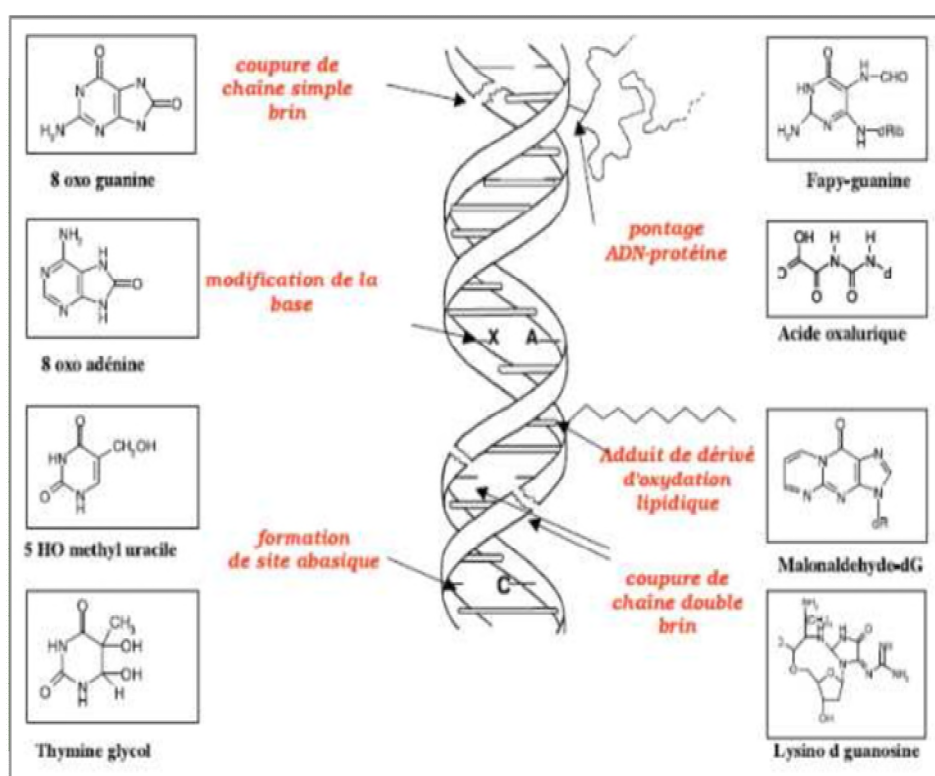


Figure 12 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire (Favier, 2003).

I.2.5.2.3-OXYDATION DES PROTEINES :

Les protéines peuvent être également la cible de réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications sous l'action des ERO et des ERN (Figure 13). Les protéines atteintes peuvent se fragmenter ou se dénaturer avec altération de leurs structures primaires et secondaires. La nitration des protéines par le peroxy-nitrite se traduit par l'inactivation de nombreuses enzymes telles que la Mn-SOD. Les protéines comportant un pont sulfhydryle

sont les plus sensibles aux attaques radicalaires. Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées (Grune *et al.*, 1998 ; Davies *et al.*, 1999 ; Baudin, 2006 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006 ; Duranteau et Huet, 2008).

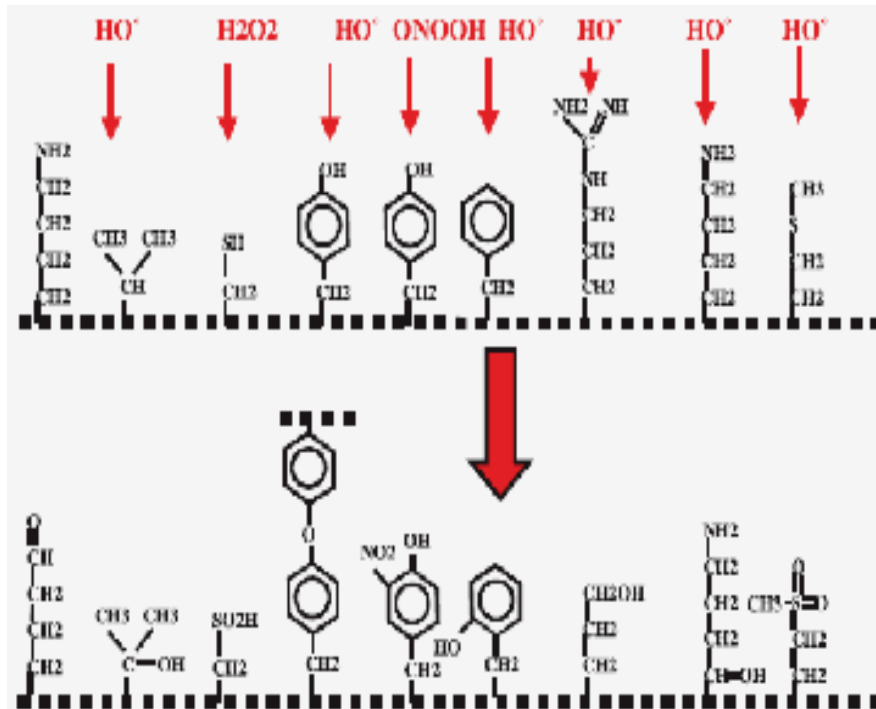


Figure 13 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

I.2.5.3-PATHOLOGIES LIEES AU STRESS OXYDANT :

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies, incluant l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, le vieillissement, cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires. 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 (Ghisolfi-Marque *et al.*, 1996 ; Durand *et al.*, 2005 ; Madamanchi *et al.*, 2005 ; Pham-Huy *et al.*, 2008).

I.3-LES ANTIOXYDANTS:

I.3.1-DEFINITION:

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques, endogène ou exogène (Figure 14) (Bonfont-Rousselot et coll, 2003 ; Favier, 2003 ; Vansant, 2004).

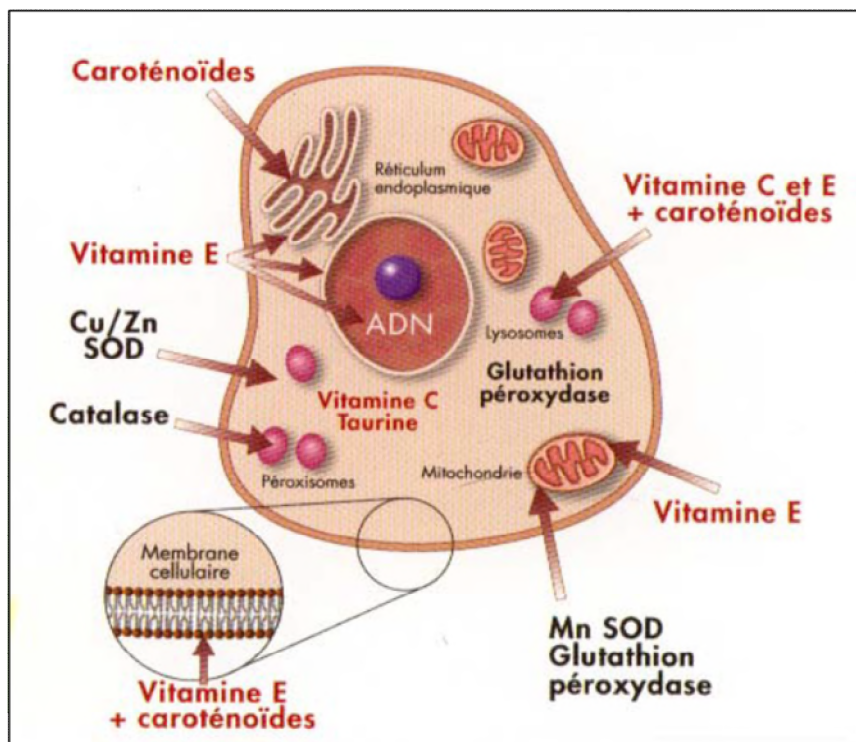


Figure 14 : Répartition des principales défenses antioxydantes dans la cellule (Opara, 2002).

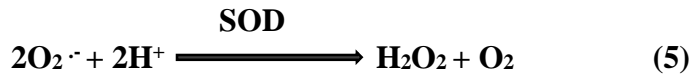
I.3.2-LES DIFFERENTS TYPES DES ANTIOXYDANTS :

I.3.2.1-LES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES :

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), de catalase et de glutathion peroxydase et de glutathion réductase qui sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO (Figure 15) (Favier, 2006 ; Chavan et Melinkeri, 2013 ; Sharma *et al.*, 2012).

✓ **SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD) :**

C'est l'enzyme la plus importante dans la défense contre le stress oxydatif (**Buldak et al., 2014**), elle catalyse la dismutation de l'O₂^{·-} en H₂O₂ (**Guichardant et al., 2006**).



Il existe trois espèces de cette enzyme :

- Une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD).
- Une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD).
- Une forme extracellulaire (Ec-SOD).

Il été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (**Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001**).

✓ **LA CATALASE (CAT) :**

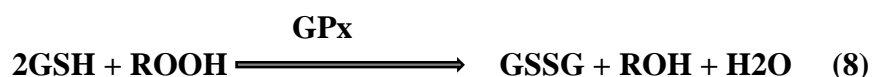
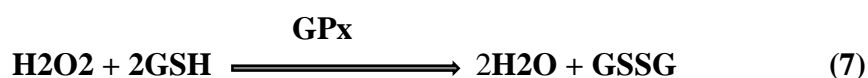
Essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, elle est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Contrairement à la glutathions peroxydases GPx l'affinité de la catalase pour l'H₂O₂ est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (**Delattre et al., 2005 ; Nicholls, 2012 ; Buldak et al., 2014**).



✓ **LA GLUTATHION (GPx) ET REDUCTASE (GR) :**

➤ **LA GLUTHATHION PEROXYDASE (GPx) :**

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG), elle prend aussi en charge des lipides peroxydés (**Valko et al., 2006 ; Srinivason et al., 2012**) Selon les réactions :



➤ **LA GLUTATHION REDUCTASE (GRH) :**

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction (Srinivason *et al.*, 2012)

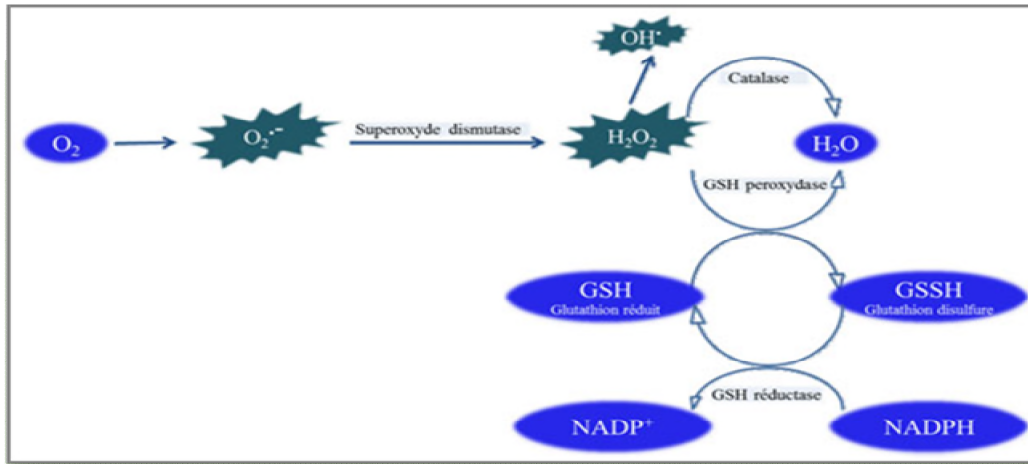


Figure 15 : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (Benlemlih et Ghanam, 2012).

I.3.2.2-LES ATIOXYDANTS NON ENZYMATIQUES :

Les antioxydants non enzymatiques sont des systèmes de défense secondaires (Koechlin Ramonatxo, 2006) tels que la vitamine E, les caroténoïdes et les flavonoïdes (Afonso *et al.*, 2007), à ceux-là s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certaines enzymes antioxydantes (Pincemail et Defraigne, 2004).

✓ **LA VITAMINE C :**

La vitamine C ou acide ascorbique n'est pas synthétisé par l'organisme, sa concentration plasmatique dépend fortement de l'alimentation, il est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, des radicaux hydroxyles, et de l'oxygène singlet. Le rôle antioxydant de la vitamine C est basé sur sa réaction avec les radicaux peroxydes aqueux, avant qu'ils initient la peroxydation lipidique le produit formé étant le radical ascorbyle. La vitamine C protège ainsi les biomembranes et les lipoprotéines et joue un rôle essentiel dans

la régénération de la vitamine E oxydée (Figure16) (Delattre *et al.*, 2005 ; Defraigne et Pincemail, 2008 ; Bouldjadj, 2009).

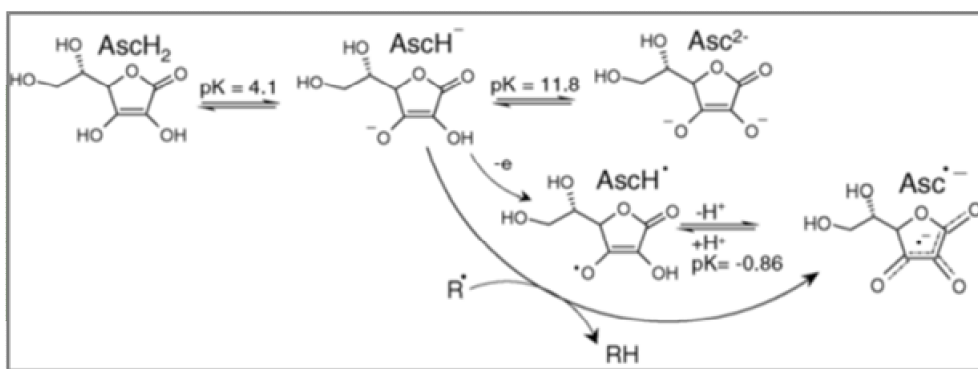


Figure 16 : Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux libres (Valko *et al.*, 2006).

✓ **LA VITAMINE E (α -tocophérol) :**

La vitamine E ou α -tocophérol est une vitamine lipophile, Le rôle essentiel de la vitamine E (Figure 17) est de capter les radicaux peroxydes lipidiques RO₂ qui propagent les chaînes de peroxydation. La partie active de la molécule étant la fonction phénol réductrice (α -TH), celle-ci perd facilement un atome d'hydrogène et se transforme en radical α -tocophéryle, α -T•, tandis que le radical peroxyde est réduit en une molécule d'hydroperoxyde. De plus, l' α tocophérol capte les radicaux superoxydes (sous leur forme protonée HO₂•), les radicaux hydroxyles OH•, ainsi que l'oxygène singulet ¹O₂ (Gardès-Albert *et al.*, 2003 ; Vertuani *et al.*, 2004).

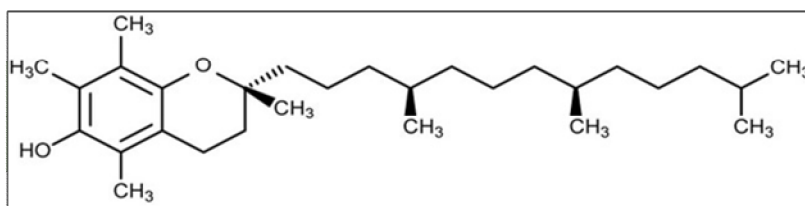


Figure 17 : Structure chimique de la vitamine E (Evans *et al.*, 2002)

✓ **Les caroténoïdes (la provitamine A) :**

Les caroténoïdes possèdent dans leur structure chimique de très nombreux doubles liaisons conjuguées qui sont responsables de leur activité antioxydante (Figure 18). Ils sont susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. En outre, le β -carotène

est la molécule la plus connue comme étant un puissant désactivateur de l'oxygène singlet ($^1\text{O}_2$), (réaction 10) (Pincemail et al., 1999 ; Laguerre, 2007).

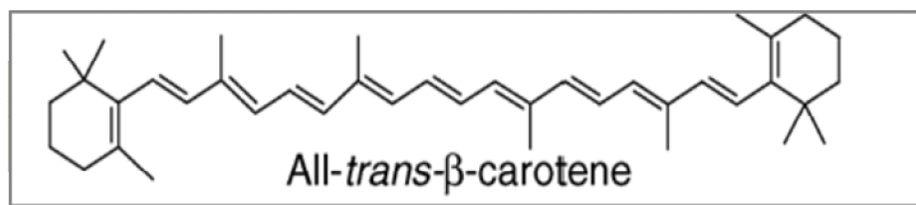


Figure 18 : Structure des caroténoïdes (Laguerre, 2007).

✓ LES OLIGOELEMENTS :

Le cuivre, le zinc, le manganèse, le sélénium et le fer sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Ces oligoéléments jouent le rôle de cofacteur pour maintenir l'activité catalytique des enzymes antioxydantes (Garait, 2006).

- **Sélénium** : Il joue un rôle capital dans la détoxification des radicaux libre (Wolters et al., 2006).
- **Zinc** : Il assure la stabilisation de la Cu-Zn SOD et donc il a un effet antioxydant (Defraigne et Pincemail, 2008).
- **Cuivre** : Il est un cofacteur de la superoxyde dismutase. Il est essentiel dans la lutte contre les infections (Pincemail, 2004).

I.3.2.3-LES COMPOSES PHENOLIQUES :

I.3.2.3.1-DEFINITION :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois), Plus de 8000 structures ont été identifiées (D'Archivio, 2007 ; Mehinagic, 2011).

Les composés phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs

enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires, antimicrobiens (Middleton et al., 2000 ; Ksouri et al., 2007).

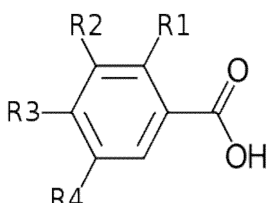
I.3.2.3.2-LES PRINCIPALES CLASSES DES COMPOSES PHÉNOLIQUES :

❖ **LES ACIDES PHÉNOLIQUES SIMPLES :**

✓ **ACIDES HYDROXYBENZOÏQUES :**

- Sont des dérivés de l'acide benzoïque.
- Ont une structure générale de base de type (C6-C1).
- Existents souvent sous forme d'esters ou de glycosides (Tableau VI) (Macheix et al., 2005).

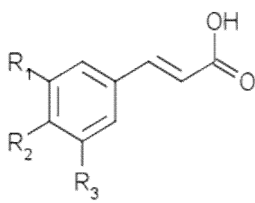
Tableau VI : Principaux acides hydroxybenzoïques (Sarni-Manchado et Cheyner, 2006).

Structure	R1	R2	R3	R4	Acides phénoliques	Activités
	H	H	H	H	Acide benzoïque	-Antiallergique.
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque	-Anti-inflammatoire. -Antifongiques. -Antioxydant.
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique	(Bahorun, 1997 ; Martin et Andriantsitohaina, 2002)

✓ **ACIDES HYDROXYCINAMIQUES :**

- Dérivent de l'acide cinnamique.
- Ont une structure générale de base de type (C6-C3).
- Existents souvent sous forme combinée avec des molécules organiques.
- Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules (Tableau VII) (Bruneton, 1999 ; Macheix et al., 2005).

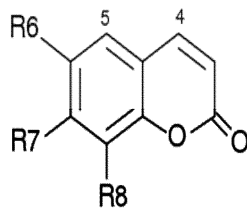
Tableau VII : Principaux acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Structure	R1	R2	R3	Acides phénoliques	Activité
	H	H	H	Acide cinnamique	-antipyrétiques. -anti-inflammatoires. -Activité antioxydants. -Antiallergique. (Bahorun, 1997 ; Martin et Andriantsitohaina, 2002)
	H	OH	H	Acide p coumarique	
	OH	OH	H	Acide caféique	

✓ COUMARINES :

- Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale.
- Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique (Tableau VIII) (Macheix *et al.*, 2005).

Tableau VIII : Principaux types de coumarines (Macheix *et al.*, 2005).

Structure	R6	R7	R8	Acides phénoliques	Activité
	H	OH	H	Umbelliférol	-Protectrices -Vasculaires. -Antiœdémateuses. -Neurosédatives. -Activité antioxydant. (Bahorun, 1997 ; Motamed et Texier, 1999)
	OH	OH	OH	Aescultol	

❖ LES TANINS :

Les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Daltons (Woodward et reed, 1989 ; Gazengel-Amme et Orecchioni, 2013), ils ont une activité antioxydant, anti-diarrhéeque, anti-nutriments (Bruneton, 2009).

✓ TANINS HYDROLYSABLES :

Les tannins hydrolysables sont des esters de l'acide gallique et de glucose. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique (enzymatique). Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide – l'acide éllagique (Figure 19) (Bruneton, 1993 ; Cowan, 1999 ; krause et al., 2005).

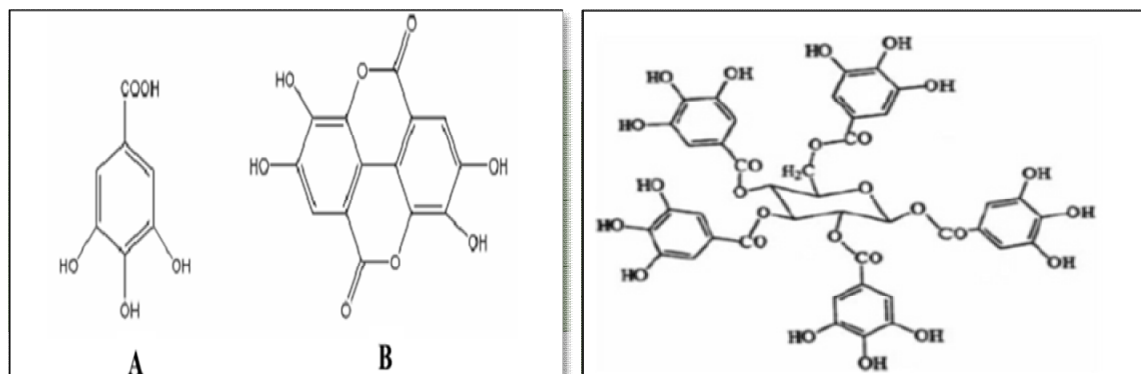


Figure 19 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B) avec l'une des structures de base des tannins hydrolysables (Sarnimanchado Et Cheynier, 2006 ; Bruneton, 2009).

✓ LES TANINS CONDENSES :

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des polymères d'unités flavaniques le plus souvent liées entre elles par des liaisons C4-C6 ou C4-C8 (Figure 20) (Schofield et al., 2001 ; Descheemaeker, 2004).

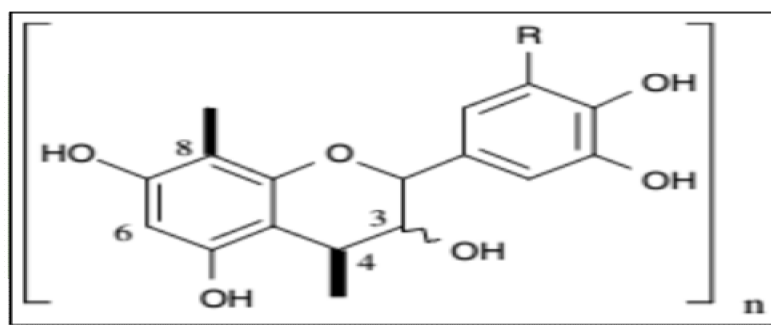


Figure 20 : Les tannins condensés (Haslam, 2007).

❖ LES FLAVONOÏDES (C₆-C₃-C₆) :

Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C₆-C₃-C₆), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base : deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones liés par un hétérocycle contenant un oxygène (cycle C) (Figure 21) (Bruneton, 1993 ; Elicoh-Middleton, 2000 ; Tsao et Deng, 2004 ; Tapas et al., 2008).

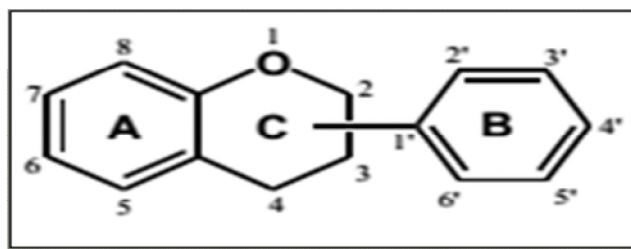


Figure 21 : Structure de base des flavonoïdes (Tsao, 2010).

➤ STRUCTURE ET CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES :

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central (la chaîne en C3), le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4. Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes. Les flavonoïdes se divisent en six sous-catégories : les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanols (catéchines et proanthocyanidines), les flavanones et les anthocyanidines (Tableau IX) (Brunton, 1999 ; Edenharder et Grünhage, 2003 ; Yao *et al.*, 2004 ; D'Archivio *et al.*, 2007).

Tableau (IX) : Les principales classes des composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005 ; Haslam, 2007 ; Terrier *et al.*, 2009).

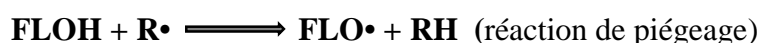
Classe	Structure chimique	Classe	Structure chimique
Flavones		Isoflavones	
Flavanones		Flavanols	
Flavonols		Anthocyanidines	

❖ MECANISMES ANTIOXYDANTS DES POLYPHENOLS :

Plusieurs modes d'action de l'activité anti-oxydante des polyphénols ont été décrits :

➤ PROPRIETES ANTIRADICALAIRES :

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 (Figure 22) (Van Acker *et al.*, 1996 ; Amić *et al.*, 2003).

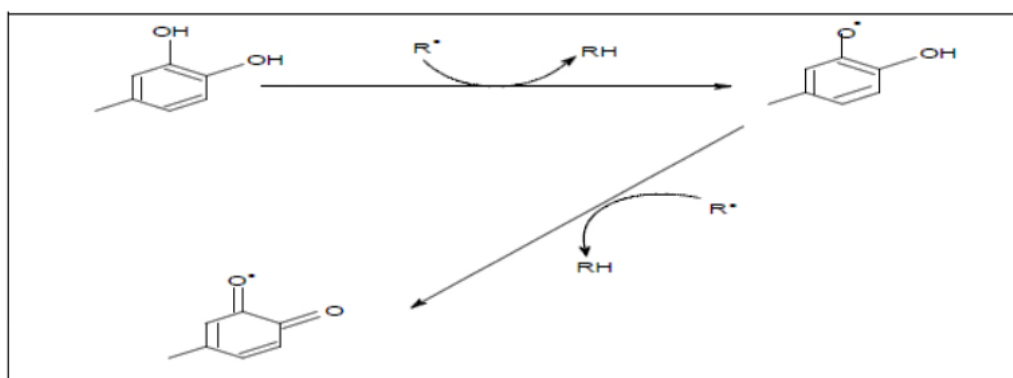
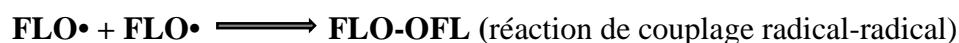


Figure 22 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène (R•) par les flavonoïdes et la formation d'une structure stable (Tiqwari, 2001).

➤ CHELATION DES METAUX DE TRANSITION :

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe²⁺) et le cuivre (Cu⁺) (Figure 23) (Zheng et Wang, 2001 ; Laguerre *et al.*, 2007 ; Prior *et al.*, 2003 ; Saraf *et al.*, 2007).

La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux (Pietta, 2000 ; Marfak, 2003) :

- Site situé entre le groupe 3' OH et le groupe 4' OH du cycle B.
- Site situé entre le groupe 3OH et 4 C=O de l'hétérocycle C.
- Site situé entre le groupe 5OH du cycle A et le groupe 4C=O de l'hétérocycle C.

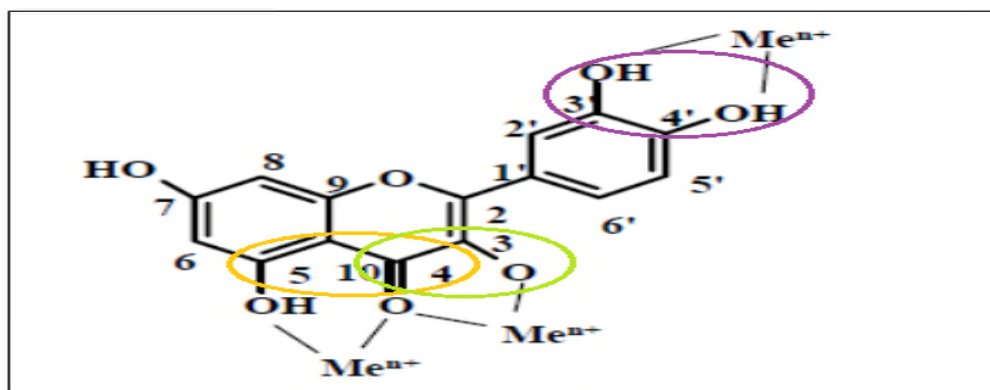


Figure 23 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métallique (Me^{n+}) (Pietta, 2000).

➤ INHIBITION ENZYMATIQUE :

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du $O_2^{\cdot-}$ et d'autres ERO, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipoxygénase, monooxygénase microsomal, et la glutathion S-Transferase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (Pietta, 2000 ; Densiov et Afanas'ev, 2005).

CHAPITRE II :

MATÉRIELLES

ET

METHODES

II.1-PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL :

L'étude est effectuée sur les feuilles d'*Eriobotrya japonica L* (Figure 24) qui ont été récoltées au mois de mars 2015 dans la commune de Boukhiffa de la willaya de Bejaia, loin de tout impact de pollution.



Figure 24 : Photographie personnelle des feuilles d'*Eriobotrya japonica L*.

II.2-SECHAGE ET BROYAGE :

Les feuilles de la plante d'*Eriobotrya japonica L* fraîchement récoltées, ont été lavées afin de les débarrasser des poussières et autres particules puis conservées à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Les feuilles ont été séchées à l'air libre puis 24h à l'étuve, ensuite, broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre très fine (Figure 25).



(A)



(B)

Figure 25 : Photographies personnelles des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* (A) et de la poudre obtenir des feuilles (B).

II.3-EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES :

Le procédé d'extraction des polyphénols utilisé est celui décrit par **Chiang et al., (1994)**, avec quelques modifications (Figure 26). Le principe de cette méthode se base sur l'extraction sélective des composés phénoliques en utilisant des solvants de différentes polarités, allant de solvant très polaires à des solvants apolaires : l'éthanol, l'eau, le chloroforme et l'hexane dans le but de séparer les composés phénoliques des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* en composés de polarités distinctes. Les étapes d'extraction ont été réalisées à température ambiante.

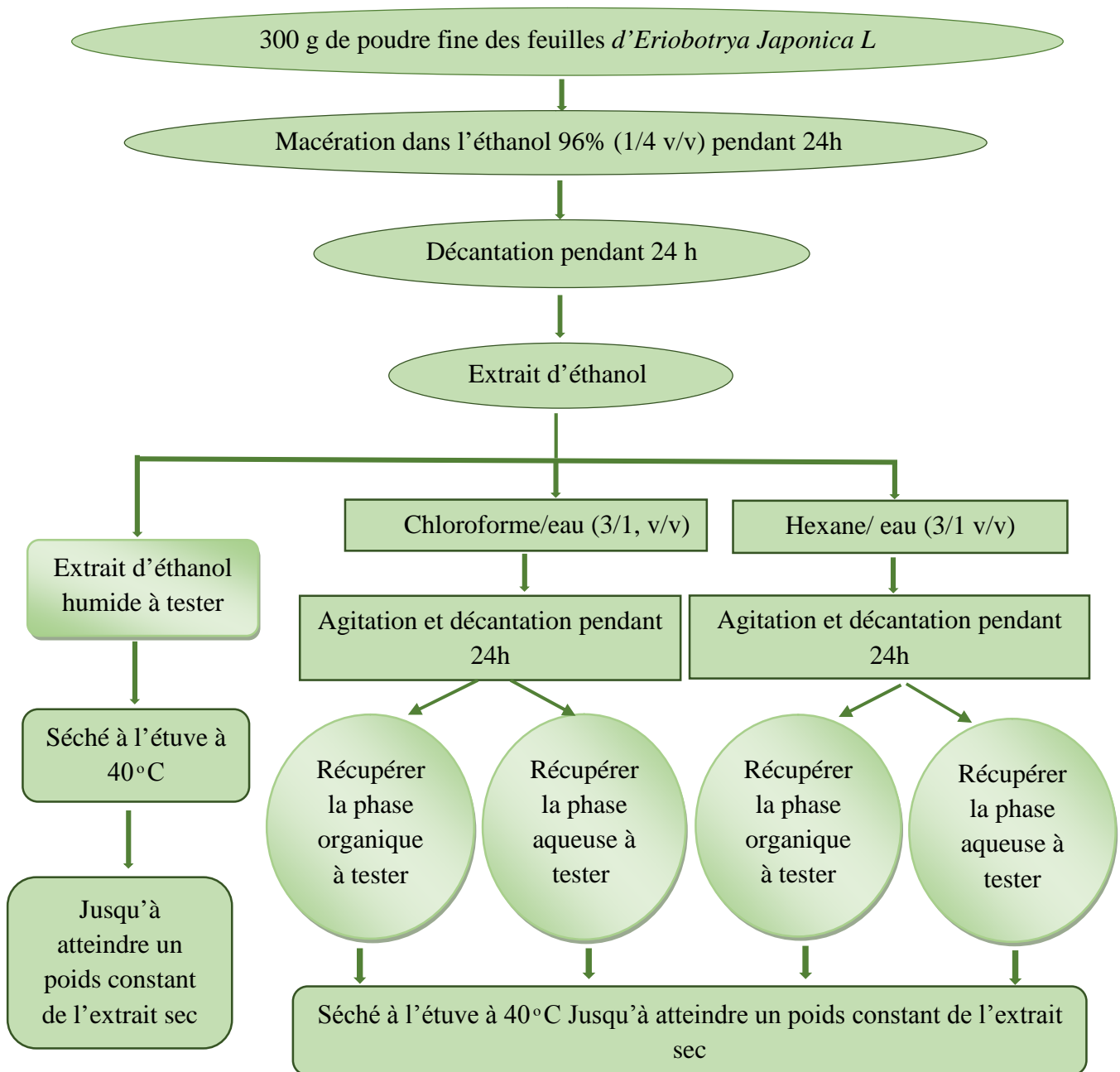


Figure 26 : Schéma d'extraction d'*Eriobotrya japonica L* (Chiang et al., 1994)

➤ **CALCUL DU RENDEMENT :**

Après l'extraction, Cinq extraits ont été obtenus. Le taux d'extraction de chaque extrait sec a été calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\text{Taux d'extraction} = [(P - P_0) / \text{poids de la poudre}] \times 100$$

Où :

P₀ : Poids vide du creuset.

P : poids après évaporation du solvant.

II.4-DOSAGE DES DIFFERENTS GROUPES DE COMPOSES PHENOLIQUES :

Dans le but d'évaluer qualitativement et quantitativement le contenu en composés phénoliques des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* trois protocoles ont été suivis afin de doser les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensée.

Il est à noter que pour tous les dosages, l'extrait sec a été reconstitué dans le méthanol et des blancs ont été préparés. Le dosage des différents groupes de composés phénoliques a été réalisé sur les extraits éthanoliques, organique et aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* dans les mêmes conditions.

II.4.1-Dosage des composés phénoliques totaux (PPT) :

➤ **PRINCIPE :**

La quantification colorimétrique des composés phénoliques totaux a été effectuée selon la méthode décrite par **Yap et al., (2009)** avec quelques modifications (Figure 27).

La teneur phénolique totale est déterminée à l'aide d'un dosage colorimétrique avec le spectrophotomètre UV-Vis. Le réactif utilisé est le «Folin-Ciocalteu» ; c'est un Mélange de complexes des acides phosphotungstènes (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolybdènes (H₃PMO₁₂O₄₀) de couleur jaune.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, qui entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur

bleu, en présence d'une solution alcaline. La coloration produite, dont l'absorption maximale se situe à 765 nanomètre, la coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Ribéreau-Gayon, 1968 ; Vuorela, 2005 ; Boizot et Charpentier, 2006).

➤ **MODE OPERATOIRE :**

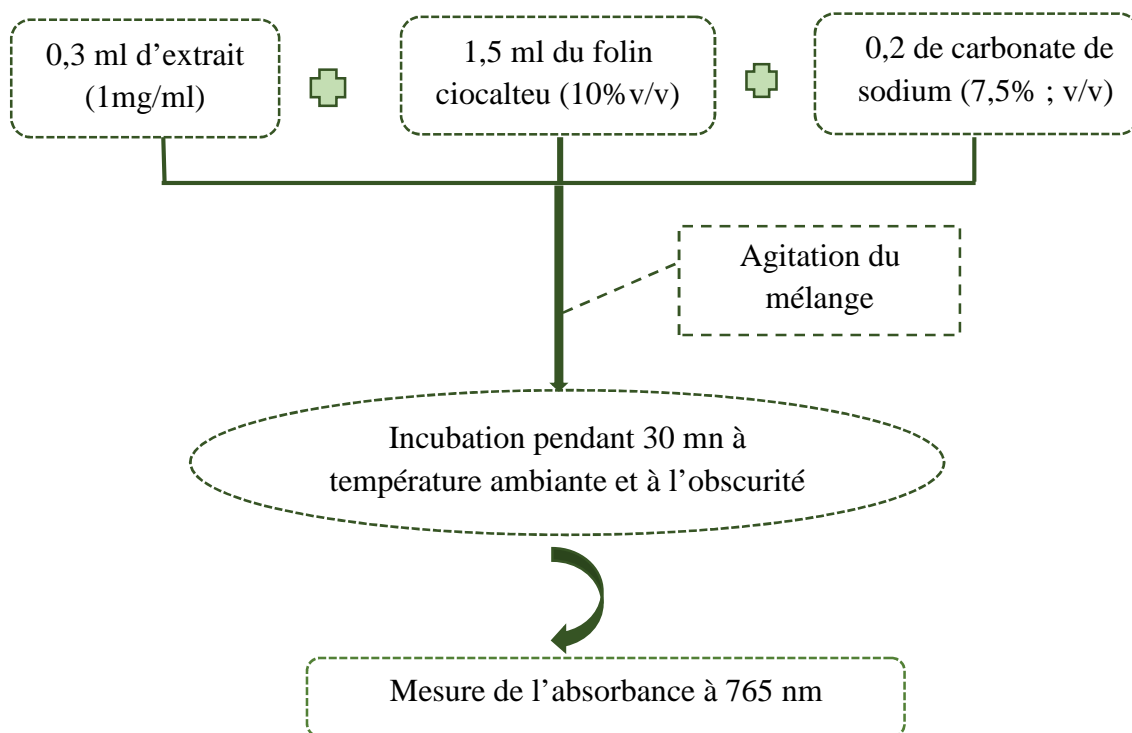


Figure 27 : Protocole de dosage des polyphénols totaux (Yap *et al.*, 2009).

N.B : Un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 0,3 ml de méthanol avec 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,2 ml de solution de carbonate de sodium.

➤ **EXPRESSION DES RESULTATS :**

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard afin de déterminer les concentrations en phénols totaux des extraits exprimées en mg équivalent acide gallique /g d'extrait.

II.4.2-DOSAGE DES FLAVONOÏDES TOTAUX (FVT) :

➤ PRINCIPE :

La teneur en flavonoïdes des extraits a été effectuée selon la méthode décrite par **Abdou et al., (2010)** (figure 28).

Les réactifs utilisés sont : les solutions incolores d'acétate de sodium et de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Le principe de la méthode est basé sur la formation d'un complexe jaunâtre aluminium-flavonoïde par chélation des métaux (fer et aluminium), qui est due à la présence des groupements hydroxyles libres (**Ribéreau-Gayon, 1968**)

➤ MODE D'OPERATOIRE :

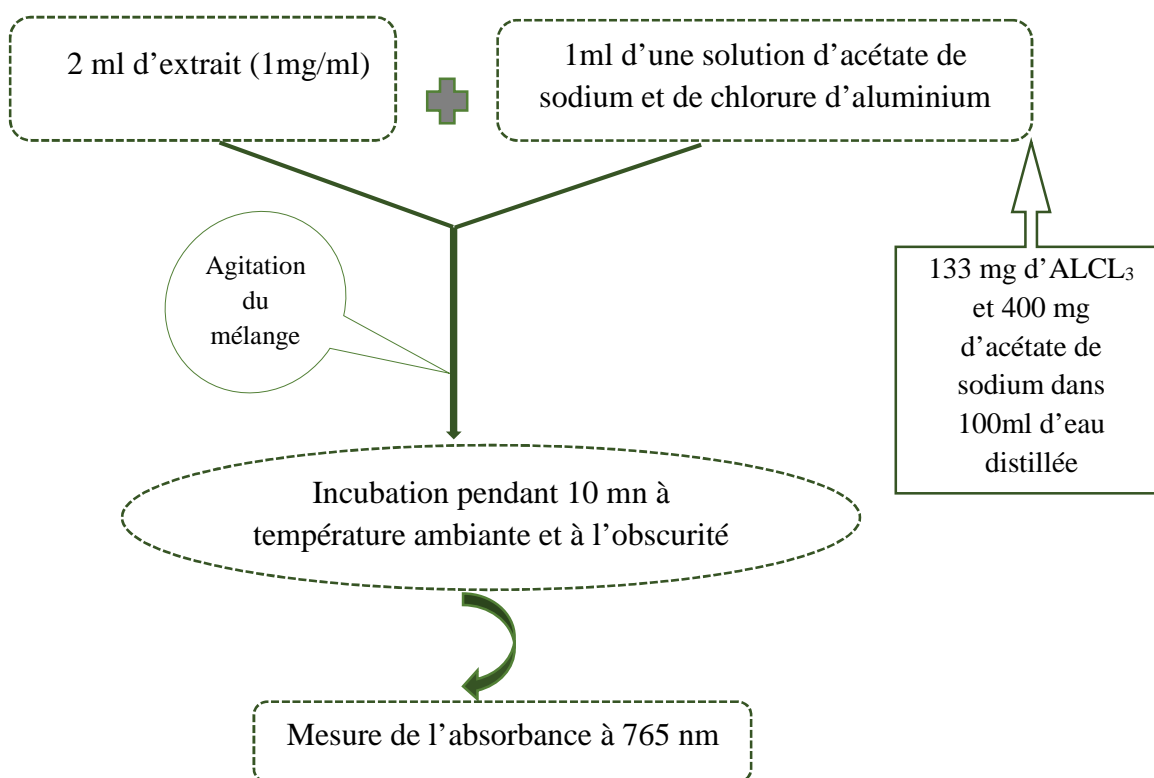


Figure 29 : Protocole de dosage des flavonoïdes (**Abdou et al., 2010**).

N.B : Un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 2 ml de solution d'extrait avec 1 ml d'eau distillée.

➤ EXPRESION DES RESULTATS :

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions, en utilisant la quercétine comme standard étalon à différents concentrations. Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine /g de poids sec d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

II.4.3-DOSAGE DES TANINS CONDENSES :

➤ PRINCIPE :

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode citée par **Oyedmi et Afolayan, (2011)**, avec quelque modifications (Figure 30).

En milieu acide, les tanins condensés réagissent avec la vanilline et entraînent une coloration verte de la solution (Figure 30) mesurée à 500 nm (**Nakatsubo et al., 2002**).

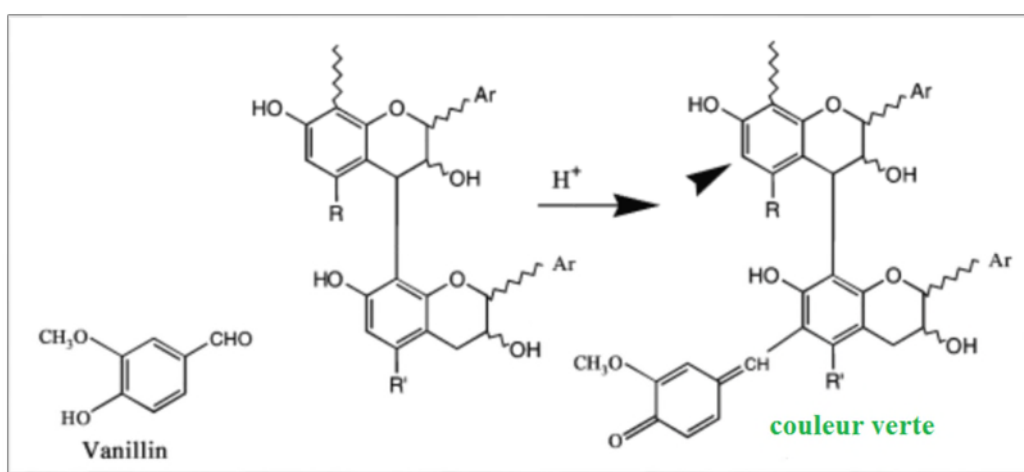


Figure 30 : Réaction chimique de la vanilline avec les tanins condensés (**Schofield et al., 2001**).

➤ MODE D'OPERATOIRE :

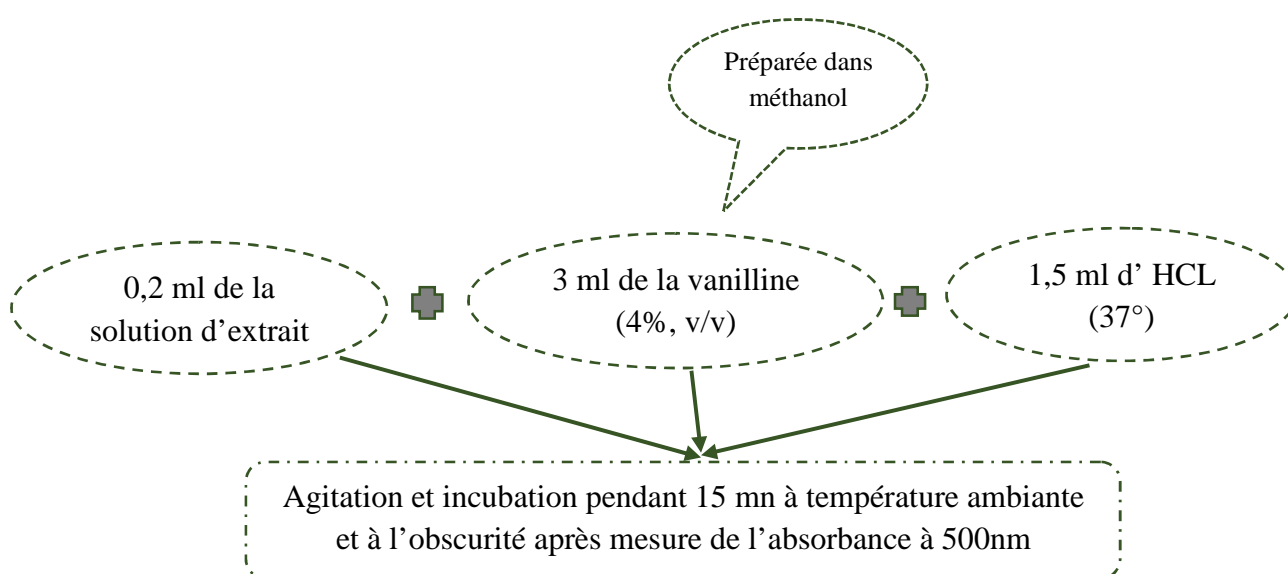


Figure 30 : Protocole de dosage des pro-anthocyanidines (**Oyedmi et Afolayan, 2011**).

N.B : Un blanc d'extrait a été préparé en mélangeant 0,5 ml de solution d'extrait avec 3 ml de méthanol et 1,5 ml d'HCl.

➤ **EXPRESSION DES RESULTATS :**

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la catéchine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent catéchine /g d'extrait.

II.5-ACTIVITES ANTIOXYDANTS DES EXTRAITS :

L'activité antioxydante a été évaluée en testant l'activité scavenging du radical DPPH°, et ABTS*+.

II.5.1-ACTIVITE SCAVENGING DU RADICAL DPPH° :

L'activité antioxydante des différents extraits est mesurée par la méthode du radical libre DPPH° (C₁₈H₁₂N₅O₆).

➤ **PRINCIPE :**

Le DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), radical libre de couleur violette est réduit en diphényl picryl hydrazine, un composé de couleur jaune en présence de composés antiradicalaires. La différence de la densité optique, entre la solution de radical DPPH° en absence et en présence des antioxydants reflète le potentiel des composés responsables de cette activité à réduire le radical DPPH° (Figure 31) (Molyneux, 2004 ; Maataoui et al., 2006 ; Athamena et al., 2010).

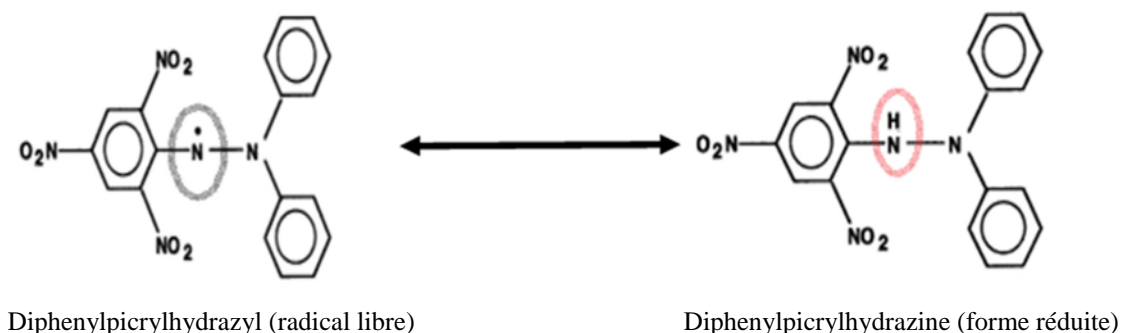


Figure 31 : Forme libre et réduite du DPPH° (Molyneux, 2004).

➤ **MODE D'OPÉRATEUR :**

L'effet « scavenging » des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L. Vis-à-vis du radical DPPH[•] a été effectué en suivant le protocole de **Hemalatha et al., (2010)**.

Une solution de DPPH (0,1 mM) a été préparée en mélangeant 11,82 mg d'DPPH dans 300 ml du méthanol, et 1 ml de cette solution a été ajouté à 3 ml de solution d'extrait à différentes concentrations. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre après 30min d'incubation à la longueur d'onde de 517nm.

Un contrôle a été préparé en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol.

Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 1 ml de méthanol avec 3 ml de solution d'extrait.

N.B : L'acide ascorbique et la BHA ont été utilisés comme standards et à différentes concentrations.

➤ **EXPRESSION DES RESULTATS :**

Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH[•] de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging du radical DPPH}^{\bullet} = [(A_C - (A_T - A_E)) / A_C] \times 100$$

Ou :

A_C : Absorbance du contrôle ; c'est l'absorbance du blanc contenant seulement le DPPH.

A_T : Absorbance du test ; c'est l'absorbance de la solution de DPPH contenant l'extrait.

A_E : Absorbance de l'extrait ; c'est l'absorbance de la solution de l'extrait sans le DPPH.

II.5.2-ACTIVITE SCAVENGING DU RADICAL ABTS^{•+} :

➤ **PRINCIPE :**

L'ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonique acide) est un radical libre et stable capable de réagir avec des antioxydants (donneur d'hydrogène ou d'électron), il présente une coloration bleu vert sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, sa coloration devienne transparente (Figure 32).

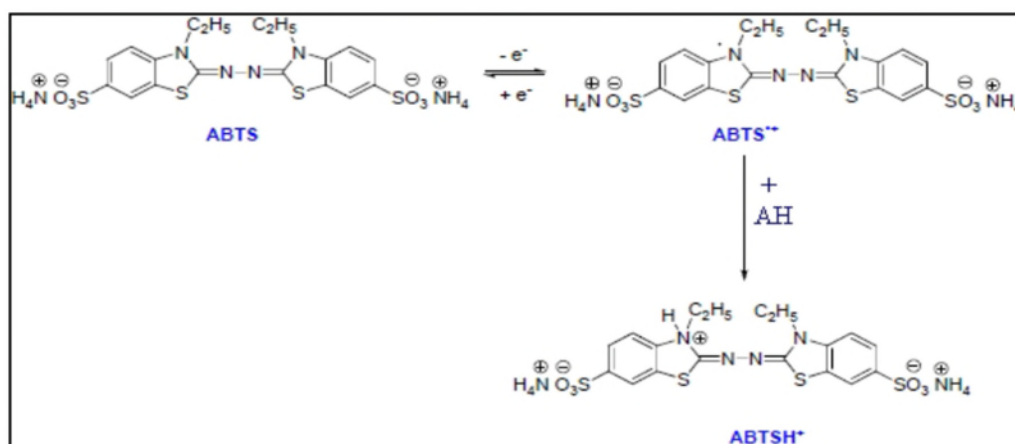


Figure 32 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de proton (Marc *et al.*, 2004).

➤ **MODE D'OPERATOIRE :**

L'activité scavenger du radical ABTS a été mesurée en utilisant le protocole de **le et al.**, (2007), avec quelques modifications.

Une solution de l'ABTS (7 mM) a été préparée en mélangeant 72 mg de l'ABTS^{•+} avec 13,24 mg de persulfate de potassium (2,45 mM) dans 20 ml d'eau distillée, et laissée incuber pendant 16h à l'obscurité. La solution d'ABTS^{•+} (7 mM) est diluée avec d'eau distillée jusqu'à atteindre une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm. 1.9 ml de cette solution a été ajouté à 100 μ l de solution d'extrait à différentes concentrations. Après incubation pendant 7 min et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Le blanc a été préparé en remplaçant la solution d'extrait par du méthanol.

Le Trolox (acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylique), analogue de la vitamine E a été utilisé comme standard à différentes concentration (**Miller et al.**, 1997).

➤ **EXPRESSION DES RESULTATS :**

Le pourcentage de l'activité scavenging de l'ABTS^{•+} de chaque extrait a été calculé comme suit :

$$\% \text{ de l'activité scavenging de l'ABTS}^{\bullet+} = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100$$

Où :

A_C : absorbance du blanc.

A_T : absorbance du test.

II.6-CHROMMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE :**➤ PRINCIPE :**

La chromatographie sur couche mince (CCM) permet la séparation des composés phénoliques selon leur poids moléculaire et leur degré de solubilité, afin de pouvoir les caractériser.

La séparation des constituants du dépôt se fait à l'aide de deux phases : une phase mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants et une phase stationnaire qui est un adsorbant maintenu sur une plaque de verre ou de plastique rigide. L'échantillon à analyser doit se trouver dans un solvant volatil (dans notre cas : le méthanol). Le dépôt se fait alors sur une extrémité de la phase stationnaire (ligne de dépôt). Les constituants de l'échantillon sont alors élués (entraînés) par la phase mobile qui monte par capillarité vers le haut de la plaque (Delmeyda, 2001).

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale : $Rf = \frac{\text{hauteur de la tache}}{\text{hauteur du front du solvant}}$

➤ MODE D'OPERATOIRE :**❖ PREPARATION DE LA PHASE STATIONNAIRE :**

Pour la plaque chromatographique, elle est composée d'un support en verre de dimension 20 x 20cm sur lequel est posée une fine couche de silice. Sur cette dernière ont été tracées deux lignes séparées au niveau des deux extrémités de la plaque chromatographique : l'une se trouve à 2,5 cm de l'extrémité basse (ligne de dépôt), et l'autre à 3,5 cm de l'extrémité haute (font de migration).

❖ CHOIX DE LA PHASE MOBILE (SYSTEME SOLVANTS APPROPRIES) :

On a choisi deux systèmes de solvants :

- 1- toluène/acétone /acide formique : 60/60/10 (V/V/V).
- 2- eau/méthanol/butanol/acide formique : 50/20/25/2 (V/V/V).

❖ DEPOT DES ECHANTILLONS :

Le dépôt se fait linéairement de façon ponctuelle avec une micropipette du 10 µl (Figure 33). Des échantillons de tous les extraits et des standards ont été déposés sur la ligne basse de la plaque chromatographique en respectant la même concentration (10

mg/ml) et le même volume (10 μ l), puis laissés sécher. Les témoins utilisés sont (la quercétine, la rutine et l'acide gallique).

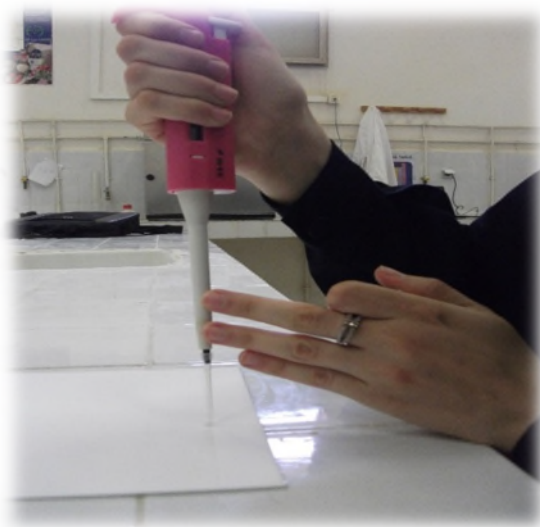


Figure 33 : Dépôt des extraits sur le chromatographe.

❖ **DEVELOPEMENT DDES PLAQUES :**

Les plaques sont placées dans la cuve de CCM, quand cette dernière est saturée en vapeurs de solvant d'éluion (Figure 34). Les différents constituants de l'échantillon déposé migrent avec des vitesses différentes.

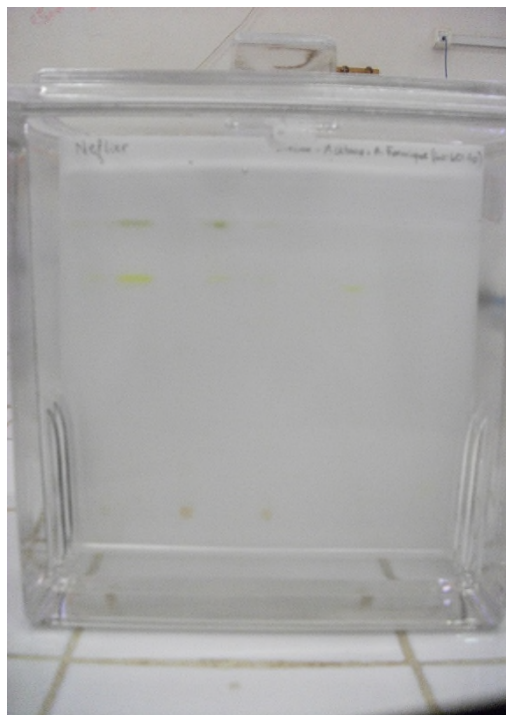
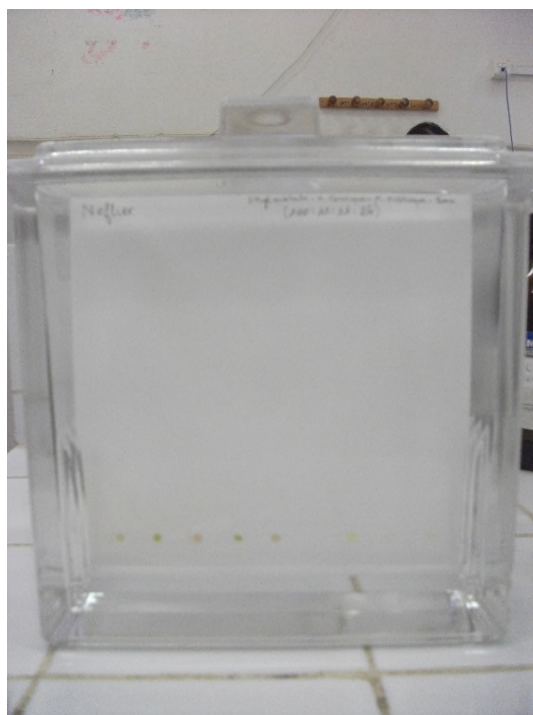


Figure 34 : Développement chromatographique d'une plaque.

❖ VISUALISATION DES TACHES :

Après l'élution, la plaque chromatographique a été séchée à l'air libre puis observée à la lumière du jour et sous UV (250-300nm) dans une chambre noire. Une révélation à la vanilline sulfurique a été effectuée par une simple pulvérisation puis un chauffage à 110° pendant 10 à 15 min.

➤ MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DU RADICAL DPPH⁺ ET ABTS^{•+} :

En utilisant le même protocole de l'analyse qualitative, les extraits ont été déposés sur les chromatogrammes puis mis dans les cuve contenant les mêmes systèmes de solvant préalablement utilisés, ses dernières ont été séchées puis pulvérisées avec une solution du DPPH et ABTS pour la mise en évidence de l'activité antioxydant des extraits.

II.7-ETUDE STATISTIQUE :

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne \pm écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le teste ANOVA/MANOVA. Les différences ont été considérées d'être significative à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC₅₀ ont été calculées en utilisant le logiciel Origine 8.

Chapitre III :

*RESULTATS
ET
DISCUSSIONS*

III.1-RENDEMENT DE L'EXTRACTION :

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, la taille des particules constituant la poudre de la plante, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (Chavan et al., 2000 ; Goli et al., 2004 ; Mukhopadhyay et al., 2005).

Dans notre travail, afin d'obtenir des combinaisons phénoliques distinctes, une extraction liquide-solide sélective a été réalisée en utilisant plusieurs solvants de différentes polarités, à savoir des solvants polaires : l'eau, l'éthanol et un solvant apolaire, le chloroforme. Commencer l'extraction par l'éthanol est intéressant car ce dernier représente un solvant permettant la dissolution de la majorité des composés phénoliques (Cowan, 1999).

Une fois les extraits secs sont obtenus, le calcul des taux d'extraction dans chaque étape a donné les résultats suivants (Tableau X) :

Tableau X : Les taux d'extraction des extraits d'*Eriobotrya japonica L.*

Extrait	Taux d'extraction (%)
Extrait éthanol des feuilles	13,71
Extrait organique du chloroforme des feuilles	12,15
Extrait aqueux du chloroforme des feuilles	25,19
Extrait organique d'hexane des feuilles	4,37
Extrait aqueux d'hexane des feuilles	34,42

Nous constatons que les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane ont donnés des taux d'extraction les plus élevés par rapport aux extraits organiques. Cette différence peut être expliquée par la richesse des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* en composés phytochimiques de polarité élevée, tels que les composés phénoliques.

La comparaison des taux d'extraction de notre plante avec d'autres études sont résumés dans le tableau IX. Les résultats montrent des taux d'extractions obtenus par plusieurs méthodes (solvants). D'après ces résultats nous pouvons constater que le taux d'extraction (41,56 mg ±13,71%) des feuilles de notre plante est très satisfaisant.

Tableau XI : Taux d'extraction des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L.

Solvants	% d'extraction	Reference
Eau, éthanol (50%), méthanol (80%)	23,7 ; 10,7 ; 8,2	Jin et al., 2011
Eau	12,5	Kim et Shin, 2009
Méthanol	3,035	Cha et al., 2011
L'eau	4,46	Alshaker et al., 2011

III.2-DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES :

II.2.1-DOSAGE DES PHENOLS TOTAUX :

Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et peu solubles dans les solvants organiques apolaires (Macheix et al., 2005).

Les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L, exprimées en mg équivalent acide gallique /g d'extrait sont représentés dans la Figure 35.

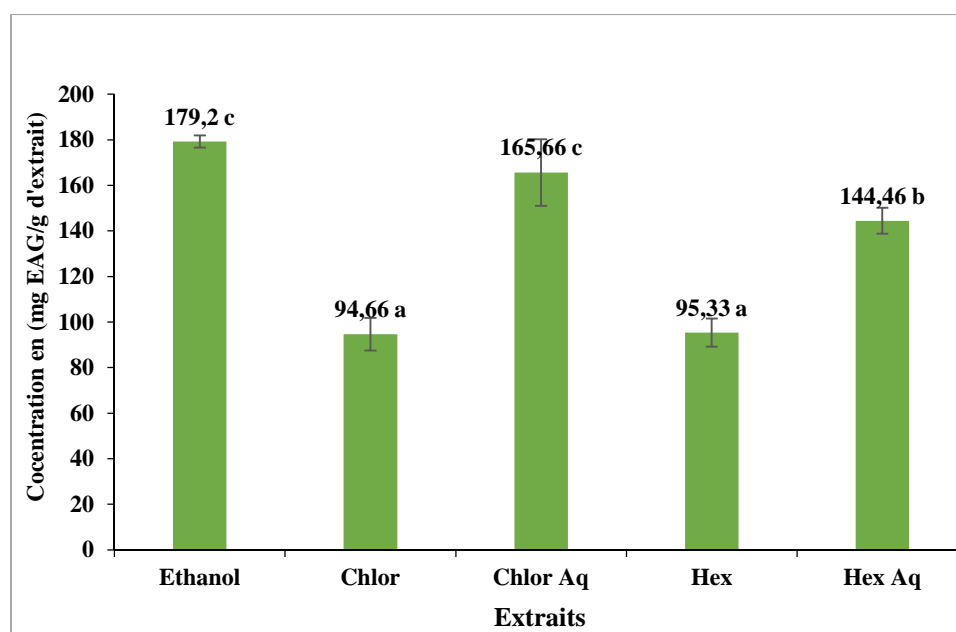


Figure 35 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L. (Ethanol : extrait brute ; Chlor : extrait organique du chloroforme ; Chlor Aq : extrait aqueux du chloroforme ; Hex : extrait organique d'hexane ; Hex Aq : extrait aqueux d'hexane).

Les résultats du dosage montrent aussi que ce sont les extraits aqueux du chloroforme (165,66 mg EAG/g d'extrait) et aqueux hexane (144,46 mg EAG/g d'extrait), qui ont donné plus que les extraits organiques du chloroforme (94,66 mg EAG/g d'extrait) et organique d'hexane (95,33 mg EAG/g d'extrait). Cela semble évident étant donné que les polyphénols sont des composés polaires grâce à leur richesse en groupements hydroxyles, ce qui leur confère une solubilité élevée dans les solvants polaires (**chen et Ho, 2007**).

La teneur élevée en phénols totaux de l'extrait éthanolique est peut-être dû au fait qu'il est l'extrait brut qui contient la totalité des composés phénoliques.

Le taux en phénols totaux de l'extrait brut par rapport à un gramme de poudre est de 35,96 mg EAG/g de poudre d'*Eriobotrya japonica L.*, ces taux nous permettent de classer notre plantes d'après une étude faite par **Kähkönen et al., (1999)**, qui ont montré que la quantité en phénols totaux varie beaucoup dans les plantes et sont classées de 0,2 à 155,3 mg EAG/g de poudre. De ce fait *Eriobotrya japonica L* fait partie des plantes qui sont riches en polyphénols.

I.2.2-DOSAGE DES FLAVONOIDES :

Les flavonoïdes sont des pigments naturels largement répandus chez les plantes. (**Martínez-Flórez et al., 2002**). La figure 36 illustre Le contenu en flavonoïdes des extraits de *Eriobotrya japonica L.*, exprimés en mg équivalent quercétine (EQ) /g d'extrait.

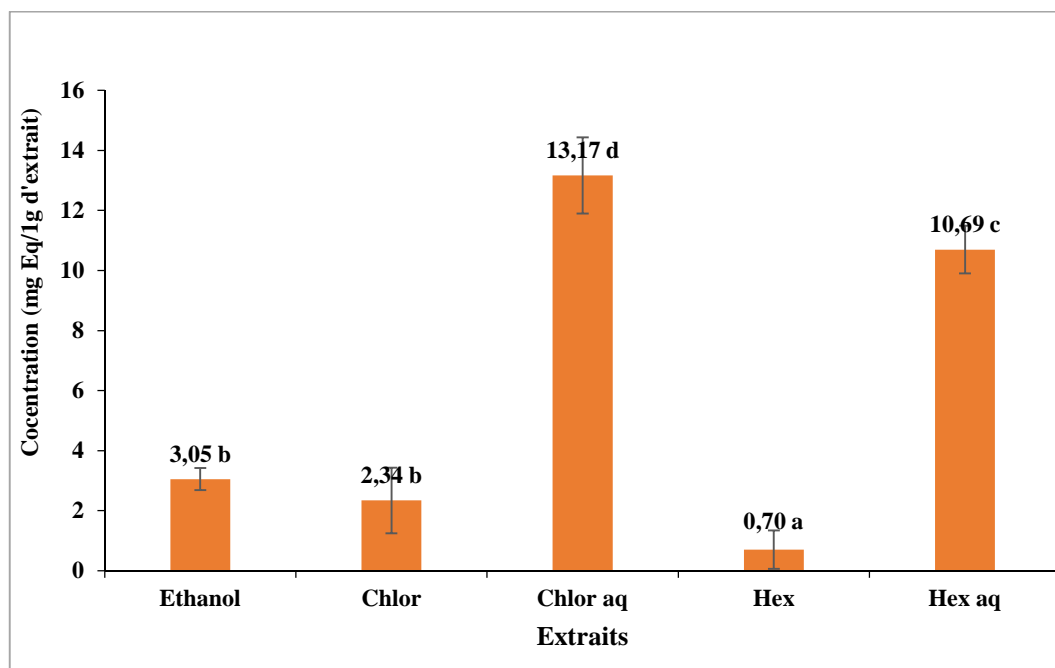


Figure 36 : Représentation graphique des teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.*

Les résultats du dosage des flavonoïdes nous montrent que l'extrait des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* présente des teneurs élevées en flavonoïdes. On constate, d'après les résultats obtenus, que le taux en flavonoïdes est considérable pour l'extrait aqueux du chloroforme qui représente un taux de $13,17 \pm 1,27$ mg EQ/g d'extrait, et que l'extrait aqueux d'hexane des feuilles représente un taux de $10,69 \pm 0,79$ mg EQ/g d'extrait, par rapport à l'extrait organique du chloroforme et d'hexane qui présentent des taux faibles ($\leq 2,34$ mg EQ/g d'extrait). Cette différence peut être expliquée par le fait que les flavonoïdes sont des petites molécules très solubles dans les solvants polaires et grâce à leur teneur élevée en groupements hydroxyles facilitent leur solubilisation dans les solvants polaires (**Papagiannopoulos et Galensa, 2005 ; Alshaker et al., 2011**).

D'une manière inattendue, les résultats montrent que l'extrait éthanolique d'*Eriobotrya japonica L* a donné un taux faible de flavonoïdes ($3,05 \pm 0,37$ mg EQ /g d'extrait) en comparaison à celui obtenu avec l'extrait aqueux du chloroforme. En conséquence, cela peut être expliqué au fait que les groupements réagissant avec le AlCl₃ ne soient pas disponibles dans l'extrait à cause de l'encombrement stérique engendré par les macromolécules lipidiques (**Azimova et al., 2011**), et au fait qu'il se formerait des interactions intermoléculaires entre eux mettant en œuvre ces groupements révélateurs dans divers types de liaisons physico-chimiques (**Singleton et Rossi, 1965 ; Cicco et al., 2009**).

II.2.3-DOSAGE DES TANINS CONDENSES :

Le contenu en tanins condensés des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L*, exprimé en mg équivalent catéchine /g d'extrait est représenté dans l'histogramme ci-dessous (Figure 37) :

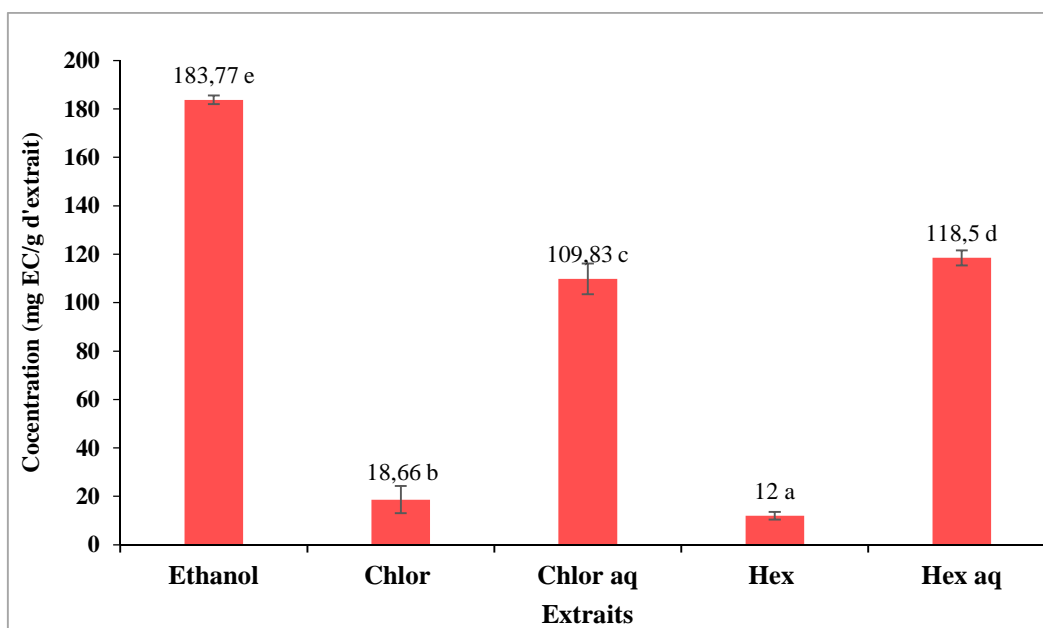


Figure 37 : Représentation graphique des teneurs en pro anthocyanidines des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.*

Les résultats obtenus du dosage des proanthocyanidines, nous laisse déduire que notre plante reflète un taux élevé en ces composés, ainsi les valeurs varient entre $183,77 \pm 1,76$ et $12 \pm 1,53$ mg équivalent catéchine /g d'extrait. Cette teneur importante pourrait être associée au rôle des tanins dans la protection des plantes contre les organismes nuisibles (**Kathiresan, 2003**).

Les résultats du dosage montrent également que le meilleur taux en proanthocyanidines des feuilles d'*Eriobotrya japonica* est enregistré avec l'extrait éthanolique ($183,77 \pm 1,76$ mg EC/g d'extrait), cela semble évident étant donné que le réactif révélateur (la vanilline) réagit avec maximum d'unité du polymère de proanthocyanidines.

En revanche, ce sont les extraits aqueux d'hexane et du chloroforme qui ont donné des teneurs plus élevées en proanthocyanidines ($118,5$ mg EC/g d'extrait ; $109,83$ mg EC/g d'extrait) par rapport aux extraits organiques correspondants, cela est peut être dû à la nature biochimique des tanins condensés qui sont des polymères riches en groupements hydroxyles qui sont solubles dans les solvants polaires (**Deschemaker, 2004 ; Gu et al., 2008**).

II.3-ACTIVITE ANTIOXYDANTS D'ERIBOTRYA JAPONICA L :

II-3-1-L'ACTIVITE SCAVENGING DU RADICAL DPPH[•] :

Les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical DPPH, des standards et des extraits sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés ci-dessous (Figure 38) :

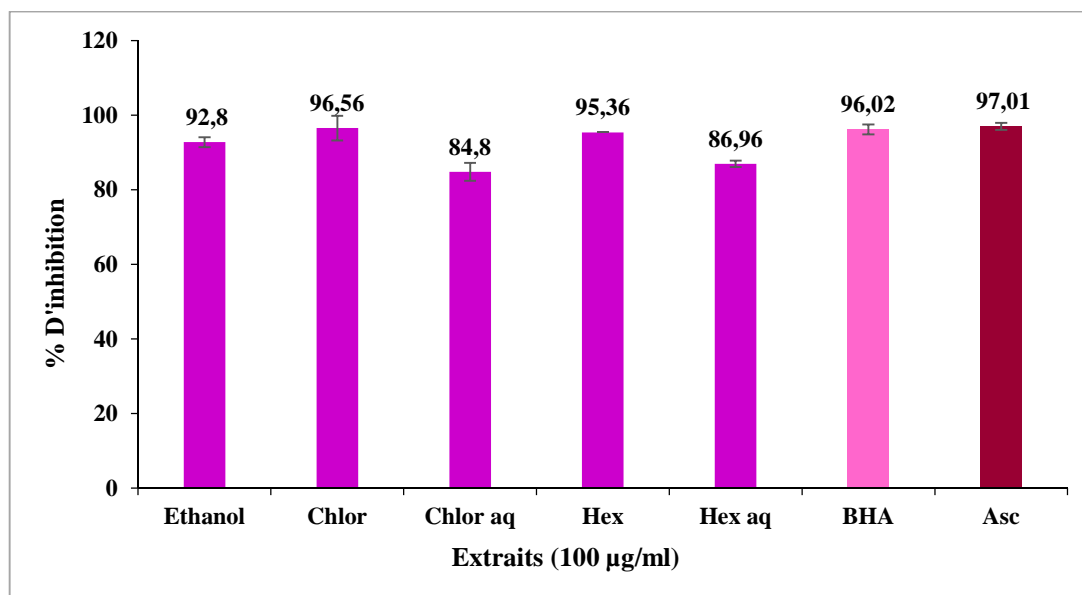


Figure 38 : Activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits d'*Eriobotrya japonica L* et des standards (BHA et l'acide ascorbique).

Les standards employés présentent des pourcentages d'inhibitions allant de 97.01% ± 0.95% (A ascorbique) à 96.02% ± 1.33% (BHA) à 100µg/ml.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que tous les extraits d'*Eriobotrya japonica L*, ont exhibé une très forte activité scavenging du radical DPPH[•] en comparaison aux pourcentages d'inhibitions montrés par les standards utilisés. Cela serait dû à la richesse des feuilles de la plante en composés phénoliques riches en groupement OH donneur d'électrons et d'hydrogènes (Jung., et al., 2009 ; Ojeil et al., 2010).

On constate également, que les extraits organiques du chloroforme et d'hexane d'*eribotrya japonica L*, sont les plus efficaces (96,56% ± 3,31% à 95.36% ± 0%) par rapport aux extraits aqueux. Cela s'expliquerait par le fait que les extraits organiques seraient riches en tannins hydrolysables (non mesurés), qui constituent des structures polycycliques d'où leur

caractère légèrement hydrophobe donc, se solubilisant dans les solvants organiques. Mais il ne faut pas négliger le pourcentage d'inhibition des extraits aqueux qui constitue de puissants agents antioxydants qu'ils sont riches en phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés.

Une étude a été effectuée par **Kim et al., (2011)**, ces derniers ont trouvé que l'extrait éthanolique d'*Eriobotrya japonica L.* a inhibé la formation du radical DPPH[•] avec un pourcentage d'environ 40% à une concentration de 100µg/ml.

Néanmoins, il est à noter que les extraits organiques et aqueux du chloroforme et d'hexane des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.* est positive ceci est dû à la bonne corrélation avec les teneurs en polyphénols totaux (R=0,67), les flavonoïdes (R=0,97) et les tannins condensés (R= 0,53) (Annexe).

➤ DETERMINATION DES IC₅₀ :

Le paramètre IC₅₀ (Concentration inhibitrice à 50%) ou EC₅₀ (Efficient concentration) est défini comme étant la concentration du substrat qui entraîne une perte de 50% de l'activité. Les IC₅₀ de l'activité du DPPH sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs les plus faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (**Molyneux, 2004 ; Vilano et al., 2007**).

D'après les résultats obtenus (Figure 39) qui présente l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical DPPH de l'extrait organique du chloroforme et d'hexane des feuilles, on déduit que l'activité anti-radicalaire augmente en fonction de la concentration de l'extrait, plus la concentration est élevée plus le pourcentage d'inhibition augmente.

Dans le cas de notre échantillon, l'IC₅₀ =114,91 µg/ml à IC₅₀=129,14 µg/ml, respectivement avec l'extrait organique du chloroforme et d'extrait organique d'hexane, qui sont supérieures à celles des standards utilisés : la BHA et l'acide ascorbique qui ont respectivement des IC₅₀ égales à 0,98 µg/ml et IC₅₀ =1,61 µg/ml (Figure).

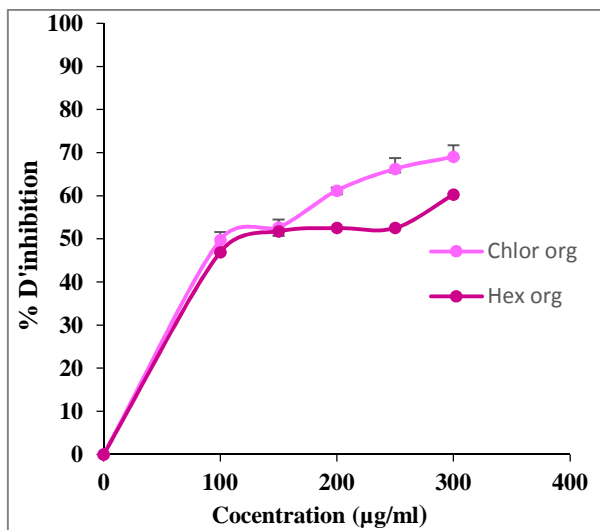


Figure 39 : Activité scavenging du radical DPPH° à différents concentration des extraits organique d'*Eriobotrya japonica L.*

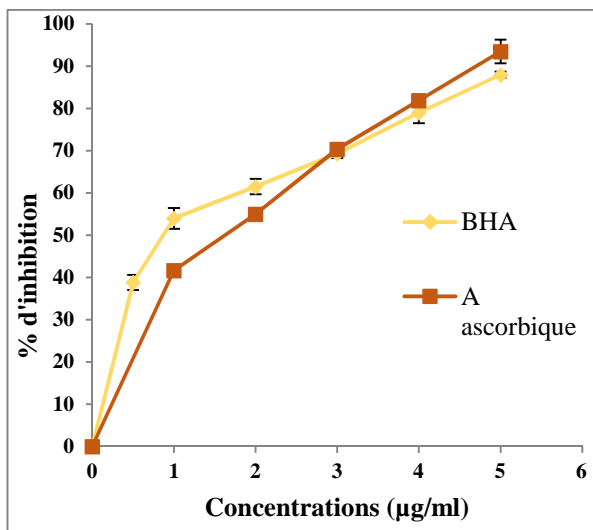


Figure 40 : Activité scavenging du radical du DPPH° à différents concentration de l'acide ascorbique et de la BHA.

II.3.2-L'ACTIVITE SCAVENGING DU RADICAL ABTS^{•+} :

Les résultats de l'activité anti-radicalaire, vis-à-vis du radical ABTS^{•+}, du standard et des extraits sont exprimés en pourcentage d'inhibition et représentés dans la figure 41 :

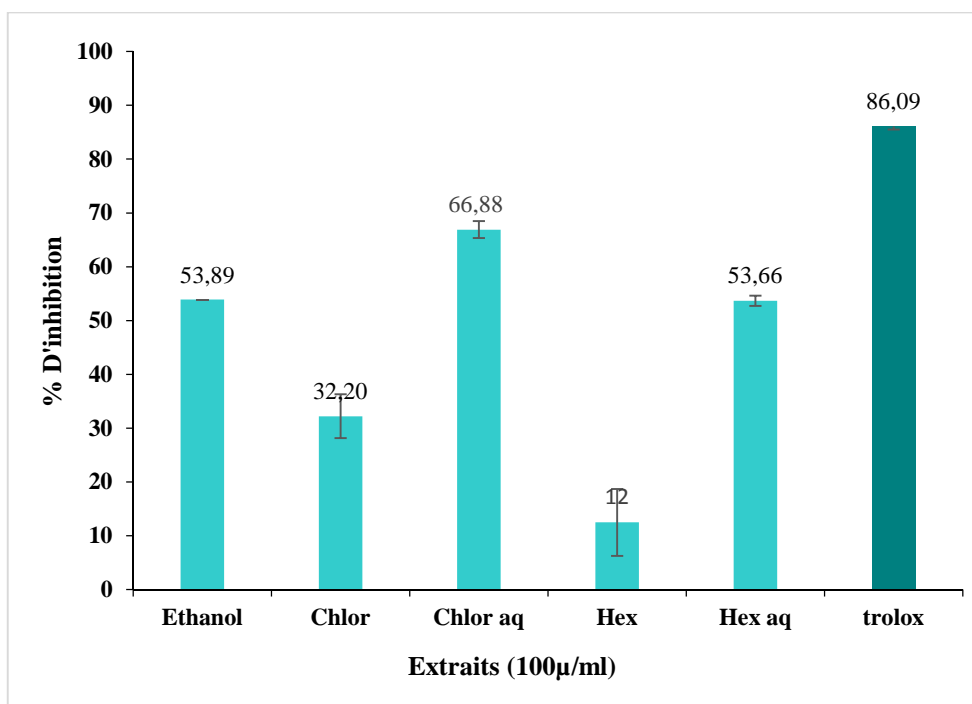


Figure 41 : Activité inhibitrice du radical ABTS^{•+} par les extraits d'*Eriobotrya japonica L* et de standard trolox.

D'après nos résultats, nous constatons que tous les extraits d'*Eriobotrya japonica L*, ont dévoilé une forte activité scavenging du radical $ABTS^{\bullet+}$, allant de $12\% \pm 6,22\%$ à $66,88\% \pm 1,58\%$ comparativement au standard utilisé le trolox, qui a donné un pourcentage d'inhibition de $86,09\% \pm 0,61$ (à $100\mu\text{g/ml}$)

Cependant, l'extrait éthanolique d'*Eriobotrya japonica L* a donné en $53,89\% \pm 0\%$ légèrement inférieur à ceux des aqueux ($66,88\pm 1,58\%$), cela pourrait bien s'expliquer par un encombrement stérique en empêchant la réduction de l'ABTS par les groupements OH des composés phénoliques.

On constate aussi que les extraits aqueux ont une activité légèrement supérieure aux extraits organiques, cela pourrait être expliqué par le fait que notre plante contient des composés phytochimiques riche en groupements OH et donc solubles dans les milieux aqueux.

Néanmoins, il est à noter que l'extrait aqueux du chloroforme des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* est supérieur à l'extrait organique, ceci est dû à la bonne corrélation avec les teneurs en polyphénols totaux ($R= 0,87$), les flavonoïdes ($R= 0,87$) et les tannins condensés ($R= 0,79$) (annexe).

➤ DETERMINATION DES IC_{50}

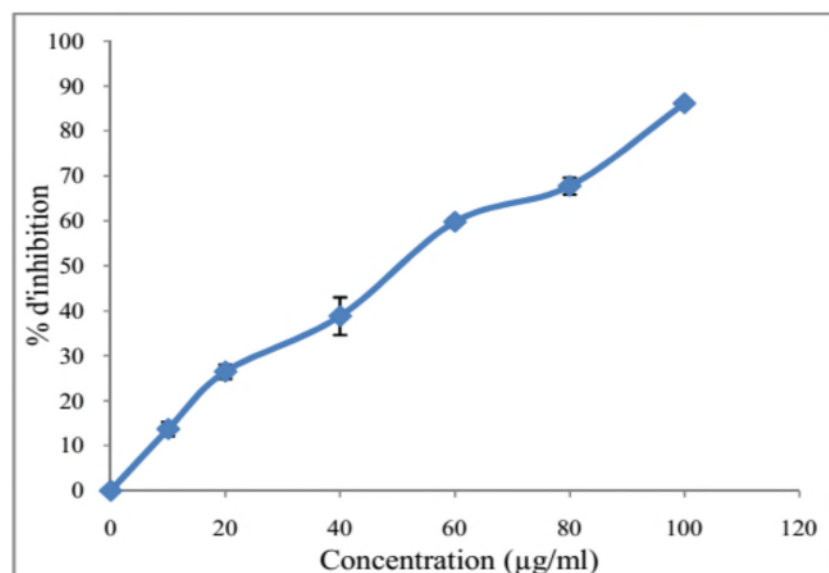


Figure 42 : Activité inhibitrice du radical $ABTS^{\bullet+}$ à différentes concentration du standard trolox.

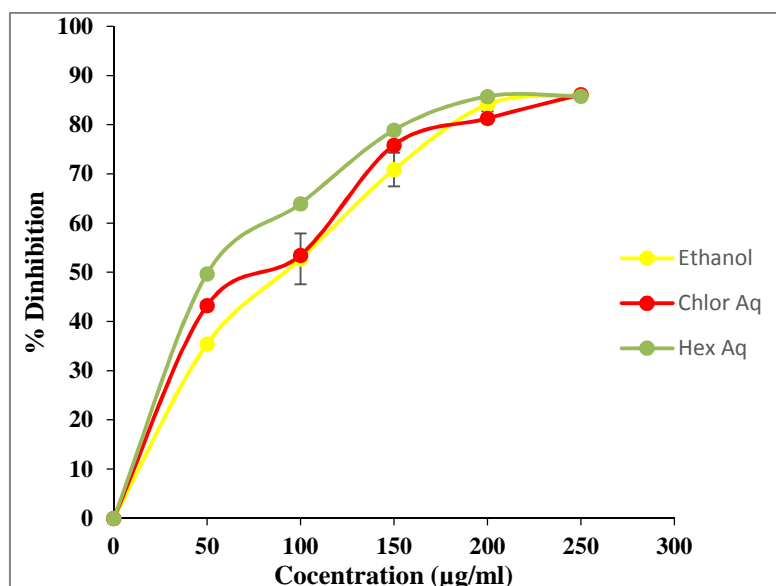


Figure 43 : Activité inhibitrice du radical $ABTS^{\bullet+}$ à différentes concentration d'extrait éthanol, d'extrait aqueux chloroforme et d'extrait aqueux hexane des feuilles d'*Eriobotrya japonica L.*

D'après ces figures, l'activité scavenging du radical $ABTS^{\bullet+}$ est proportionnelle aux concentrations des extraits, avec des IC_{50} indiquées dans le tableau N° VI, qui sont légèrement supérieurs à celle du Trolox qui est de $50,18\mu g/ml$ (Figure 42).

Tableau XII : Les IC_{50} de l'extrait éthanolique, extrait du chloroforme aqueux et d'hexane aqueux l'extrait aqueux des feuilles *Eriobotrya japonica L.*

Extraits	IC_{50} (µg/ml)
Ethanol	79,44
Aqueux du chloroforme	73,62
Aqueux d'hexane	56,02

III.4-CARACTERISATION DES EXTRAITS DES FEUILLES D'*ERIOBOTRYA JAPONICA L* :

Les différents extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* ont été soumis à des chromatographies sur couche mince préliminaires pour pouvoir apporter un aperçu sur la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez cette espèce.

✚ LE PREMIERE SYSTEME DE SOLVANT (TOLUENE/ACETONE /ACIDE FORMIQUE : 60/60/10 ; V/V/V) :

Le profil chromatographique des extraits à la lumière du jour (Figure 44), nous permet de constater que l'extrait éthanolique a laissé apparaître approximativement toutes les bandes retrouvées dans les différents extraits, car l'extrait éthanolique contient la totalité des composés retrouvés dans les différentes fractions.

A noter également l'apparition des spots correspondants aux trois standards utilisés (quercétine, rutine et l'acide galique).

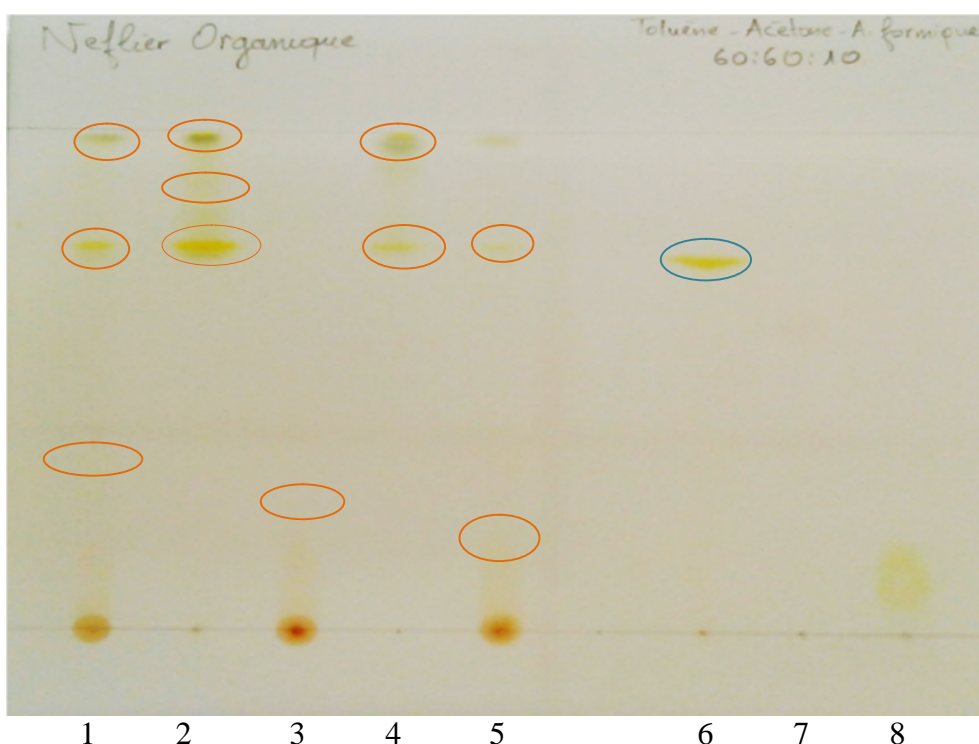


Figure 44 : Profil chromatographique des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* réalisé a lumière du jour. (1) : extrait éthanolique ; (2) : extrait organique du chloroforme ; (3) : extrait aqueux du chloroforme ; (4) : extrait organique d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : quercétine ; (7) : rutine ; (8) ; acide galique.

La plaque obtenue présente une bonne migration, par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés phénoliques. Les taches sont bien distinctes et montrent une richesse des feuilles en composés phénoliques.

On peut constater également la diversité et la richesse des extraits organiques par rapport aux extraits aqueux.

D'après la figure, on remarque que le spot de la quercétine est localisé au même niveau que les spots jaunes des extraits organiques et de l'extrait brut, ce qui nous laisse de supposer que les feuilles d'*Eriobotrya japonica L* sont riches en quercétine.

Le profil chromatographique sous UV (Figure 45), nous permet encore une fois de constater que l'extrait éthanolique contient le maximum de spots retrouvés dans les différents extraits descendants.

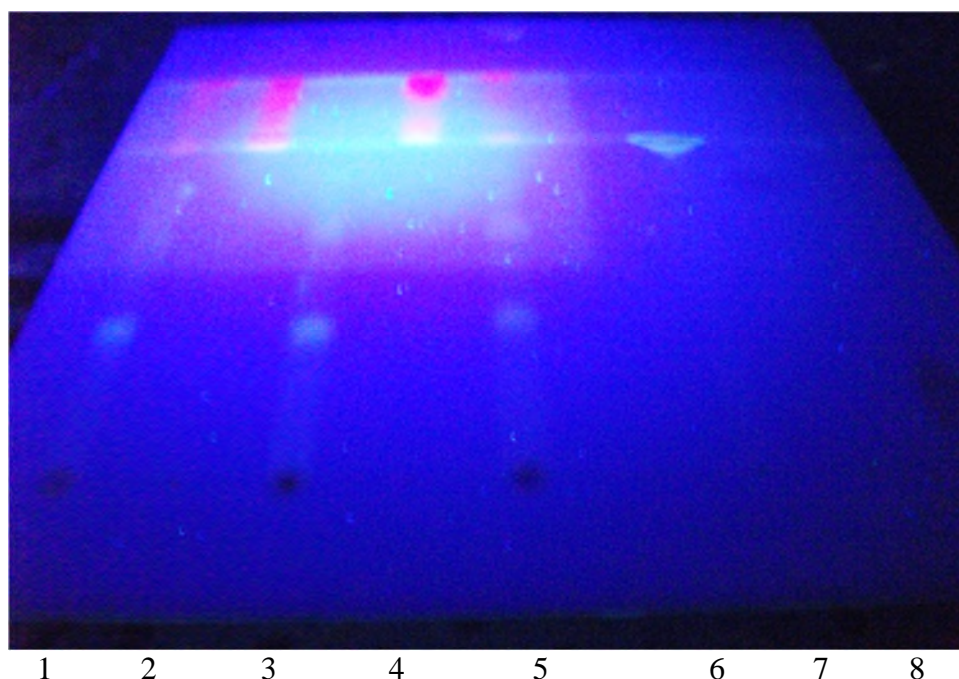


Figure 45 : Observation sous UV de la plaque chromatographique des extraits de feuilles d'*Eriobotrya japonica L* : (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait organique d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : quercétine ; (7) rutine ; (8) : acide gallique.

Les résultats de la CCM des extraits de la plante montrent les rapports frontaux des extraits organiques sont élevés ce qui fait que leurs composés migrent plus loin (entraînés par la phase mobile qui est aussi de polarité réduite) et se trouvent au sommet de la plaque chromatographique. Quant aux extraits aqueux leur migration n'est pas parfaite avec le

système utilisé. En conséquent, ils ont tendance à s'attacher et s'adsorber à la phase stationnaire qui est la silice (polarité élevée) ce qui fait que les composés n'ont pas migré avec la phase mobile et se trouvent ainsi au début de la plaque chromatographique (Rf faible).

Ce chromatogramme révèle la présence de plusieurs bandes de différentes couleurs correspondant à des composés bien déterminés (Tableau XIII).

Tableau XIII : Les couleurs des bandes des extraits sous UV et leur correspondance en composés phytochimiques (Akhanovna et al., 2012; Jork et al., 1994) :

couleurs	Identification
- Oranges pale	-Anthocyanidine 3,5 diglucoside.
-Blanc	-Flavonols, flavonones, flavones.
-Roses	-Anthocyanidine-3glucoside, Hydroxyflavonol.
-Roses foncé	-Tanin, terpènes et triterpènes

Le profil chromatographique révélé par la vanilline sulfurique des extraits d'*Eriobotrya japonica L* (Figure 46) montre la présence de taches violettes.

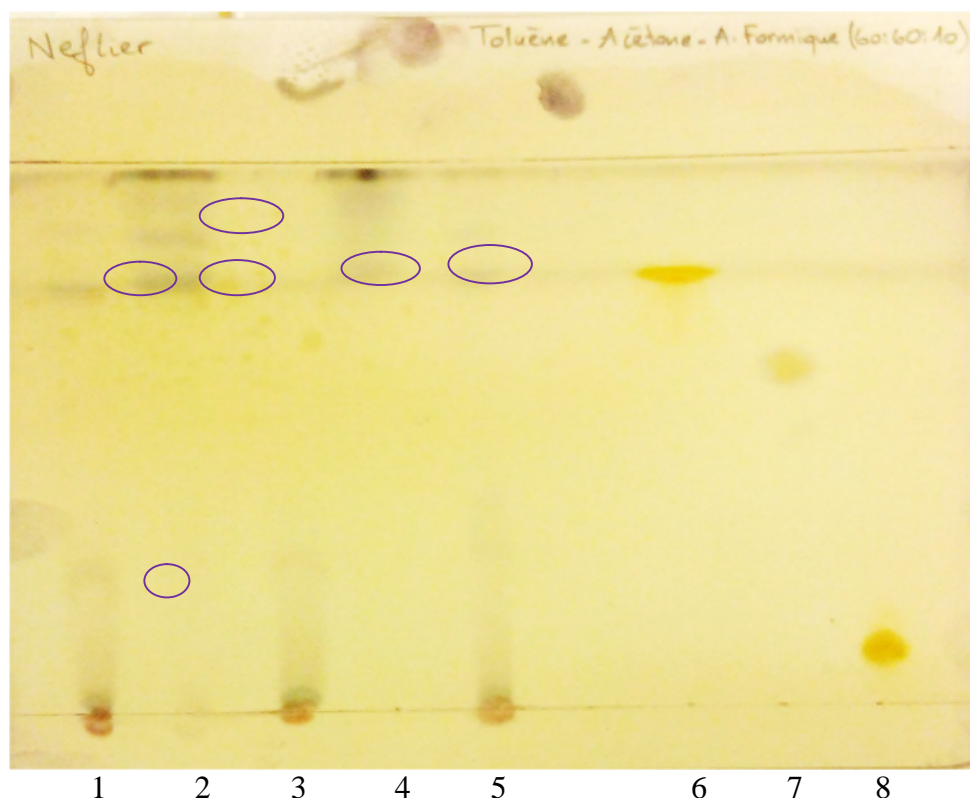


Figure 46 : profil chromatographique de tous les extraits de feuilles et d'*Eriobotrya japonica L*, pulvérisé avec la vanilline sulfurique. (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait organique d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : quercétine ; (7) rutine ; (8) : acide gallique.

Ce chromatogramme montre la présence de spots de différentes couleurs correspondant à des composés phytochimiques bien définis (Tableau XIV).

Tableau XIV : les couleurs des bandes des extraits après révélation avec la vanilline sulfurique (Akhanovna et al., 2012 ; Jork et al., 1994) :

Couleur	Identification
- Gris	-Acide gras.
- Violet	-Terpènes, monterpènes, triterpènes.
-Bleu-vert	-Terpènes.

Afin de bien séparer les composés des extraits aqueux, nous avons utilisé un autre système qui est plus polaire.

LE DEIXIEME SYSTEME DE SOLVANT (EAU/METHANOL/BUTANOL /ACIDE FORMIQUE 50/20/25/2 ; V/V/V/V) :

La chromatographie pour les extraits des feuilles à la lumière du jour représenté dans la figure 47 :

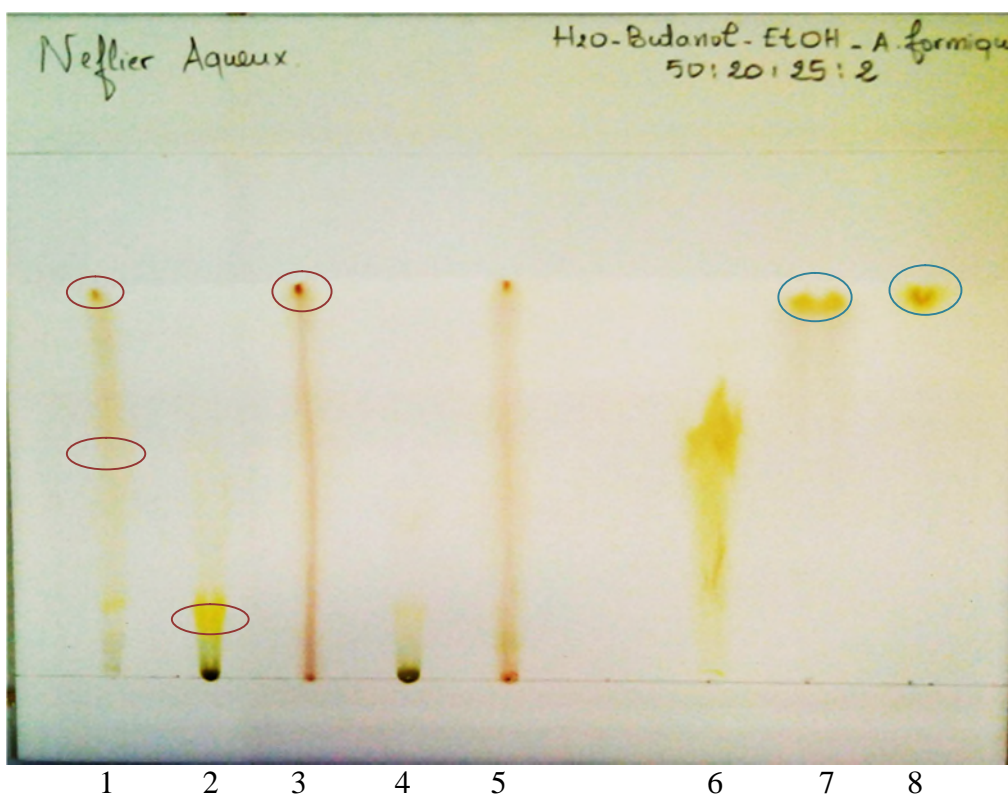


Figure 47 : Profile chromatographique des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* réalisé a lumière du jour. (1) : extrait éthanolique ; (2) : extrait organique du chloroforme ; (3) : extrait aqueux du chloroforme ; (4) : extrait organique d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : quercétine ; (7) : rutine ; (8) ; acide gallique.

Le profil chromatographique nous montre que l'extrait éthanolique contient approximativement toutes les bandes retrouvées dans les différents extraits.

On peut constater également que la diversité et la richesse en composés phytochimiques des extraits aqueux en comparaison aux extraits organiques.

Il est à noter également que trois standards utilisés (quercétine, rutine et l'acide gallique) comme molécules de référence.

D'après la figure 47, on remarque que le spot correspond à la rutine et à l'acide gallique sont localisés aux mêmes niveaux que les spots orange des extraits aqueux et de l'extrait brut, ce qui nous laisse supposer que les feuilles d'*Eriobotrya japonica L* sont riches en rutine et en acide gallique.

Le profil chromatographique observé sous UV est présenté dans la figure 48.

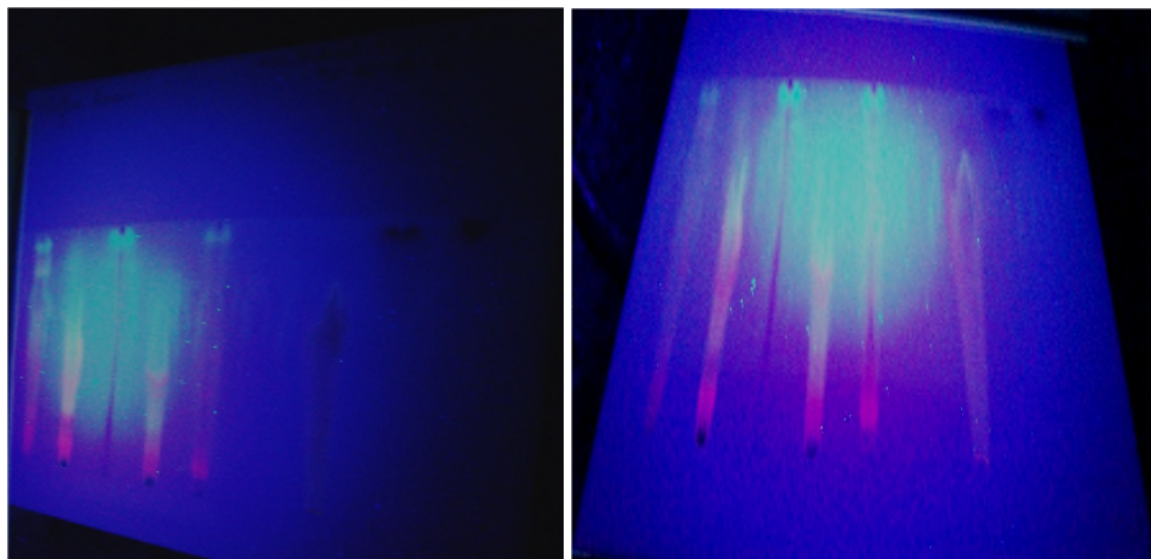


Figure 48 : Observation sous UV de la plaque chromatographique des extraits de feuilles d'*Eriobotrya japonica L*.

La figure 49 montre que les extraits éthanoliques ont présenté presque toutes les bandes retrouvées dans les différents extraits obtenus après fractionnement liquide.

Les résultats de la CCM des extraits de la plante avec un système d'élution de polarité élevé montrent une très bonne séparation des composés contenant dans les extraits de la plante.

Les extraits éthanoliques ont présenté presque toutes les bandes retrouvées dans les différents extraits obtenus après fractionnement liquide.

Nous remarquons que les spots des extraits organiques se retrouvent en bas de la plaque chromatographique cela est évident étant donné que cet extrait contient des composés de polarité réduite, ils ne sont pas entraînés en haut de la plaque du fait que le gel de silice soit hydrophile ainsi que la phase mobile utilisée. Par contre Les extraits aqueux du chloroforme et d'hexane migrent en haut de la plaque car ils ont une grande affinité avec le gel de silice et le système de solvant.

Nous remarquons aussi que de nouveaux spots sont apparus dans les extraits de la plante et une meilleure séparation des composés a été obtenue. Différents composés obtenus sont illustrés dans le tableau (XV).

Tableau XV : Les couleurs des bandes des extraits sous UV et leur correspondance en composés phytochimiques (Jork et al., 1994 ; Akhanovna et al., 2012) :

Couleurs	Identification
-Oranges pale	-Anthocyanidine 3,5diglucoside.
-Roses	-Anthocyanidine-3glucoside, Hydroxyflavonol.
-Rose foncé	-Tanin, terpènes et triterpènes
-Blanc	-Flavonols, flavonones, flavones.

Le profil chromatographique révélé par la vanilline sulfurique des extraits d'*Eriobotrya japonica* L (Figure 49) montre la présence de plusieurs taches violettes.

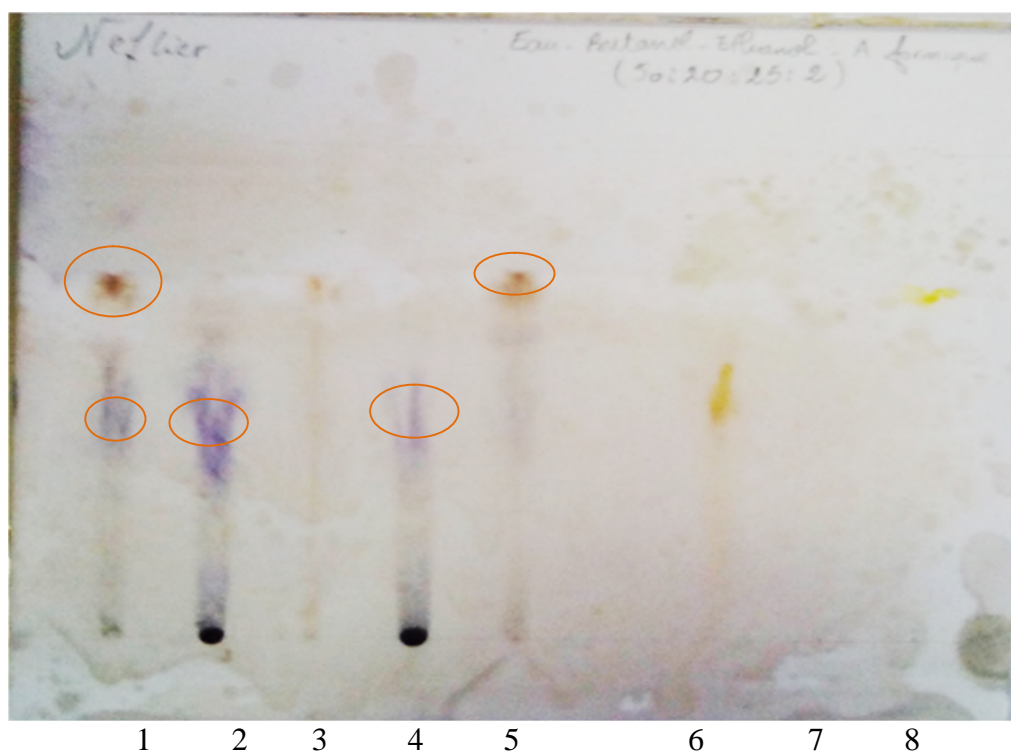


Figure 49 : profil chromatographique des extraits d'*Eriobotrya japonica* L. pulvérisée avec le DPPH (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait organique d’hexane ;(5) : extrait aqueux d’hexane ; (6) : quercétine ; (7) rutine; (8): acide gallique.

Nous constatons que le plus grand nombres de bandes se sont localisés au niveau des extraits organique, ce qui pourrait supposer la richesse de notre plante en composés apolaires. En outre, ce chromatogramme montre la présence de plusieurs spots de différentes couleurs correspondant à des composés phytochimiques bien définis (Tableau XVI).

Tableau XVI : les couleurs des bandes des extraits après révélation avec la vanilline sulfurique (Akhanovna et al., 2012).

Couleur	Identification
-Gris	-Acide gras.
-Violet	-Terpènes, monterpènes, triterpènes
-Maron	-Cineol

III.4.2-CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANT :

✚ LE PREMIERE SYSTEME DU SOLVANT (TOLUENE/ACETONE/ACIDE FORMIQUE : 60/60/10 ; V/V/V) :

➤ CARACERISATION DE L'ACTIVITE SCAVEGING DU RADICAL DPPH* :

La Figure 50 montre le chromatogramme des extraits de la plante après pulvérisation avec une solution de DPPH. Dans ce test, la réduction du radical DPPH* de couleur violette peut être visualisée par l'apparition de spots de couleur jaune.

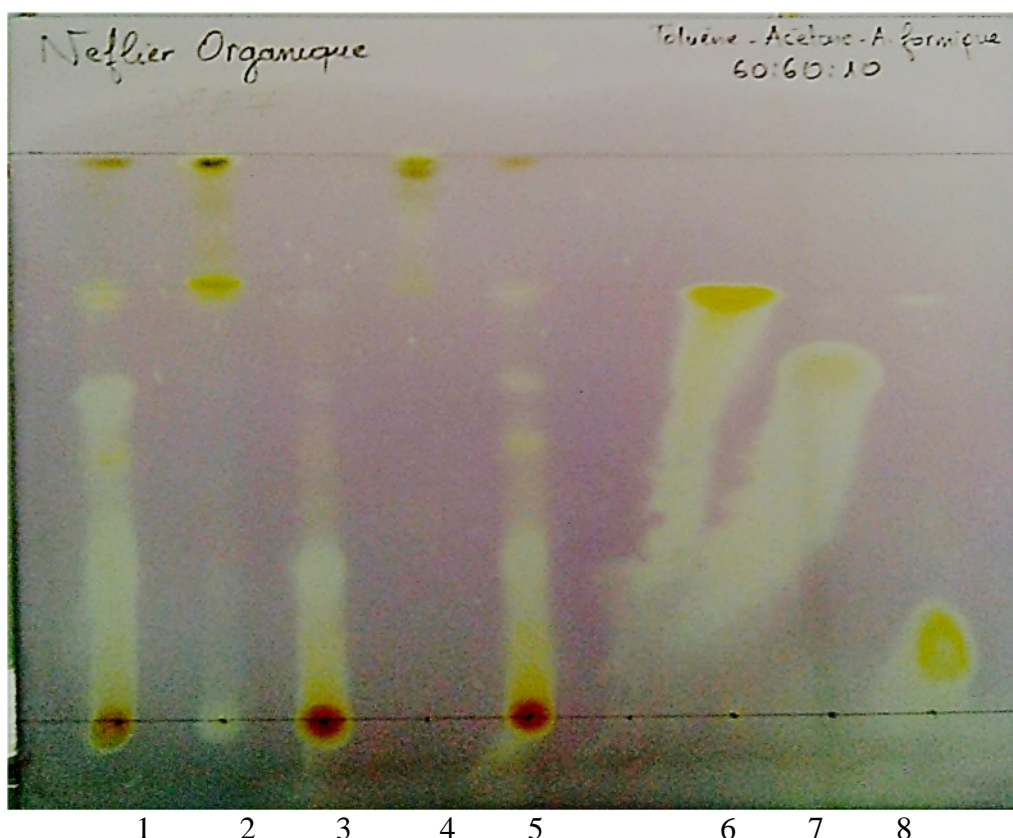


Figure 50 : profil chromatographique des extraits d'*Eriobotrya japonica L.* pulvérisée avec le DPPH (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait organique d'hexane ;(5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : quercétine ; (7) rutine ; (8) : acide gallique.

Une vue générale, nous permet de remarquer que les extraits d'*Eriobotrya japonica L.* Ont une très forte activité scavenging du radical DPPH. Ce qui explique l'apparition de plusieurs taches au niveau des extraits des feuilles.

D'après ces résultats, les extraits éthanoliques des feuilles qui ont laissé apparaitre le maximum de bandes actives (jaunes), ceci serait évident étant donné que c'est l'extrait brut et de ce fait il constitue la totalité des extraits des feuilles.

➤ **CARACTERISATION DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DU RADICAL ABTS' :**

La figure 51 montre le chromatogramme des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* après pulvérisation avec une solution d'ABTS'.

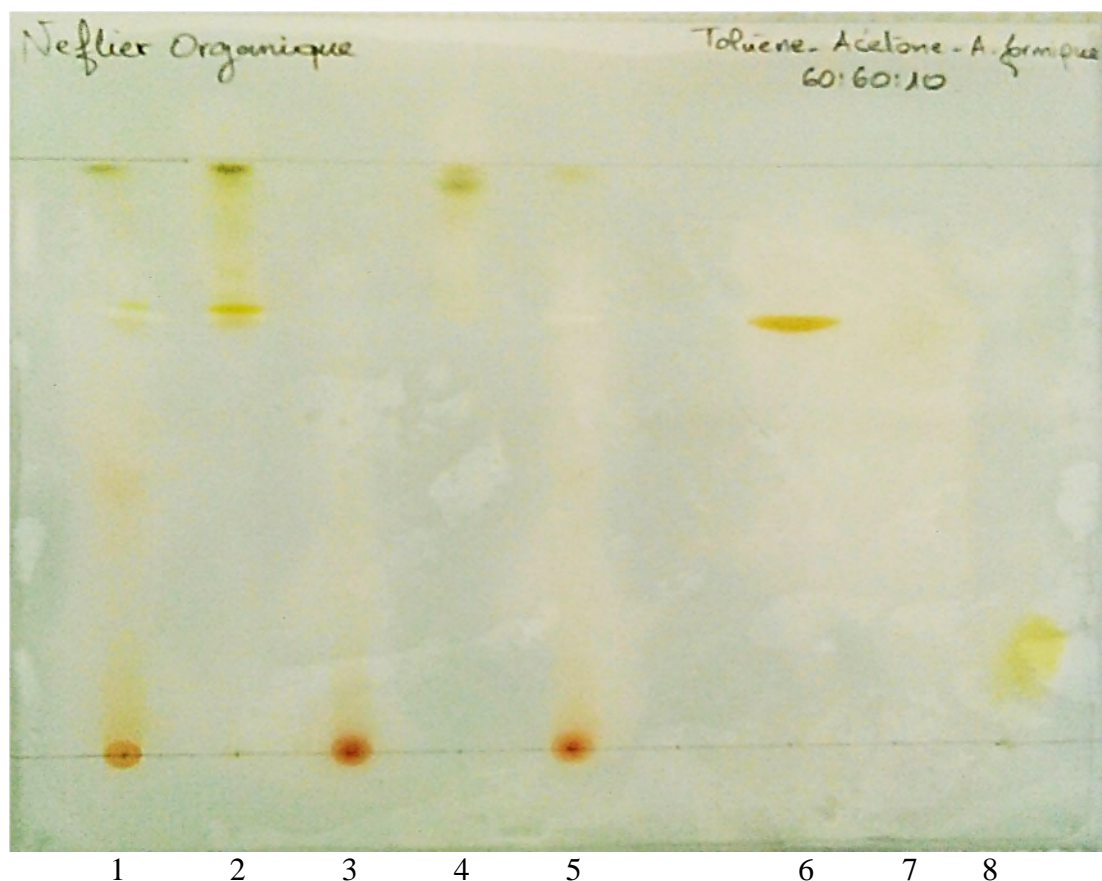


Figure 51 : profil chromatographique des extraits d'*Eriobotrya japonica L*, pulvérisée avec l'ABTS' : (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait organique d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : quercétine ; (7) rutine ; (8) : acide gallique.

Le principe est basé sur la manifestation de l'activité inhibitrice du radical ABTS' par la décoloration des spots actifs.

D'après le profil chromatographique ci-dessus, nous observons la décoloration de tous les spots des extraits des feuilles. Surtout l'extrait éthanolique qui contient la totalité des composés retrouvés dans les différentes fractions et aqueux du chloroforme et d'hexane cet effet peut être dû à la richesse des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* par les composés chimique tel que quercétine, tanins condense, qui s'explique par la forte activité inhibitrice du radical ABTS' par cet extrait.

LE DEUXIEME SYSTEME DE SOLVANT (EAU /METHANOL /BUTANOL /ACIDE FORMIQUE 50/20/25/2 ; V/V/V/V) :

CARACTERISATION DE L'ACTIVITE SCAVENGING DU RADICAL DPPH[•] :

La figure 52 montre le chromatogramme des extraits de la plante après pulvérisation avec une solution de DPPH[•].

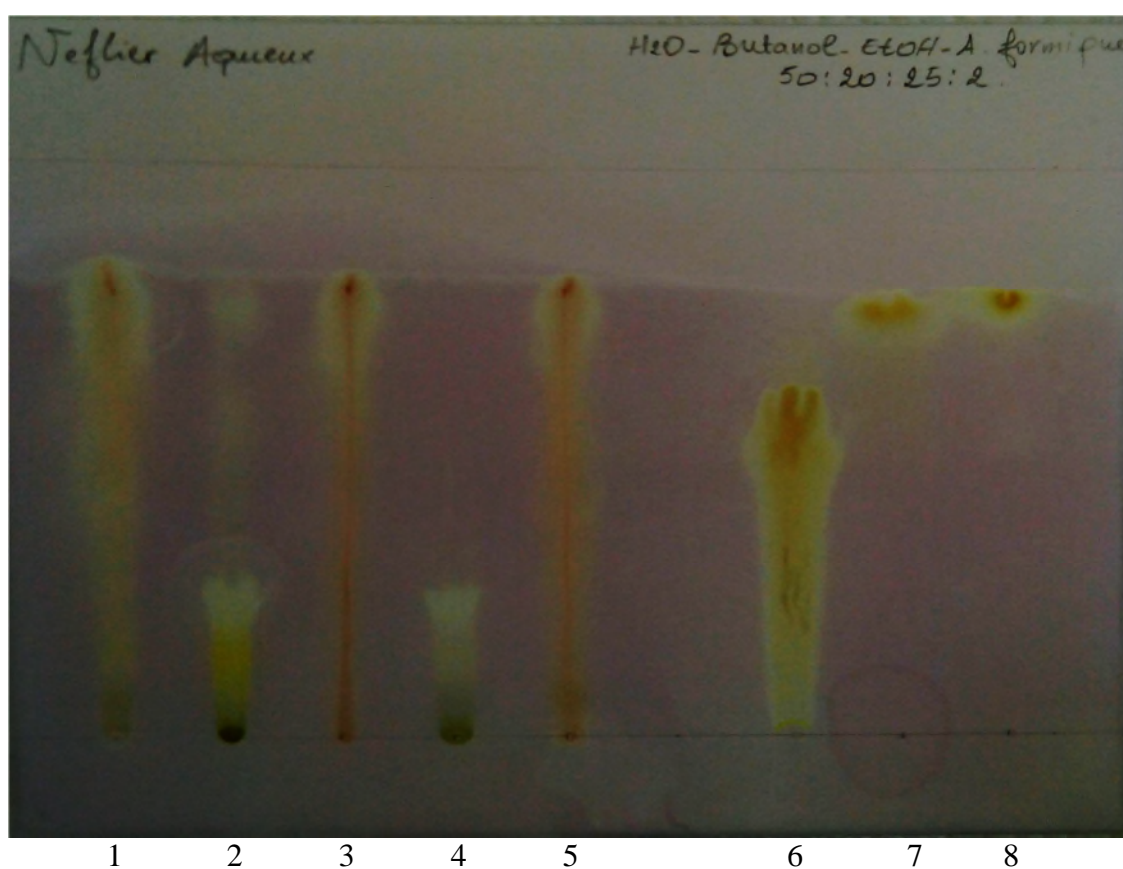


Figure 52 : profil chromatographique des extraits d'*Eriobotrya japonica* L. pulvérisée avec le DPPH (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait organique d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : quercétine ; (7) rutine ; (8) : acide gallique.

Nous remarquons que ce sont les extraits éthanoliques des feuilles qui ont laissé apparaître le maximum de bandes actives (jaunes), étant donné qu'ils constituent les extraits bruts donc ils contiennent la totalité des composés phénoliques.

En outre, les extraits des feuilles ont montré une activité scavenging puissante ce qui explique l'apparition de plusieurs taches au niveau des extraits des feuilles.

➤ **CARACTERISATION DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DU RADICAL ABTS[•] :**

D'après le profil chromatographique ci-dessous, nous observons la décoloration de tous les spots des extraits des feuilles. Surtout l'extrait éthanolique qui contient la totalité des composés retrouvés dans les différentes fractions et aqueux du chloroforme et d'hexane ce qui s'explique par la forte activité inhibitrice du radical ABTS par cet extrait.

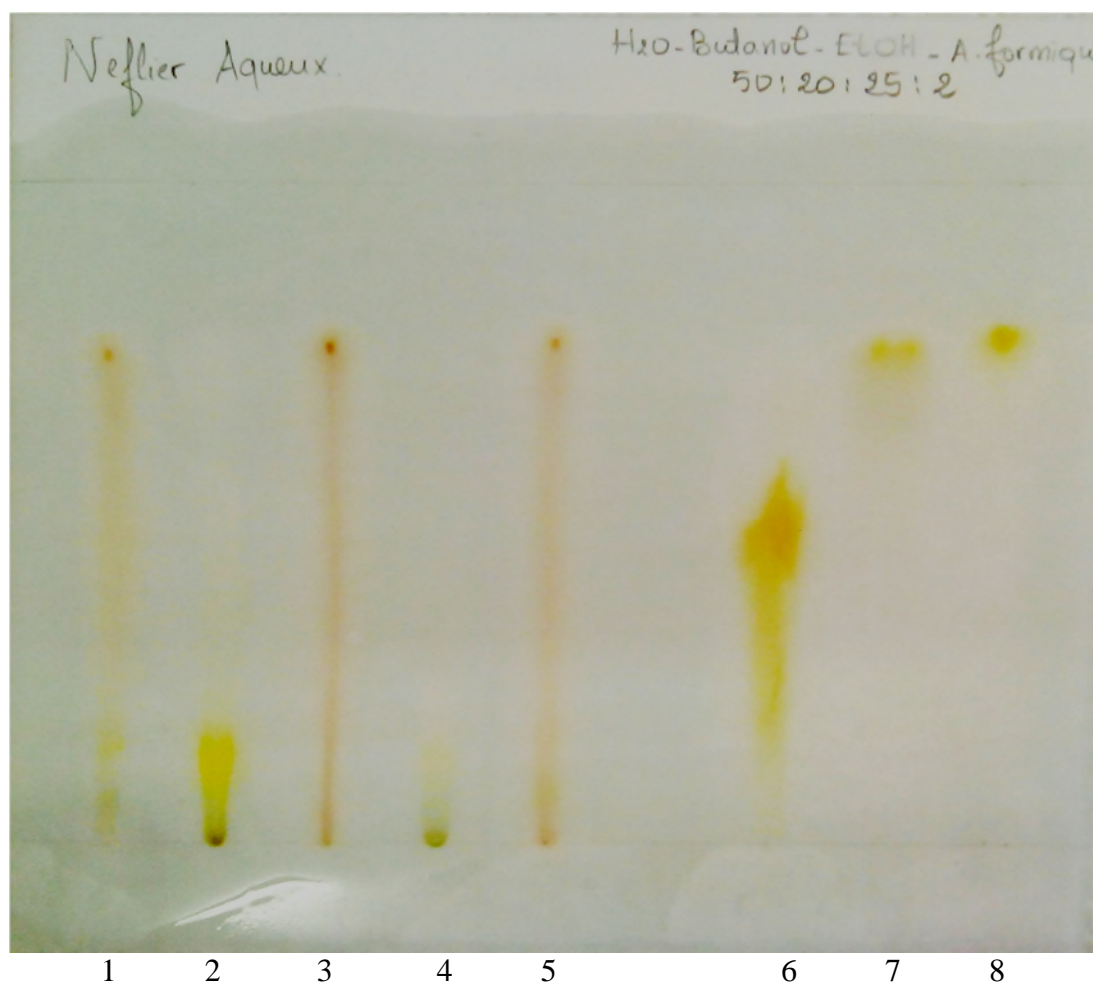


Figure 53 : profil chromatographique des extraits d'*Eriobotrya japonica L.*, pulvérisée avec l'ABTS[•] : (1) : extrait éthanolique F ; (2) : extrait organique du chloroforme F ; (3) : extrait aqueux du chloroforme F ; (4) : extrait organique d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane ; (6) : quercétine ; (7) rutine ; (8) : acide gallique.

Finalelement, d'après les deux systèmes utilisés, on a pu identifier le maximum de composés dans notre plante. On constate que les feuilles d'*Eriobotrya japonica L* sont riches en composés de polarité élevée tels que les flavonoïdes (Flavonols, flavonones, flavones) et en composés peu polaires tels que (Terpènes, monterpènes, triterpènes, tanin, anthocyanidine-3glucoside, hydroxyflavonol) ainsi que des acides gras et des cineols, par comparaisons à des études réalisées par **Jung et al., (1999)**, **Hideyuki et al., (2000)**, **Louati et al., (2003)**, **Kawahara et al., (2002)** et **Chen et Li., (2008)** qui ont trouvé les memes constituants.

CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Eriobotrya japonica L est une plante très répandue dans la zone méditerranéenne et vu son utilisation locale comme plante médicinale, elle présente un grand intérêt pharmacologique. Notre étude réalisée sur les feuilles d'*Eriobotrya japonica L* nous a permis d'aboutir aux résultats suivants :

- Les taux d'extraction obtenus montrent que l'extrait éthanolique a donné un taux d'extraction important, ce qui montre la richesse des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* en composés phytochimiques. En outre, ce sont les extraits aqueux qui ont donné les pourcentages d'extraction les plus élevés par rapport aux extraits organiques, cela pourrait supposer la richesse de la plante en composés phytochimiques polaires que apolaires.
- L'évaluation du contenu en phénols totaux en adoptant la méthode de Folin-ciocalteu a révélé des teneurs importantes en composés phénoliques par notre plante.
- Les résultats des dosages des composés phénoliques montrent que les phases aqueuses ont donné les teneurs les plus élevés en phénols totaux, pro-anthocyanidines et en flavonoïdes, étant donné que les composés phénoliques sont riches en groupement hydroxyle, ce qui leur confère un caractère hydrophile.
- En ce qui concerne les activités anti-radicalaires, tous les extraits des feuilles de la plante ont montré une forte activité scavenging du radical DPPH• et du radical ABTS•⁺ à 100 µg/ml en comparaison avec les standards utilisés.
- L'analyse chromatographique des extraits des feuilles de notre plante à la lumière du jour, sous UV et avec la vanilline sulfurique nous a permis d'identifier certains composés phénoliques dont l'un correspond à la quercétine, avec une éventuelle présence des acides phénoliques et des flavonoïdes, des cinéoles et des terpène.
- La caractérisation de l'activité antioxydante des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L* par chromatographie sur couche mince a confirmé leur richesse en divers composés doués d'une forte activité anti-radicalaire.

- En fin, l'activité antioxydante peut être attribuée à la présence des polyphénols dans les extraits, les résultats indiquent une forte corrélation entre les activités antioxydantes testées et les composés phénoliques supposant ainsi que les composés phénoliques sont probablement responsables de cette activité.
- Ce travail, même général, nous permet de conclure que les extraits d'*Eriobotrya japonica* L constituent une source inestimable en divers composés phénoliques doués d'activité antioxydante, ce qui justifie leur utilisation en médecine traditionnelle. De ce fait, les résultats de la présente étude méritent d'être affinés et pour cela il serait très intéressant d'aller plus loin en essayant de réaliser ces tests antioxydants *in vivo* afin d'étudier l'efficacité et la toxicité des extraits ou des constituants biochimiques isolés, aussi bien que de s'investir dans d'autres parties de la plante à savoir, les fleurs, les graines et l'écorce.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- ❖ **Abdou Boubba, A., Njintang, Y.N., Scher, J. et Mbofung, C.M.F. (2010).** Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices. *Agriculture and Biology Journal of North America*, **1**(3): 213-224.
- ❖ **Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P et Lomri, A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*, **74**: 636-643.
- ❖ **Akhanovna, M. B. J., Benson, B. B., Christian, K. K., et Yves-Alain, B. (2012).** Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes antihypertensives utilisées à Gramanssabo en Côte d'Ivoire. *Nature & Technologie*, 2-12.
- ❖ **Alshaker H.A., Qinna, N.A., Qadan, F., Bustami, M. and Matalka, K.Z. (2011).** Eriobotrya japonica hydrophilic extract modulates cytokines in normal tissues, in the tumor of Meth-A-fibrosarcoma bearing mice, and enhances their survival time. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **11**:9.
- ❖ **Amiard, J.C. (2013).** Le risque radioactif: Devenir des radionucléides dans l'environnement et impacts sur la santé. *Lavoisier*.
- ❖ **Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D. et Trinajstić, N. (2003).** Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA.*, **76**(1): 55-61.
- ❖ **Ardistani, A. and Yazdanparast, R. (2007).** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chem*, **104**: 21-29.
- ❖ **Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S. et Khebri, S. (2010).** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum Cyminum L.* *Lebanese Science Journal*, **11**(1): 69-81.
- ❖ **Azimova, S.S., Glushenkova, A.I. and Vinogradova, V.I. (2011).** Lipids, lipophilic components and essential oils from plants sources. *Springer*. 992p.

B

- ❖ **Bahorun T. (1997).** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle Ed AMAS. Pp : 12-17.
- ❖ **Ballinger, S.W. (2005).** Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radical Biology et Medicine*, **38**: 1278-1295.
- ❖ **Barouki, R. (2006).** stress oxydant et vieillissement, **22**:266-272.
- ❖ **Baudin, B. (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *mt cardio*, **2**(1) :43-52.
- ❖ **Beaudeau, J.L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A. et Peynet, J. (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée*, **21** : 144-150.
- ❖ **Bérard, E. (1997).** Métabolisme et régulation du monoxyde d'azote : un médiateur de contrôle difficile. **4**:1004-1011.
- ❖ **Bloomer, R.J. and Fisher-Wellman, K.H. (2008).** Blood Oxidative Stress Biomarkers: Influence of Sex, Training Status, and Dietary Intake. *Gender Medicine*, **5**(3):218-28.
- ❖ **Boizot, N. et Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cah. Tech. INRA. N°. special*, P: 79-82.
- ❖ **Bonnefont-Rousselot, D., Peyet, J., Beaudeau, J.-L., Therond, P., Legrand, A. et Delattre, J. (2002).** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16** : 260-267.
- ❖ **Bonnefont-Rousselot, D., Therond, P. et Delattre, J. (2003).** Radicaux libres et antioxydants. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. *Médecinesciences Flammarion Paris*. 59-81.
- ❖ **Bourgaud, F., Grivot, A., Milesi S. and Gontier E. (2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, **161**: 839-851.
- ❖ **Browne, R.W., Bloom, M.S., Schisterman, E.F., Hovey K., Trevisan, M., Wu, C., Liu A. and Wactawski-Wende, J. (2008).** Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers*, **13**(2) :160-83.
- ❖ **Bruneton, J. (1993).** Composés phénoliques : pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. *Edition Lavoisier*. Chap.3. Paris. pp : 199-383.

- ❖ **Bruneton, J. (1999).** Les composés phénoliques. In « pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». 3^{ème} édition, *Tec et Doc Lavoisier*, Paris : p240-389.
- ❖ **Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition Lavoisier. Paris. 1268p.

C

- ❖ **Caballero ,P. etFernà ndez,M.A.,(2004).** Loquat production et marché.Options méditerranennes Serie A,**58**:11-20.
- ❖ **Cha, D. S., Eun, J. S., Jeon.(2011).** Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*.*Journal of Ethnopharmacology*, **134** : 305–312.
- ❖ **Chalaka,L., Abir,N., Youssef,H. and Hamadehb,B.(2014).** Diversity of loquats (*Eriobotrya japonica Lindl.*) cultivated in Lebanon as assessed by morphological traits .*Scientia Horticulturae*, **167**: 135–144.
- ❖ **Chavan, V.U. and Melinkeri,R.R. (2013).** Study of protein carbonyl group, nitric oxide and MDA (index of lipid peroxidation) as biomarkers of oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Natl J Community Med*, **4** (2):294-9.
- ❖ **Chen, J. and Li W.L. (2008).**Progress in studies phytochemistry biological activity of folium *Eriobotryae* .Global science Books: 18-22.
- ❖ **Chiang, H.C., Lo, Y.J. and Lu, F, J. (1994).** Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *alsophilaspinusosa* (Hook) tryon. *Enzyme inhibition*, **8**(1): 61-71.
- ❖ **Chvuan, U.-D., Shahidi, F. and Naczk, M. (2001).** Extraction of condensed tannins from beach pea (*Larhirusmaritumus L*) as affected by different solvent. *Food Chemisty*, **75**: 509-512.
- ❖ **Cicco, N., Lanorte, M.T., Paraggio, M., Viggiano,M. and Lattanzio, V. (2009).** A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, **91**: 107-110.
- ❖ **Cowan, M.M. (1999).** Plant Products as Antimicrobial Agents. *American Society for Microbiology*, **12**(4): 564-582.

D

- ❖ **D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. and Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*, **43**(4): 348-361.
- ❖ **Davies, M.J., Fu, S., Wang, H. and Dean R.T. (1999).** Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med*, **27**(11-12) : 1151-1163.
- ❖ **Deby-Dupont, G., Deby, C. et Lamy, M. (2002).** Éditions scientifiques et médicale Elsevier SAS. *Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène*, **11** :28-39 .
- ❖ **Defraigne, J. et Pincemail, J. (2008).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liege*, **63**: 10-19.
- ❖ **Defraigne, J.O. et Pincemail, J. (2007).** Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liege*, **62**(4):1-10
- ❖ **Delattre, J., Beaudoux, J.-L. et Bonnefont- Rousselot, D. (2005a).** Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques, 1- 23.
- ❖ **Delfanian, M., Reza, E. K. and Sahari, M. A. (2015).** Antioxidative effect of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) *Fruit skin extract in soybean oil. Food Sci Nutr.* **3**(1): 74–80.
- ❖ **Dellattre, J., Therond, P. and Bonnefont-Rousselots, D. (2005).** Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. Radicaux libres et stress oxydant. *Aspects biologiques et pathologiques*, 281-309.
- ❖ **Delmeyda, W. (2001).** Méthodes analytiques en chimie instrumentale (site). chromatographie sur couche mince.
- ❖ **Demir, S. (1987).** Elvage de loquat .Tarin Oman VE koyisleri Bakanaligi Narenciye Arastima.
- ❖ **Denisov, E.T. and Afanas'ev, B.I. (2005).** Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. Taylor & Francis. 992p.
- ❖ **Durand, T., Cracowski, J.L. et Berdeaux, O. (2005).** Les isoprostanes, biomarqueurs de peroxydation lipidique chez l'homme. Partie 1. *Nomenclature et synthèse*, **53**: 349–355.
- ❖ **Duranteau, J. et Huet, O. (2008).** Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres. *Réanimation*, **4**(17) :387-392.

E

- ❖ **Edouard, F., Gilman, and Dennis, G.W. (1993).** *Eriobotrya japonica* Loquat. *Fact Sheet ST*, **235**:1-3.
- ❖ **Elicoh-Middleton, J. Chithan K. and Theoharis C. (2000).** Effect of plant flavonoids on Mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology. And Experimental therapeutics*, **4(52)**: 673-751.
- ❖ **El-Refaey, F.A. and El-Dengawy.(2005).** Promotion of seed germination and subsequent seedling growth of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by moist-chilling and GA3 application . *Scientia horticulturæ* **105**:311-342.
- ❖ **Ercisli,S., Gozlekci , Sengulc, M., Hegedusd,A. and TepeS .(2012).** Some physicochemical characteristics, bioactive content and antioxidant capacity of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) fruits from Turkey. *Scientia Horticulturæ*, **148**:185–189.
- ❖ **Esmaili,A.H., khavari-Nejad, R.A., Hxjizadeh, M.A., Chaichi, M. J and Ebrahimdeh M.A. (2012).** effects of *Eriobotrya lindl* Flower extracts on mercuric chloride-induced hépatotoxicity in rats. *Chinese Science Bulletin*, **30**:3991-3897.
- ❖ **Evans, J. L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A. and Grodsky, J.M. (2002).** Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*, **23(5)** : 599-622.

F

- ❖ **Favier, A. (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin*, **55** (1) : 9-16.
- ❖ **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, p108-115.
- ❖ **Favier, A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. Mémoire d'Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. *Ann. Pharm. Fr* .p **64**: 390-396.
- ❖ **Ferreres, F. , Gomes, D., Valentão, P., Gonçalves ,R., Pio, R., Chagas, E. A., Seabra ,R. M. and Andrade, P.B. (2009).** Improved loquat (*Eriobotrya japonica*

Lindl.) cultivars : Variation of phenolics and antioxidative potential. *Chimie alimentaire*, **114** :1019-1027.

- ❖ **Flourie, F., Arab, K., Rossary, A et Steghens, J.P. (2006).** Immuno-analyse et biologie spécialisée, **21**. 229-233.
- ❖ **Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C. and Leverve, X. (2002).** Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, **11** : 411-20.

G

- ❖ **Gammoudia, A., Dandanaa, H., Chaheda, S., Ferchichia, S., Ernezb, A. and Mileda. (2013).** Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, **28** : 39–42.
- ❖ **Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. et Jore, D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? *L'actualité Chimique*, 91-96.
- ❖ **Garima, P. and Casimir, C. A. (2010).** Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chemistry*, **120**:1067–1075.
- ❖ **Gazengel-Amme, J.-M. et Orecchioni, M. (2013).** Le préparateur en pharmacie. *Lavoisier*. Paris.
- ❖ **Germana, M.A., Chiancone, B., Guarda, N. L., Testillano, P. S. and Risuen, M.-C. (2006).** Development of multicellular pollen of *Eriobotrya japonica* Lindl. Through anther culture *Plant Science*, **171**:718–725.
- ❖ **Ghisolfi-Marque, A., Boyer, M.J., Vellas, B., Thouvenot, J.P., Albarède, J.L. et Ghisolfi, J. (1996).** Activité anti-oxydante, lipoperoxydation et vieillissement chez l'homme. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **10**: 151-160.
- ❖ **Goli, A.H., Barzegar, M. and Sahari, M.A. (2004).** Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachiavera*) hull extracts. *Food Chemistry*, **92**:521-525.
- ❖ **Goudable, J. et Favier, A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*, **11**:115-20.

- ❖ Goulas, V., Minas, I.S., Kourdoulas, P.M., Vicente, A.R. and Manganari G.A., (2014). Phtochemical content antioxidants and cell wall metabolism of two loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars under different storage regimes. *Food Chemistry* **155**:227-234.
- ❖ Gu, H.F., Li, C.M., Xu, Y.J., Hu, W. F., Chen, M.H. and Wan, Q.H. (2008). Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International*, **41**: 208-217.

H

- ❖ Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev*, **55**:44–49.
- ❖ Halliwell, B. (2007). Oxidatives stress and cancer: have we moved forward. **401** : 1-11.
- ❖ Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J*, **219**:1–14.
- ❖ Halliwell, B. and Gutteridge, J. (2007). Free Radicals in Biology and Medicine. *Fourth Edition*, Oxford press.
- ❖ Hamada, A., Yoshioka, S., Takuma, D., Yokota, J., Cui, T., Kusunose M., Miyammura, M., Kyotani, S. and Nishioka, Y. (2004). The effet of *Eriobotrya japonica* seed extract on oxidative stress in adramicin-induced Nephropathy in Rats . *Biol.pharm.Bull*, **27**(12):1961-1994.
- ❖ Haslam, E. (2007). Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*, **68**: 2713-2721.
- ❖ Hazout, A., Menezo, Y., Madelenat, P., Yazbeck, C., Selva, J et Cohen-Bacrie, P. (2008). Causes et implications cliniques des altérations de l'ADN des spermatozoïdes. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, **36** :1109–1117.
- ❖ Hemalatha, S., Lalitha, P. and Arulpriya, P. (2010). Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *pothosaurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, **2**(6): 84-89.
- ❖ Hideyuki, I., Eri, K., Yoshie, T., Shu-Hua, L., Tsutomu, H., Hiroshi, S., Kaoru, K., Kazue S., Daigo, S., Susumu S., Yoshio I and Takashi Y. (2000). Polyphenols from *Eriobotrya japonica* and Their Cytotoxicity against Human Oral Tumor Cell Lines, *Chem. Pharm. Bull*, **48**(5):687—693.

- ❖ **Huet, O., et Duranteau, J. (2008).** Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres endothelial dysfunction: Involvement of reactive oxygen species. *Réanimation*, **17**: 387-392.
- ❖ **Hui-ya, H., Kuang-yao, L., Wen-chuan,L., Susumu,K. and Jin-bin W. (2010).** Regulation and improvement of triterpene formation in plant cultured cells of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, VOL. 110 No. **5**: 588–592.

I

- ❖ **Ito, H.,Kobayashi, E.,Takamatsu,Y., Li, S.H.,Hatano,T.,Sakagani,H, Kusama, K.,Sato, K.,Sugita,D.,Shimura,S., Itoh ,Y. and Yoshida,T.(2000).**Polyphénols from *Eriobotryajaponica* and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines.*Chemica andpharmaceutical Bulletin* .**48**:687-693.

J

- ❖ **Jacob, L. (2007).** L'insuffisance rénale aiguë. *Edition Springer*, p 88.
- ❖ **Jin, O., Min, O.-J., Hyeon, A.-K., Kim, J.-K, Hum, Y.-B, and Dong, Y.-R. (2011).**Effect of *Eriobotrya japonica* on Adipogenesis and body Weight. Corresponding author; Korean Soc. Appl. Biol, **54** (3) : 382-387.
- ❖ **Jork, H., Funk, W., Fischer,W and Wimmer,H. (1994).** Thin-Layer Chromatography: reagents and detection methods.**1**:448.
- ❖ **Jung, H.A., Park, J.C.,Chung,H.Y.,Kim, J. and Choi ,J.S.(1999).**Antioxidant flavonoids and chlorogenic acid from the leaves of *Eriobotryae* .*Archive of pharmacal Research* ,**22**:213-218.
- ❖ **Ju-Sang, K., Ramasamy, H., Man-Chul, K., Ik-Soo, J., Dong-Hwi, K., Seung-Hyun, H., Chellam, B. and Moon-Soo,H.(2011)** .Enhancement of *Eriobotrya japonica* extracts on non-specific immune response and disease resistance in kelp grouper *Epinephelus bruneus* against *Vibriocarchariae*.*Fish & Shellfish Immunology*, **31**:1193-1200.

K

- ❖ **Kara.(2007).** Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie. Ed 2: NEW AGE INTERNATIONAL PUBLISHERS; p: 1-30.
- ❖ **Kathiresan K. (2003).** Insect foliovery in mangroves. *Indian Journal of Marine Sciences* **32** (3): 237-239.

- ❖ **Kawahara, N., Satake, M. and Goda, Y. (2002).** A new acylated Flavonol glycoside from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Chemical and pharmaceutical Bulletin*, **50**:1619-1620.
- ❖ **Kazunori, K., Asao, M., Kyoich, O. and Yung-Sheng, H. (2007).** Effect of loquat (*Eriobotrya japonica*) extracts on LDL oxidation. *Food Chemistry*, **104**: 308–316.
- ❖ **Kim, S.-H. and Shin, T.-Y. (2009).** Anti-inflammatory effect of leaves of *Eriobotrya japonica* correlating with attenuation of p38 MAPK, ERK, and NF- κ B activation in mast cells. *Toxicology in Vitro*, **23**: 1215–1219.
- ❖ **Kim, M.-J., Lee J., Song, A.-R., Lee, A.-R., Kim, Y.-J., Back, H.-Y., Jun, W.-J. and Yoon, H.-G. (2011).** Neuroprotective effects of *Eriobotrya japonica* against β -amyloid-induced oxidative stress and memory impairment. *Food and chemical toxicology*, **49**:780-784.
- ❖ **Kirschvink, N., de Moffarts, B. and Lekeux, P. (2008).** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, **177**:178–191.
- ❖ **Knight, T.R., Kurtz, A., Bajt, M.L., Hinson, J.A. and Jaeschke, H. (2001).** Vascular and Hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen-induced liver injury: role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci*, **62**:212–220.
- ❖ **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. **20**:165-177.
- ❖ **Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., and Abdely, C. (2008).** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biologies*, **331**: 865-873.
- ❖ **Krause, D.O., Smith, W.J.M., Brooker, J.D. et McSweeney, C.S. (2005).** Tolerance mechanisms of streptococci to hydrolysable and condensed tannins. *Animal Feed science and Technology*, **121**, 59-75.

ℒ

- ❖ **Lacolley, P., Babuty, D., Boulanger, C., Ghaleh, B., Loirand, G., Pinet, F. et Samuel, J. (2007).** Biologie et pathologie du Coeur et des vaisseaux. John Libbey Eurotext. p677.

- ❖ **Laguerre, M., Lecomte, J. et Villeneuve, P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, **46**: 244–282.
- ❖ **Laguerre, M., López-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Pina, M. et Villeneuve, P. (2007).** Outils d'évaluation in vitro de la capacité antioxydante. *OCL VOL*, **14**(5): 278-292.
- ❖ **Lee, J., Koo, N. and Min, B.D. (2004).** Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3**: 21-33.
- ❖ **Li, W.L., Zheng, H.C., Bukuru, J. and De Kimpe, N. (2004).** Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, **92**:1–21.
- ❖ **Li, W. L., Wu, J.L., Ren, B.R., Chen, J. and Lu, C.G. (2007).** Pharmacological Studies on anti-hyperglycemic effect of folium Eriobotryae. *The American Journal of Chinese medicine*, **35**:711-717.
- ❖ **Lin, S.Q. (2007).** World loquat production and research with special reference to China. *Acta Hort*, **750**: 37-43.
- ❖ **Lin, S., Sharpe, droit, et Janick, J. (1999).** Loquat : Botanique et horticulture. *Hort. Rev.*, **23**:233 - 276.
- ❖ **Lin, S. X., Huang J., Cuevas, J. and Janick. (2007).** Loquat: An ancient fruit crop with a promising future. *Chronica Hort*, **47** (2): 12-15.
- ❖ **Louati, S., Simmond, M. S. J., Grayer, R.J., Kite, C.G. and Damak, M. (2003).** Flavonoids from *Eriobotrya japonica* (Rosaceae) growing in Tunisia. *Biochemical Systematics and Ecology*, **31**: 99–10.

M

- ❖ **Maataoui, B. S., Hmyene, A. et Hilali, S. (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, **7**(1).
- ❖ **Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques de végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes*, p4-5.

- ❖ **Macheix, J.-J., Fleuriet, F. et Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*, p 134.
- ❖ **Madamanchi, N.R., Vendrov, A. and Runge, M.S. (2005).** Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **25**: 29-38.
- ❖ **Marc, F., Davin, A., Deglène-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., et Fritsch, P. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine Sciences*, **20**(4) : 458-463.
- ❖ **Marfak, A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat Université de Limoges. P 1-220.
- ❖ **Martin, S. et Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, **51**: 304-315.
- ❖ **Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. et Tuñón, M.J. (2002).** Los flavonoïdes: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp*, **17**: 271-278.
- ❖ **Matalaka, K.Z., Alsaadi, M.T., Qinna, N., Mallah, E., Awad, R. et al. (2012).** Enhancing Doxorubicin-Induced MCA-Fibrosarcoma Cytotoxicity by an *Eriobotrya japonica* Hydrophilic Butanol-Treated Extract through Natural Killer Cells Activation. *J Cancer Sci Ther S*, **18**: 1-6.
- ❖ **Mehinagic, E., Bourles, E. et Jourjon, F. (2011).** Composés des fruits d'intérêt nutritionnel : impact des procédés de transformation sur les polyphénols. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, **43**(6): 364-368.
- ❖ **Mesejo, C., Reig, C., Matinez-Fuentes, A., Agusti, M. (2010).** Parthenocarpic fruit production in Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) by using gibberellic acid. *Scientia Horticulturae*, **126**: 3741.
- ❖ **Middleton, JR. E., Kandaswami, C., and Theoharides, C.T. (2000).** The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **52**(4) : 673-751.
- ❖ **Miller, N.J. and Rice-Evans, C. (1997).** Factor influencing the antioxidant activity determined by the ABTS•+ radical cation assay. *Free Radical Biol. Med*, **26**: 195-199.

- ❖ **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, **26(2):**212-219.
- ❖ **Mukhopadhyay, S., Luthria, D.L. and Robbins, R. (2005).** Optimisation of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifugaracemosa*) by pressurized liquid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86(1):** 156-162.

N

- ❖ **Nakatsubo, F., Enokita, K., Murakami, K., Yonemori, K., Sugiura, A., Utsunomiya N. et Subhadrabandhu S. (2002).** Chemical structures of the condensed tannins in the fruits of *Diospyros* species. *J. Wood Sci.* **48.** p: 414-418.

O

- ❖ **Ohare, C.A. (2007).** La famille des radicaux libres. *Journal de la nutrition*, PP: 1-2. **20:**2-14.
- ❖ **Ojeil, A., ElDarra, N., ElHajji, Y., BouMouncef, B., Jrizk, T. et Gmaroum, R. (2011).** Identification et caractérisation de composés extraits du raisin chateau ksara. *Lebanese Science Journal*, **11:**117-131.
- ❖ **Opara, E.S. (2002).** Oxidative stress, micronutriments, diabetes mellitus and its complications. *Jof the Royal Soc for the promotion of Health*, **122:**28-34.
- ❖ **Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jannadass, R. and Simons, A. (2009).** *Eriobotrya japonica*, *Agroforestry Database*, **4:**1-5.
- ❖ **Oyedemi, S. et Afolayan, A.j. (2011).** In vitro and in vivo Antioxidant Activity of Aqueous Leaves Extract of *Leonotis (L.) R.Br.* *International Journal of Pharmacology*, **7(2):** 248-256.

P

- ❖ **Pamplona, R., Portero-Otin, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A. and Barja, G. (1999).** Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively

- correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mechanisms of Ageing and Development*, **112**: 169-183.
- ❖ **Papagiannopoulos, M. and Galensa, R. (2005).** Increased retention of polar flavonoids RP-HPLC on a polaris amide C18 column. *Application Food*: 12-13.
 - ❖ **Parihar, A., Parihar, M. S., Milner, S. et Bhat, S. (2008).** Oxidative stress and anti-Focus on antioxidant enzymes and antioxidant oxidative mobilization in burn injury. *Burns*, **34**: 6-17.
 - ❖ **Pervaiz, S. et Clement M.V. (2007).** superoxide anion: Oncogenic reactive oxygen species? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**:1297–1304.
 - ❖ **Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008).** Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of Biomedical Science*, **4**(2): 89-96.
 - ❖ **Phyu, P. K. Z., Kozue, S., Fumio, H., Akiko, M., Makoto, F., Koji, W. and De-Xing, H. (2014).** Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of loquat (*Eriobotrya japonica*) tea. *Journal of Functional Food S*, **6**: 523–533.
 - ❖ **Pietta, P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**(7): 1035-1042.
 - ❖ **Pincemail, J. (2004).** Comment évaluer votre état de stress oxydant. *J santé*. P: 2.
 - ❖ **Pincemail, J. et Defraigne, J.O. (2004).** Les antioxydantes : un vaste réseau de déférence pour lutter contre effet toxiques de l'oxygène.
 - ❖ **Pincemail, J., Defraigne, J. O., Meurisse, M. et Limet ,R. (1998).** Antioxydants et prévention des maladies cardiovasculaires, 2ème partie : la vitamine E. *MediSphere*.
 - ❖ **Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R. et Defraigne, J. O. (1999).** Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer. *Vaisseaux, Coeurs, Poumons*, **4**(4).
 - ❖ **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K et Defraigne, J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense anti-oxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**: 233-239.
 - ❖ **Powers, S.K., Smuder, A.J., Kavazis, A.N. and Hudson, M.B. (2010).** Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, **20**:2–14.
 - ❖ **Prior, R. L., Wu, X. et Schaich, K. (2003).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 4290-4302.

R

- ❖ **Rao, P. S., Kalva, S., Yerramilli, A. and Mamidi, S. (2011).** Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*, **1**: 2-7.
- ❖ **Ré, D. B., Nafia, I., Nieoullon, A., Le Goff, L. K. et Had-Aissouni, L. (2005).** Stress oxydatif cérébral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, **24** : 502-509.
- ❖ **Ribéreau-gayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Paris: Dunod. pp: 91-107.
- ❖ **Roberts, C.K. et Sindhu, K. K. (2009).** Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, **84**: 705–712.

S

- ❖ **Sachdev, S., Kelvin, J. A. et Davies. (2008).** Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, **44**: 215–223.
- ❖ **Saraf, S., Ashawat, M.S. et Saraf, S. (2007).** Flavonoids: A Nutritional Protection against oxidative and UV induced cellular damages. *Pharmacognosy Reviews*, **1**(1) : 30-40.
- ❖ **Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Edition TEC&DOC*. Paris. PP 2-3, 8-10.
- ❖ **Sayre, L.M., Moreira, P.I., Smith, M.A. and Perry, G. (2005).** Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità*, **41**(2):143-164.
- ❖ **Schofield, P., Mbugua, D. M. et Pell, A. N. (2001).** Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, **91**: 21-40.
- ❖ **Shafi, S. and Tabassum, N. (2013).** Phytochemical And Acute Toxicity Study of Eriobotrya japonica Seed Extract in Albino Mice. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **4** (1):202-205.
- ❖ **Shahi-Gharahlar, A., Reza, Y. A. and Khanali, M. (2009).** Mass and volume modeling of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl) fruit based on physical characteristics. *Journal of fruit and ornamental plant. Research*, **17**(2):175-189.

- ❖ **Sharma,P., Jha,A. B., Dubeyet, R. S. and Pessaraki, M. (2012).** Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 1-26.
- ❖ **Shimizu, H. (2004).**Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, *Stroke*, **35** (9) : 2072-2077.
- ❖ **Singleton, V.L. and Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**: 144-158.
- ❖ **Sohal, R.S., Mockett, R.J. and Orr, W.C. (2002).**Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radica. Biol. Med*, **33** (5): 575-86.
- ❖ **Stief, T.W.(2000).**The blood fibrinolysis/deep-sea analogy: a hypothesis on the cell signals singlet oxygen/photons as natural antithrombotics.*Thromb Res*,Vol **99**:1–20.
- ❖ **Stief, T.W. (2003).**The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth*,Vol **60**:567–572.

T

- ❖ **Takuhiko, U., Ayana, S., Nguyen, H. T., Tsukasa, F., Kenji, K., Shigeru, O., Hiroko, K., Osamu, M. and Yukihiro, S.(2013).** Anti-Proliferative Activities and Apoptosis Induction by Triterpenes Derived from *Eriobotrya japonica* in Human Leukemia Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci*, **14**: 4106-4120.
- ❖ **Tapas, A. R., Sakarkar,D. M. and Kakde, R. B. (2008).** Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **7** (3) : 1089-1099.
- ❖ **Terrier, N., Poncet-Legrand, C. et Cheynier,V. (2009).** Chapitre 9B Flavonols, Flavonols and Dihydroflavonols. *WineChemistry and Biochemistr*.
- ❖ **Tessier, F. et Marconnet, P. (1995).** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice.*Science & Sports*, **10** :1-13.
- ❖ **Tiqwari, A. K. (2001).** Imbalance in antioxidant defence and human diseases : Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Currentscience.*, **81**(9) : 1179-1181.
- ❖ **Tommasi , N., de Simone, Pizza, C.,Moore, P.S.,Orsi, N. and Stein, M.L.(1992).** Constituents of *Eriobotrya japonica* .*Journal of natural products*, **55**:125-1032.

- ❖ Tommasi, N., De Simone, F., Cirino, G., Cicala, C. and Pizza, C. (1991). Hypoglycemic effect of sesquiterpene glycoside and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica*. *Plantamedica*, **57**:414-416.
- ❖ Tonelli, N. et Gallouin, F. (2013). Les fruits et des graines comestibles du monde entier. *lavaisier SAS* :728.
- ❖ Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, **2**: 1231-1246.
- ❖ Tsao, R. et Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, **812**: 85- 99.

V

- ❖ Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M and Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**:1-40.
- ❖ Vansant, G. (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base. *Ed Institut Danone*.
- ❖ Vergely, C. et Rochette, L. (2003). Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Stress oxydant*, **3**(1) :131-9.
- ❖ Vergely, C., Goirand, F., Ecarnot-Laubriet, A., Renard, C., Moreau, J.-C. and Guillaud, D. (2003). NF- κ B activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. *Exper Biol and Med*, Vol 228: 855 - 865.
- ❖ Vertuani, S., Angusti, A. and Manfredini, S. (2004). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, **10**: 1677-1694.
- ❖ Vilan, D.M., Fernandez-Pachon, M.S., Moya, M.L., Traoncoso, A.M. et Garcia-Parrilla, M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. **71**: 230-235.
- ❖ Vilanova, S., Badenes, M.L.J., Martinez-Calvo, J. and Llacer, G. (2001). Analysis of loquat germplasm (*Eriobotrya japonica* Lindl.) by RAPD molecular markers. *Euphytica*, **121**:25-29.
- ❖ Vuorela, S. (2005). Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolics (dissertation). EKT series 1343. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology.

W

- ❖ **Wiernsperger, N.F. (2003).** Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab*, Vol 29:579-85.
- ❖ **Wolters, M., Hermann, S., Golf, S., Katz, N., Hahn, A. (2006).** Selenium and antioxidant. vitamin status of elderly German women. *Eur J Clin Nutr*, **60**(1): 85-91.
- ❖ **Woodward, A et Reed, G.-D.(1998).**Récapitulatif de la recherche sur les ligneux au CIPEA. Addis-Abeba, Ethiopie, **31**:3-4.

X

- ❖ **Xiao-Hong, X., Qing, S. and Zhi-He, Z. (2012).** Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **2**(3):238–240.

Y

- ❖ **Yanping, H., Yanchun, Q., Shunquan, L., Yueming, J. and Feng C. (2008).** Characterization of antioxidant compounds in *Eriobotrya fragrans* Champ leaf. *Scientia Horticulturae*, **118**: 288–292.
- ❖ **Yap, C.F., Ho, C.W., Aida, W.M., Chan, S.W., Lee, C.Y. and Leong, Y.S. (2009).** Optimization of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola L.*) residues. *Sains Malaysiana*, **38**(4): 511-520.

Z

- ❖ **Zhang, W., Zhao, X., Sun, C., Li, X. and Chen, K. (2015).** Phenolic Composition from Different Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) Cultivars Grown in China and Their Antioxidant Properties. *Molécules*, **20**:542-555.
- ❖ **Zheng, H.Z., Dong, H.Z. and Jing, J. (1998).** Modern Study and Application of traditional Chinese medicine. Xue Yuan Press, Beijing, 2767 PP.
- ❖ Site internet : (i) : www.papinier.valdere.

ANNEXES

Annexes

Annexe N°01 : Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tannins.

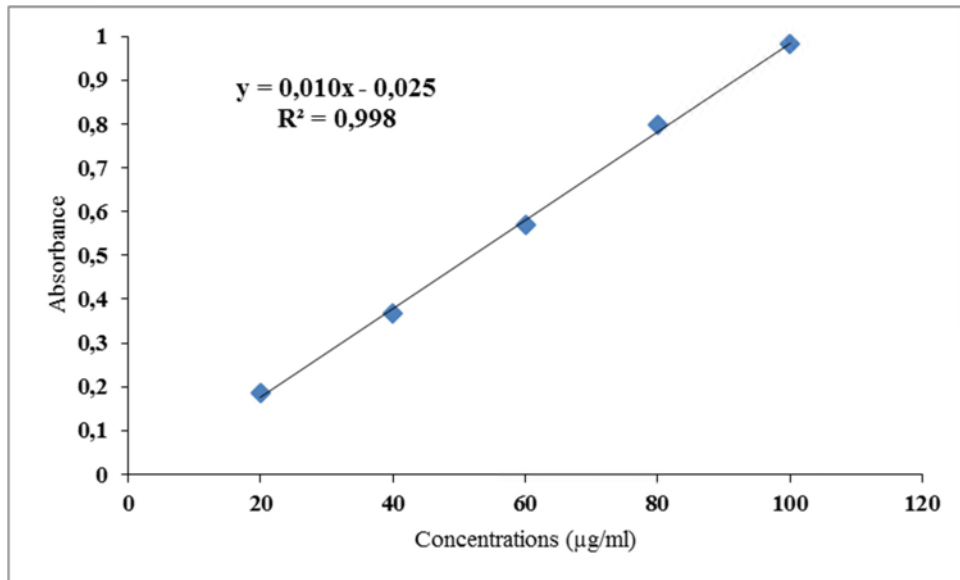


Figure 01 : courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ($\lambda = 765$ nm).

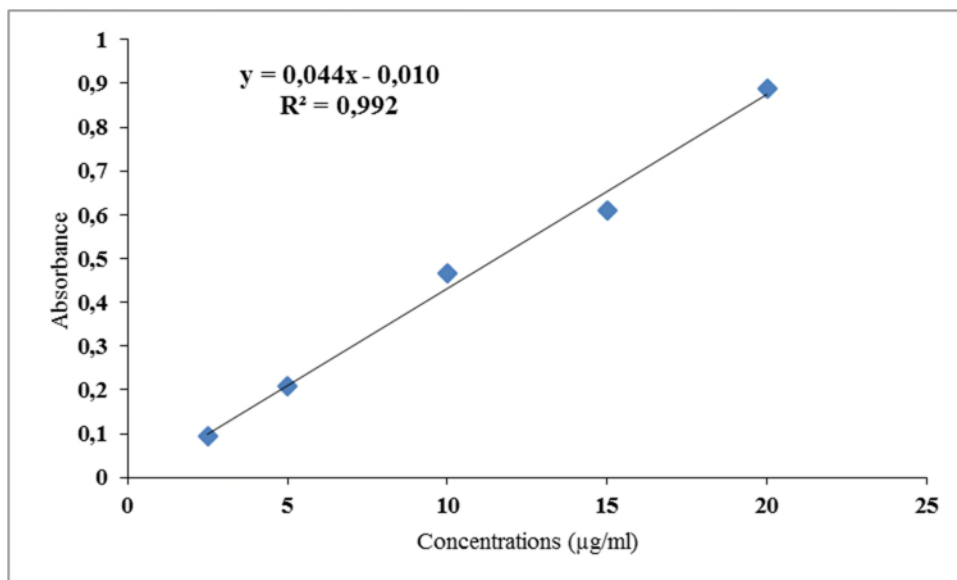


Figure 02 : courbe d'étalonnage avec la quercitrine pour le dosage des flavonoïdes ($\lambda = 430$ nm).

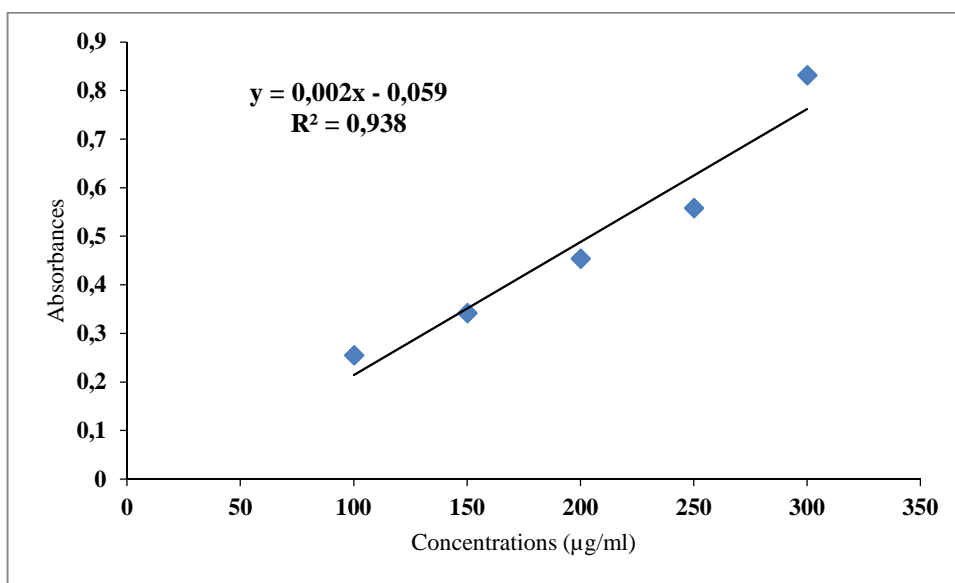


Figure 03 : courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des tannins ($\lambda=500$).

Annexe N° 2 : Courbe obtenues par l'origine 8 utilisées pour le calcul des IC₅₀.

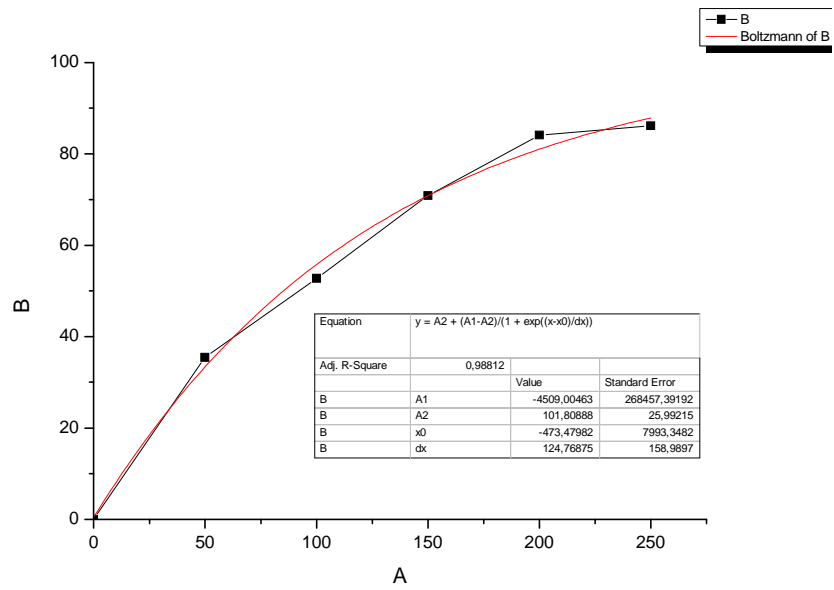


Figure 04 : Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* dans l'activité scavenging d'ABTS^{•+}.

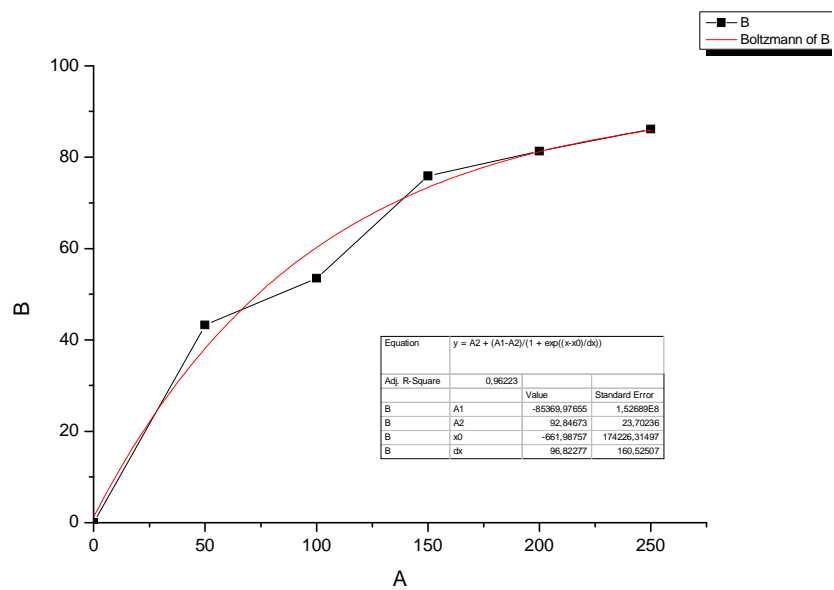


Figure 05 : Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait aqueux de chloroforme des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* dans l'activité scavenging d'ABTS^{•+}.

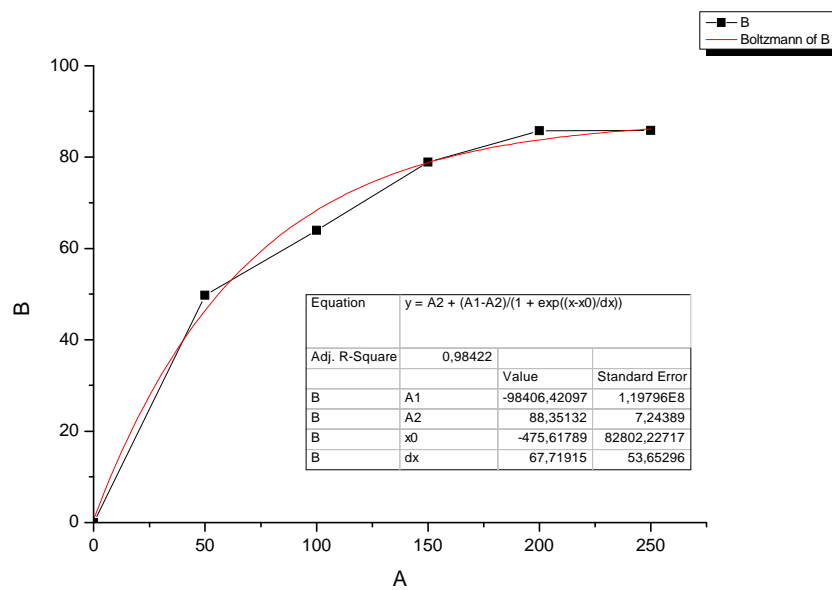


Figure 06 : Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait aqueux d'hexane des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* dans l'activité scavenging d'ABTS^{o+}.

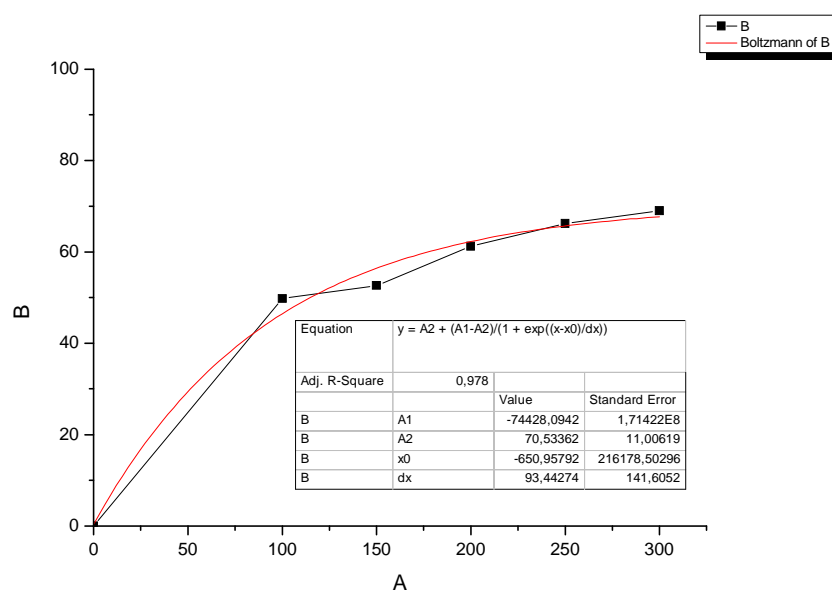


Figure 07 : Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait organique de chloroforme des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* dans l'activité scavenging d'DPPH^o.

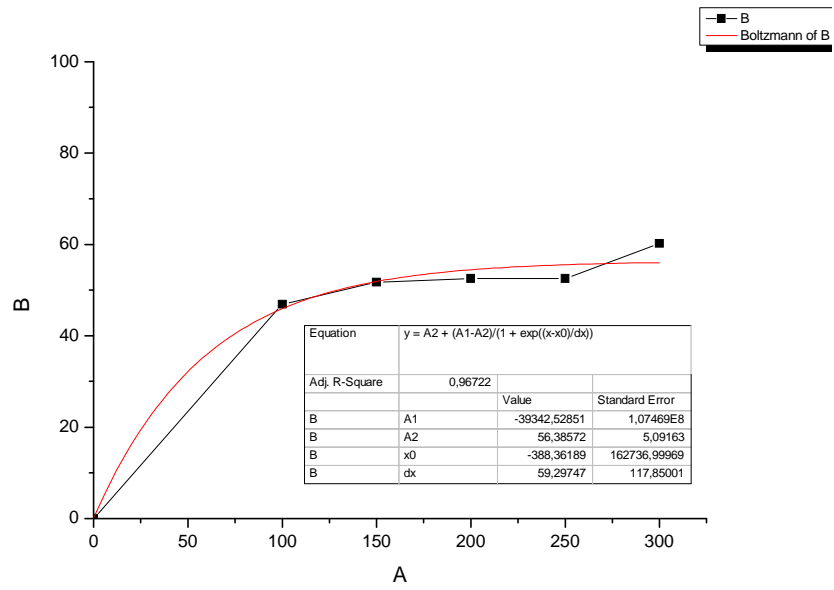


Figure 08 : Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait organique d'hexane des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L* dans l'activité scavenging d'DPPH°.

Annexe N° 03 : Courbe de corrélation des différentes activités avec les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et en tanins.

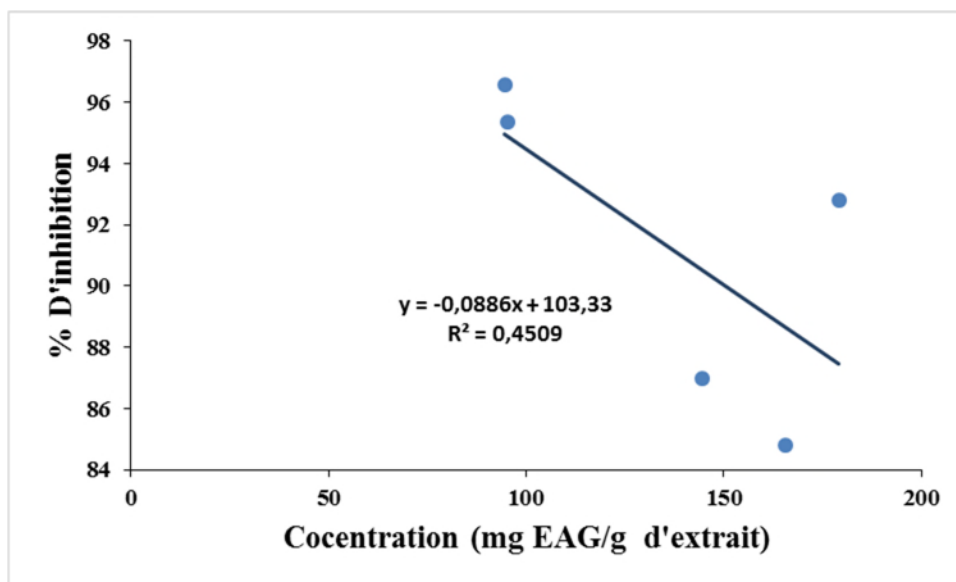


Figure 09 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH° et les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

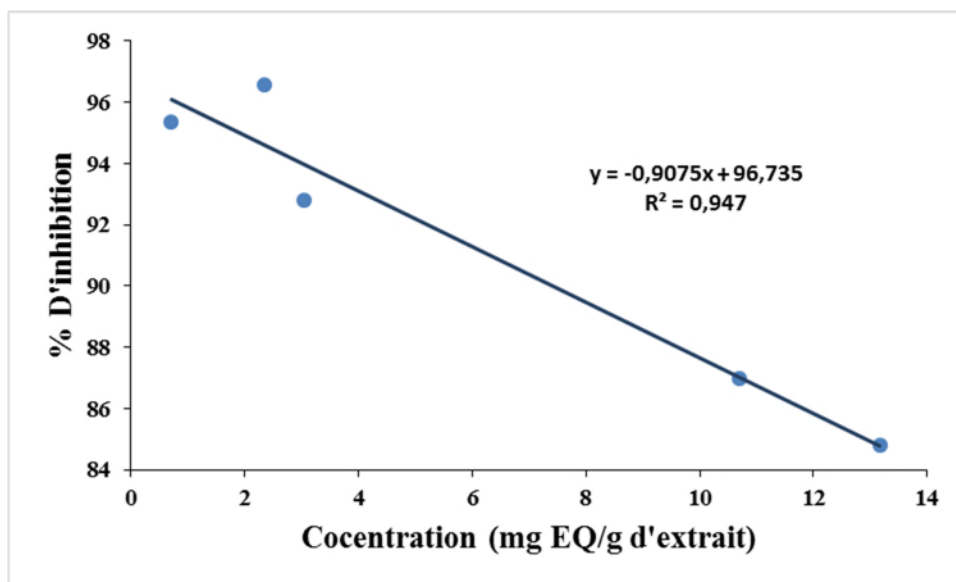


Figure 10 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH° et les teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

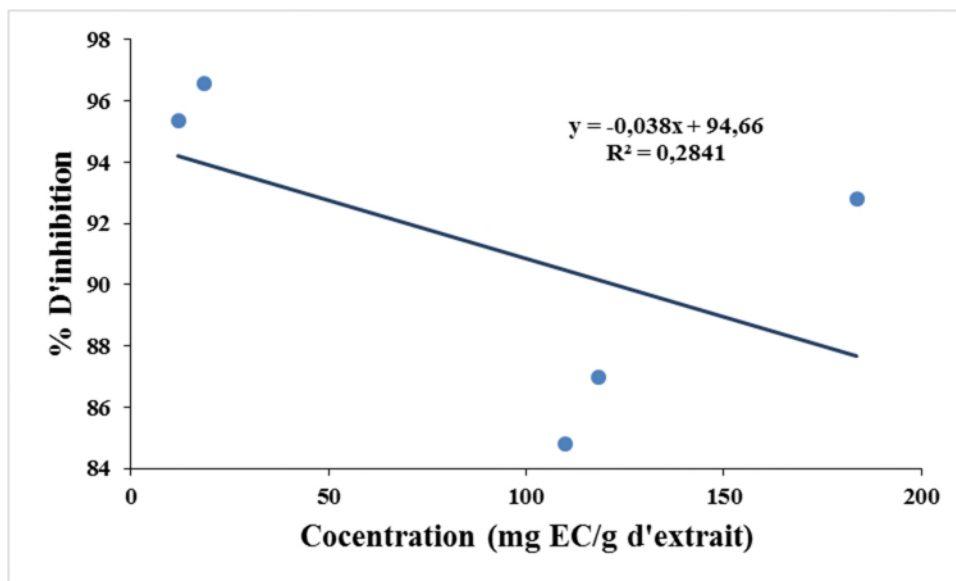


Figure 11 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH^o et les teneurs en proanthocyanidines des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

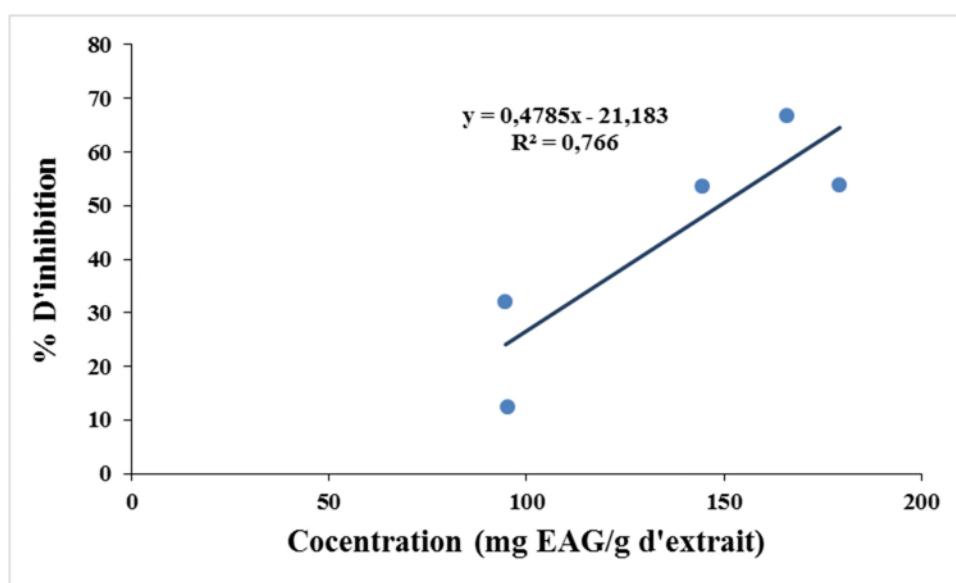


Figure 12 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS^{o+} et les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

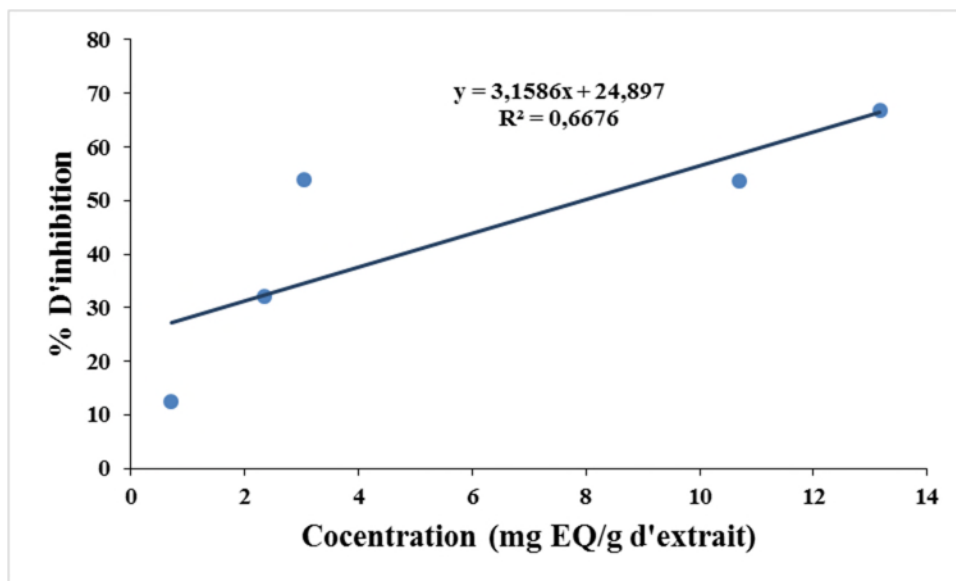


Figure 13 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical $ABTS^{\circ+}$ et les teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

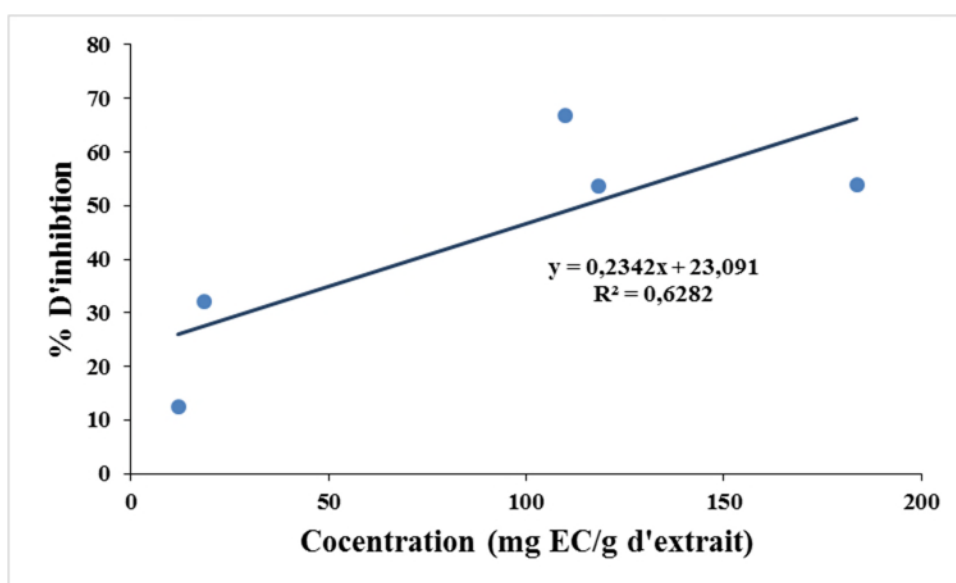


Figure 14 : Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical $ABTS^{\circ+}$ et les teneurs en proanthocyanidines des extraits des feuilles d'*Eriobotrya Japonica L.*

Résumé

Les antioxydants jouent un rôle fondamental dans l'élimination de l'excès toxique en espèces réactives de l'oxygène à l'origine de diverses maladies dégénératives. Ainsi, l'exploitation des molécules végétales naturelles serait très bénéfique pour la santé humaine. Par conséquent, on s'est intéressé à l'évaluation de l'activité anti-oxydante des composés phénoliques extraits à partir d'une plante médicinale locale, *Eriobotrya japonica L*, et cela en faisant deux types de manipulations, après, bien évidemment, avoir obtenu les différents extraits des feuilles de notre plante. D'abord, on a effectué le dosage des composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes, et tanins condensés) pour pouvoir faire une appréciation qualitative et quantitative ; puis, on est passé à la mesure de l'activité anti-oxydante des extraits en réalisant deux tests : l'activité scavenging du radical DPPH[•], ABTS^{•+}. On a clôturé notre étude par le fractionnement et la caractérisation de l'activité antioxydante des extraits par chromatographie sur couche mince. Les résultats expérimentaux ont révélé que les extraits d'*Eriobotrya japonica L* ont été riches en phénols totaux (95.33 ± 6.22 à 179.2 ± 2.66 mg EAG/g d'extrait) et en tanins condensés (12 ± 1.53 à 18377 ± 1.76 mg EC/g d'extrait) et ont montré des teneurs appréciables en flavonoïde. Quant aux activités antioxydantes de la plante, les extraits ont été de très bons scavengers du radical DPPH[•] (IC₅₀ = 114.91 µg/ml qui d'extrait organique du chloroforme et IC₅₀ = 129.14 µg/ml d'extrait organique d'hexane). L'activité ABTS^{•+} est forte ($12\% \pm 6.22\%$ à $66.88\% \pm 1.58\%$). Ces constatations nous laissent imaginer des études plus poussées sur des extraits d'une panoplie de plantes médicinales afin d'en bénéficier d'avantage.

Mot clé : *Eriobotrya japonica L*, radicaux libre, activité antioxydants, composés phénolique, CCM.

Abstract

The antioxidants play a basic role in the elimination of the toxic reactive oxygen species excess. Thus, the exploitation of natural plant molecules will be very beneficial for the human health. Therefore, we were interested by the evaluation of the anti-oxidant activity of the phenolic compounds extracted from our local medicinal plant, *Eriobotrya japonica L*, and that by doing two types of manipulations, of course, after getting the different plant leaves extracts. First, we quantified the phenolic compounds amounts (total phenolics, flavonoids, and condensed tannins), in order to make a qualitative and a quantitative assessment. Then, we realized the anti-oxidant activity assays such as : the DPPH[•] and ABTS^{•+} radical scavenging activity. Our study was fenced by the fractionation and the characterization of the antioxidant activity of the extract. The experimental results revealed that *Eriobotrya japonica L* extracts were rich in total phenolic (95.33 ± 6.22 à 179.2 ± 2.66 mg EAG/g for extract), showed moderate levels of flavonoids and they exhibited significant levels of condensed tannins (183.77 ± 1.76 à 12 ± 1.53 mg EC/g for extract) and they exhibited significant levels of flavonoids. As for the antioxidant activities of the plant, the extracts were very good scavengers of radicals DPPH[•] (the IC₅₀ of the leaves organics extract from chloroform (was 114,91 µg/ml), and the leaves organics extract from hexane (was 129,14 µg/ml). whereas, the ABTS^{•+} activity very good ($12\% \pm 6,22\%$ à $66,88\% \pm 1,58\%$). These observations lead us toward more studies in this field, so that we get more benefits from our local medicinal plants.

Key words: *Eriobotrya japonica L*, free radicals, antioxidants, phenolic compounds, TLC.

ملخص

مضادات الأكسدة تلعب دورا أساسيا في القضاء على أنواع رد الفعل الزائدة السامة للأكسجين المسؤولة عن العديد من الأمراض التنكسية. وبالتالي، فإن استخدام الجزيئات النباتية الطبيعية التي تكون مفيدة جدا لصحة الإنسان. ولذلك اعطينا أهمية لقياس النشاط المضاد لأكسدة المركبات الفينولية المستخلصة من النبات الطبي المحلي الزعرور. فلماذا قمنا بنوعين من التجارب بعدد الحصول على مقتطفات مختلفة لأوراق نباتنا. أولا قمنا بتحديد المركبات الفينولية (مجموع الفينول، مركبات الفلافونويد، والعفص مكثف) من أجل إجراء تقييم نوعي وكمي؛ ثم انتقلنا لقياس النشاط المضاد للأكسدة المستخلصات عن طريق إجراء اختبارين: النشاط المضاد للأكسدة المستخلصات بواسطة الفصل اللوني على طبقة رقيقة. اظهرت جذري، DPPH ABTS اغلقنا دراستنا بتجزئة وتوصيف النشاط المضاد لأكسدة المستخلصات بواسطة الفصل اللوني على طبقة رقيقة. اظهرت النتائج التجريبية ان مستخلصات الزعرور انها غنية بمجموع فينول (95.33 ± 6.22 ، 179.2 ± 2.66 mg EAG / ز استخراج) والعفص مكثف (183.77 ± 1.76 حتى 12 ± 1.53 ملغ م / ز استخراج) ومستويات عالية من الفلافونويد، اما بنسبة للنشاطات المضادة للأكسدة للمستخلصات النباتية فانها جيدة جدا من حيث الجذر DPPH ($IC_{50} = 114.91$) مل الذي العضوية استخراج الكلوروفورم و $IC_{50} = 129.14$ مل / مل من مستخلص الهكسان العضوي). و ABTS النشاط مرتفعا ($66.88\% \pm 1.58\%$ إلى $12\% \pm 6.22\%$). هذه النتائج دعونا نتخيل المزيد من الدراسات حول مقتطفات من مجموعة متنوعة من النباتات الطبية من أجل الحصول على ميزة.

الكلمات الرئيسية: الزعرور، الجذر الحر، النشاط المضاد للأكسدة، المركبات الفينولية، الفصل اللوني على طبقة رقيقة.