

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABDERRAHMANE MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie physico-chimique

Mémoire de Master

Filière: Biologie

Option: Génétique Appliquée

Thème

Caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* par Chromatographie sur couche mince

Réalisé par :

M^{elle} Abdelfettah Souhila

M^{elle} Lettat Saha

Membres du Jury :

Président : M^r Basli A.

Promotrice : M^{elle} Adrar S.

Examinatrices : M^{me} Abderrahim S.

M^{me} Bakdi H.

Grade et lieu :

M.A.A. (U.A.M.B)

M.A.B. (U.A.M.B)

M.A.A. (U.A.M.B)

M.A.A. (U.A.M.B)

Année Universitaire : 2012/2013

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.*

On exprime ensuite nos estime et nous remerciements à :

Mr Bassli A. 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} Abderrahim S. et M^{me} Bakdi H. Pour nous avoir fait l'honneur de juger ce modeste travail et de nous faire ainsi bénéficier de leurs compétences et de leurs connaissances.

Nos remerciements vont également aux techniciennes et attachées au laboratoire de Végétale et d'Ethnobotanique, et à tous, ceux qui nous ont aidés de près ou de loin a réalisé ce mémoire.

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

Dédicaces

J'adresse, surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à mes parents qui m'ont soutenu en toutes circonstances au cours de toutes mes années d'études, c'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect.

A mes très chers frères

A mes très chères sœurs

A mes très chères belles sœurs

A mes chères neveux : Yanis et Sami

A mes chères et adorables nièces: Anaïs et Asma

A tout ma famille

A ma promotrice M^{elle} Adrar S. que j'estime beaucoup.

A toi SAHRA ma chère binôme, merci pour tous les moments qu'on a passé ensemble, ainsi qu'a tout sa famille.

A mes très chères amis: Faiza, warda, Islem, yasmine, Lynda, Couca, Fatima, toutta et Hamida.

A toutes la promotion de génétique «2013»

A tous ceux que j'aime.

Souhila



Dédicaces

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,
j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A mon cher père qui ma appris le sens de la persévérance tout au long
de mes études, pour son sacrifice ses conseils et ses encouragements.*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère
qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son
sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*A ma très chère sœur Amanda
Ames frères : Nabil, Khaled et Yanis*

*A toutes la famille LETTAT d'Algérie et de France, en particulier mes
oncles et mes tantes Hadjira et Nora et Zhira.*

A vous mes adorables cousins et cousines.

A ma promotrice Melle Adrar S. que j'estime beaucoup.

*A toi SOUHILÀ que j'aime beaucoup ainsi qu'à toute ta famille, Je
n'oublierai jamais tous les moments mémorables qu'on a passé ensemble.*

*A toutes mes ami(e)s : Faiza, Warda, Islem, Lynda, Yasmine, Couca,
Fatima, touttou et Hamida, etc. et tous les autres que je m'excuse de ne pas
les avoir cité.*

A toute la promotion Génétique «2013».

A tous ceux que j'aime.

Sahra



Sommaire

Liste des figures

Liste des Tableaux

Liste des abréviations

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les radicaux libres et les anti-oxydants2

I-1- Définition.....2

I-2-Les espèces oxydantes en biologie.....2

I-2-1 Espèces réactives de l'oxygène.....2

I-2-2 Espèces réactives de l'azote.....3

I-3- Principales sources des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.....4

I-3-1 Sources endogènes..... 4

I-3-1-1 La mitochondries..... 4

I-3-1-2- La NADPH oxydase.....4

I-3-1-3- La xanthine oxydase.....5

I-3-1-4- Les ions métalliques.....5

I-3-1-5- L'oxyde nitrique synthase.....5

I-3-2- Sources exogènes.....6

I-4- Rôle physiologique des radicaux libres.....7

I-5 Le stress oxydatif.....7

I-5-1 Définition..... 7

I-5-2 Conséquences biochimiques du stress oxydant.....7

I-5-2-1 L'oxydation des lipides..... 8

I-5-2-3 L'oxydation des protéines.....9

I-5-2-2- L'oxydation de l'ADN.....9

I-6 Pathologies liées au stress oxydant.....10

II - Les antioxydants.....11

II-1- Définition.....11

II-2- Les systèmes de défense antioxydants.....	11
II-2-1- Systèmes antioxydants enzymatiques.....	11
II-2-1-1- La superoxyde dismutase (SOD).....	11
II-2-1-2- La catalase.....	12
II-2-1-3- Les glutathion peroxydase et réductase.....	12
II-2-2- Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	13
II-2-2-1- Les vitamines.....	13
II-2-2-2- Les composés phénoliques.....	15
II-2-2-2-1- définition et structure.....	15
II-2-2-2-2- Biosynthèse des polyphénols.....	16
II-2-2-2-3- Les principales Classe des composés phénoliques.....	16
II-2-2-2-3- 1- Les phénols simples et les acides phénoliques.....	16
II-2-2-2-3- 2- Les tannins.....	17
II-2-2-2-3- 3- Les flavonoïdes.....	18
II-2-2-2-3- 3- 1- Définition.....	18
II-2-2-2-3- 3- 2- Classification.....	18
II-2-2-2-4- Mécanismes antioxydants des polyphénols.....	19
II-2-2-2-4-1- Le piégeage direct des Radicaux libres.....	19
II-2-2-2-4-2- L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres.....	20
II-2-2-2-4-3- Chélation des ions métalliques.....	20
Chapitre II : Les plantes médicinales.....	22
I-Camellia sinensis.....	22
I-1- Historique.....	22
I-2- Description.....	22
I-3- Classification botanique.....	23
I-4- Composition biochimique.....	23
I-6- Usage thérapeutique.....	24
I-7- Propriétés biologiques.....	24
I-7-1- Activité anti-oxydante.....	24
I-7-2- Activités anticancéreuse.....	24
I-7-3- Activité antidiabétique.....	25

I-7-4- Prévention des maladies cardiovasculaires.....	25
I-7-5- Effet minceur.....	25
I-7-6- Effet revitalisant.....	25
II- <i>Laurus nobilis</i>.....	26
II-1- Historique.....	26
II-2- Description.....	26
II-3- Classification botanique.....	27
II-4- Composition biochimique.....	27
II-5- Usage thérapeutique.....	27
II-6- Propriétés biologiques.....	28
II-6-1- Activité anti-oxydante.....	28
II-6-2- Activité antibactérienne.....	28
II-6-3- Activité anticonvulsivante.....	28

Partie pratique

I- Matériels et méthodes.....	29
1- Cueillette de la plante.....	29
I-2- Séchage et broyage.....	29
I-3- Préparation des extraits.....	29
I-4- Dosage des composés phénoliques.....	31
I-4-1- Dosage des phénols totaux.....	31
I-4-2- Dosage des flavonoïdes.....	32
I-4-3- dosage des tanins condensés (Pro-anthocyanidines).....	32
I-5- Activités anti-oxydantes des extraits.....	33
I-5-1- Activité scavenging du radical DPPH.....	33
I-5-2- Activité scavenging du radical ABTS.....	34
I-5-3- Le pouvoir réducteur.....	35
I-6- Fractionnement et caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits par chromatographie sur couche mince.....	36
I-6-1- Fractionnement des extraits par chromatographie sur couche mince.....	36

I-6-2- Caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits par chromatographie sur couche mince.....	37
II-6-2-1-Caractérisation de l'activité scavenging du radical DPPH*.....	37
II-6-2-2-Caractérisation de l'activité inhibitrice du radical ABTS*+.....	37
II- Résultats et discussion.....	38
II-1- Extraction.....	38
II-2- Dosage des composés phénoliques.....	39
II-2-1-Dosage des phénols totaux.....	39
II-2-2- Les flavonoïdes.....	41
II-2-3- Les pro-anthocyanidines.....	42
II-3- L'activité anti-oxydante.....	43
II-3-1- L'activité scavenging du radical DPPH*.....	43
II-3-2- L'activité scavenging du radical ABTS*+.....	46
II-3-3- Le pouvoir réducteur.....	49
II-4- Fractionnement et caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits par chromatographie sur couche mince.....	50
II-4-1- Fractionnement des extraits par chromatographie sur couche mince.....	50
II-4-2- Caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits par chromatographie sur couche mince.....	56
II-4-2-1Caractérisation de l'activité scavenging du radical DPPH*.....	56
II-4-2-2-Caractérisation de l'activité inhibitrice du radical ABTS*+.....	58
Conclusion et perspectives.....	59
Références bibliographiques.....	61
Glossaire	
Annexes	

Liste des figures

Figure 01: Principales sources de radicaux libres	06
Figure 02 : Mécanismes en chaîne de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux	08
Figure 03: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire	09
Figure 04: Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyles avec une base de l'ADN, la guanine	10
Figure 05: Structure chimique de l'acide ascorbique (vitamine C)	13
Figure 06: Les formes variées de l'acide ascorbique (vitamine C) et sa réaction avec les radicaux R [•]	13
Figure 07: Structure chimique de la vitamine E ou α -tocophérol	14
Figure 08: Relation entre les vitamines E et C	14
Figure 09: Structure du β -carotène	15
Figure 10: Structure de base des (a) phénol simple, (b) L'acides hydroxybenzoïques, (c) L'acides hydroxycinnamiques	17
Figure 11: Les tannins hydrolysables	17
Figure 12: Les tannins condensés	18
Figure 13: Squelette de base des flavonoïdes	18
Figure 14: Piégeage des ERO (R [•]) par les polyphénols	19
Figure 15: Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me ⁺ⁿ)	21
Figure 16 : <i>Camellia sinensis</i> (fleurs).....	23
Figure 17 : Photographie d'une feuille de <i>Camellia sinensis</i>	23
Figure 18: Structure moléculaire de la caféine	24
Figure 19 : <i>Laurus nobilis</i> (fleurs)	27
Figure 20 : Photographie des feuilles de <i>Laurus nobilis</i>	27
Figure 21: Schéma d'extraction de <i>Camellia sinensis</i>	31
Figure 22: Schéma d'extraction de <i>Laurus nobilis</i>	32
Figure 23: Réaction de la vanilline avec les tanins condensés	33
Figure 24: Forme libre et réduite du DPPH	34
Figure 25 : Acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzthiazoline)-6-sulfonique) ABTS	34
Figure 26: Développement chromatographique d'une plaque.....	37

Figure 27: Teneurs en phénols totaux dans les extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i> et <i>Laurus nobilis</i>	39
Figure 28: Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i> et <i>Laurus nobilis</i>	41
Figure 29: Teneurs en pro-anthocyanidines dans les extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i> et <i>Laurus nobilis</i>	42
Figure 30: Les pourcentages de l'activité scavenging du radical DPPH [•] des extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i> et <i>Laurus nobilis</i> et des standards.....	44
Figure 31: Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH [•] en fonction de la concentration de la BHA et de l'Acide ascorbique.....	45
Figure 32: Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du DPPH [•] en fonction de la concentration en extrait éthanolique de <i>Camellia sinensis</i> et de <i>Laurus nobilis</i>	45
Figure 33: Les pourcentages de l'activité scavenging du radical ABTS ^{•+} des extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i> et <i>Laurus nobilis</i> et des standards.....	46
Figure 34: Activité scavenging du radical ABTS ^{•+} des différentes concentrations des extraits de <i>Camellia sinensis</i> et de <i>Laurus nobilis</i>	47
Figure 35: Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH [•] en fonction de la concentration en Trolox.....	48
Figure 36: Représentation graphique de l'absorbance de l'ion ferreux (Fe ²⁺) du pouvoir réducteur des extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i> et <i>Laurus nobilis</i>	49
Figure 37: Profile chromatographique à la lumière du jour des extraits des feuilles	51
Figure 38: Profile chromatographique sous UV des extraits des feuilles	52
Figure 39: Profile chromatographique des extraits des feuilles après pulvérisation a la vanilline sulfurique	54
Figure 40: Profile chromatographique des extraits des feuilles des deux plantes pulvérisés par la solution de DPPH	56
Figure 41: Profile chromatographique de la caractérisation de l'activité inhibitrice du radical ABTS ^{•+} des extraits des feuilles des deux plantes	58

Liste des tableaux

Tableau I : Les espèces réactives de l'oxygène.....	03
Tableau II : Les espèces réactives d'azote	03
Tableau III : Structures des catégories des flavonoïdes.....	19
Tableau IV : Les pourcentages d'extraction des extraits de <i>Camellia sinensis</i>	38
Tableau V: Les pourcentages d'extraction des extraits de <i>Laurus nobilis</i>	38
Tableau VI: Les IC50 de quelques extraits de <i>Camellia sinensis</i> et de <i>Laurus nobilis</i>	47
Tableau VII: Les rapports frontaux des différentes fractions visualisées sur le chromatogramme à la lumière du jour des extraits des feuilles de <i>Camellia sinensis</i> et de <i>Laurus nobilis</i>	50
Tableau VIII: Les couleurs des bandes des extraits sous UV et leur correspondance en composés phytochimiques.....	53
Tableau IX: Les couleurs des bandes des extraits après pulvérisation par la vanilline sulfurique.....	55

Liste des abréviations

ABTS: (acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzthiazoline)-6-sulfonique).

ADN: Acide Desoxyribo-nucléique.

ADNmt: ADN mitochondrial.

AlCl₃: Chlorure d'Aluminium.

AOX: Antioxydant.

ASC: Vitamine C.

ATP: Adénosine triphosphate.

β-CAR: β-carotènes.

BHA: Buty- Hydroxy- Anisol.

CCM: Chromatographie sur couche mince.

ClO⁻: Hypochlorite.

Cu- SOD: Superoxyde dismutase à cuivre.

CYP450: Cytochromes P450.

DPPH: 1,1- Diphényl- 2- Picryl- Hydrazyl.

EAG: Equivalent acide gallique.

EC: Equivalent catéchine.

EQ: Equivalent en quercétine.

EGCG: Epigallocatechine-3-gallate.

ERN: Espèce Réactive de Nitrogène.

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène.

Fe³⁺: Fer ferrique.

FeCl₃: Chlorure Ferrique.

Fe -SOD: Superoxyde dismutase ferreux.

H⁺: Hydrogène.

H₂O: Eau.

H₃PMo₁₂O₄₀: Acide phosphomolybdique.

H₃PW₁₂O₄₀: Acide phosphotungstique .

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance.

IC₅₀: Inhibition de la concentration.

GC-MS: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

GPx: Glutathion Peroxyde.

GSH: Glutathion avec la forme réduite.

GS[•]: Radical Thiyle.

GSSG: Glutathion.

M : Molaire.

Me⁺ⁿ: Ions métalliques.

Mn-SOD: Superoxyde dismutase à manganèse.

MRN: Résonance magnétique nucléaire.

NADP: Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate.

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate Hydrogenase.

NO[•] : Monoxyde d'azote.

NO₂[•]: Dioxyde d'azote.

O₂^{•-} : Anion superoxyde.

¹O₂: Oxygène singulet.

OH[•]: Radical Hydroxyle.

ONOO⁻: Anion peroxydrite.

P53: Facteur de transcription.

RF: Rapports frontaux.

RL: Radical Libre.

ROO: Radicaux hydroperoxydes.

ROOH: Hydroperoxydes organique.

SOD: Superoxyde dismutase.

TCA: Acide TrichloroAcétique.

T-OH: Vitamine E.

XO: Xanthine Oxydase.

Introduction

Introduction

Radicaux libres, espèces réactives de l'oxygène, stress oxydant et antioxydants sont devenus des termes familiers tant dans le monde médical que dans le grand public.

Les radicaux libres sont des molécules chimiques possédant un nombre impair d'électrons. Très instables, ils sont très réactifs vis à vis des biomolécules telles que les protéines, les lipides, et l'ADN, et par conséquent, ils peuvent causer des dommages irréversibles aux fonctions métaboliques et aux structures de ces substances (**Fang et al., 2002**).

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. Il semble donc intéressant de soutenir les défenses antioxydantes de l'organisme pour éviter cette rupture. Les défenses exogènes semblent les plus faciles à conforter puisqu'elles pourraient être renforcées. 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 (**Valko et al., 2007**).

Camellia sinensis et *Laurus nobilis* sont deux plantes médicinales qui appartiennent respectivement à la famille des Theaceae et des Laureaceae. Actuellement, ces deux plantes sont largement cultivées en Algérie comme plantes ornementales et comme ingrédients pour l'usage culinaire. Ces plantes ont aussi des applications importantes en médecine traditionnelle et représentent, un sujet de recherche intéressant (**yekhlef et al., 2011**).

Ainsi, ce travail consiste en premier temps à évaluer la composition phénolique et l'activité anti-oxydante des extraits des feuilles de *Camellia sinensis*, et de *Laurus nobilis*, afin d'établir des corrélations entre les différentes activités étudiées et les composés phénoliques. Nous allons aussi essayer de fractionner et caractériser les polyphénols présents dans les extraits de ces deux plantes par chromatographie sur couche mince.

Finalement, nous allons également essayer de caractériser le potentiel anti-radicalaire contre deux radicaux synthétiques le 1,1-Diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) et le 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) des extraits des deux plantes par chromatographie sur couche mince.

I-Synthèse
bibliographique

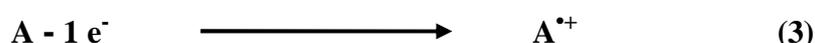
Chapitre I

Les radicaux libres et les
antioxydants

I-Les radicaux libres

I-1-Définition

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbite externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (Afonso *et al.*, 2007). Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox (réaction 1,2 et 3) (Galaris et Evangelou, 2002).



Du fait de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant un à une autre molécule: ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants (Poston et Raijmakers, 2004). Les radicaux libres possèdent un temps de demi-vie extrêmement court de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-6} seconde, ils ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules entraînant des phénomènes d'oxydation en chaîne, ce qui cause des lésions oxydatives des biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I-2-Les espèces oxydantes en biologie

Parmi les espèces réactives susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer principalement: les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote désignées aussi par l'abréviation (ERN) (Pham-Huy *et al.*, 2008).

I-2-1-Espèces réactives de l'oxygène

Les ERO désignent à la fois des espèces radicalaires de l'oxygène et des espèces non radicalaires. Ainsi, tous les radicaux oxygénés sont des ERO, mais tous les ERO ne sont pas des radicaux (Boek et Larcier, 2006).

Tableau I: Les espèces réactives de l'oxygène.

ERO	Symbole chimique	Propriétés
l'anion superoxyde	$O_2^{\bullet -}$	Radical, formé par la réduction monoélectronique de l'oxygène, peu réactif mais toxique (Lee et al., 2004).
le radical hydroxyle	OH^{\bullet}	L'espèce radicalaire la plus réactive de l'oxygène, a une demi-vie extrêmement courte d'environ 10^{-9} s et une capacité à diffuser restreinte, il est capable de réagir très rapidement avec la plupart des biomolécules (ADN, protéines et lipides) (Frei, 1994).
l'oxygène singulet	1O_2	Forme excitée de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Rózanowska et al., 1995).
Le peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	N'est pas un radical libre, mais peut en générer, en réagissant par exemple avec des métaux de transition pour former le OH^{\bullet} , peut diffuser à travers les membranes (Galaris et al., 2008).

I-2-2-Espèces réactives de l'azote

Les ERN possèdent à la fois des capacités oxydantes et nitrifiantes. Elles rassemblent à la fois des espèces radicalaires et des espèces non radicalaires (**Favier, 2003**).

Tableau II : Les espèces réactives de l'azote

ERN	Symbole chimique	Propriétés
Le monoxyde d'azote	NO^{\bullet}	Il diffuse rapidement à travers les membranes, remplit un rôle de vasodilatateur et de second messenger. Réagit très rapidement avec $O_2^{\bullet -}$ pour former l'anion peroxydinitrite (Barouki, 2006).
L'anion peroxydinitrite	$ONOO^-$	Non radicalaire, instable et très oxydant. Produit par les macrophages, les neutrophiles, et les mitochondries, il peut générer le radical dioxyde de l'azote (Lee et al., 2004).
Le dioxyde d'azote	NO_2^{\bullet}	Abondant dans les polluants de l'atmosphère, se formerait aussi <i>in vivo</i> par réaction entre NO^{\bullet} et O_2 . Il attaque les doubles liaisons des acides gras non-saturés (Devasagayam et al., 2004).

I-3-Principales sources des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

I-3-1-Sources endogènes

Certaines de ces productions sont volontairement programmées par l'organisme à des fins de défense ou de transduction du signal (figure 1) (**Droge, 2002**).

I-3-1-1-La mitochondrie

La mitochondrie est considérée comme la source majeure de production cellulaire de radicaux libres ; 95% de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente, conduisant à la production de molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses multiples fonctions. Cette réaction est catalysée par la cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane mitochondriale interne (**Favier, 2003; Ré et al., 2005**).



Le processus n'est toutefois pas parfait car une faible proportion de l'oxygène (2 à 5%) subit une réduction monoélectronique conduisant à la formation du radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (**Gardès-Albert et al., 2003**).



I-3-1-2-La NADPH oxydase

C'est une oxydase liée à la membrane plasmique des macrophages et des polynucléaires, où elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire, dans la lutte contre les micro-organismes et la destruction du matériel phagocyté (**Droge, 2002**). La NADPH oxydase représente également une source majeure de production du radical superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) à l'origine de la formation de molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite (ClO^-) (**Fontaine et al., 2002; Thannickal et Fanburg, 2000**).



I-3-1-3-La xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme responsable de la dégradation des bases puriques. Elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique et génère le radical $O_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 (Vergely et Rochette, 2000; Marfak, 2003).

**I-3-1-4-Les ions métalliques**

Les ions métalliques, en particulier le fer Fe^{2+} , génèrent en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) des radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}) très réactifs par une réaction appelée réaction de Fenton. Ce dernier est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines, formant parfois d'autres radicaux libres (Vergely et Rocheyye, 2003; Ahmad, 1995).



L'anion superoxyde permet aussi de reformer le fer ferreux à partir du fer ferrique :



Globalement, cette suite de réactions est appelée cycle d'HABER-WEISS :

**I-3-1-5-L'oxyde nitrique synthase**

Le monoxyde d'azote NO^{\bullet} est principalement produit par un système enzymatique sous l'action d'oxyde nitrique synthase (NO synthétase), qui transforme l'arginine en citrulline en présence de NADPH et d' O_2 (Sennequier et al., 1998).



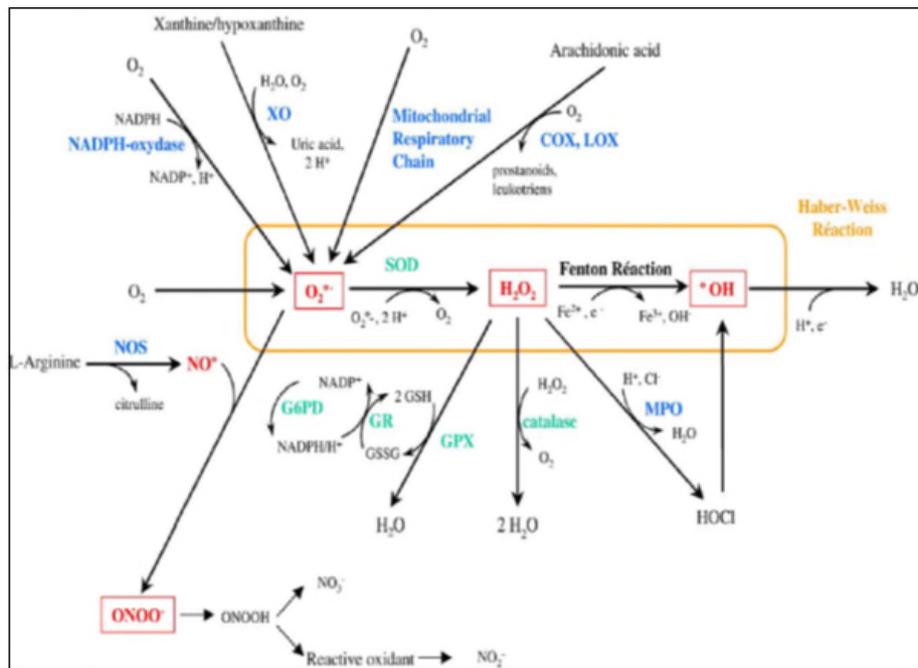


Figure 1: Principales sources de radicaux libres (Margail *et al.*, 2005).

I-3-2-Sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression par différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres (Favier, 2003):

- L'éthanol est métabolisé par le CYP450, ce qui conduit à la production de radicaux libres: l'alcool provoque donc un stress oxydant au niveau du foie. L'alcool pourrait aussi diminuer l'activité des enzymes antioxydante (Schisler et Singh, 1989; Milane, 2004).
- Des molécules toxiques telles que l'oxyde d'azote (NO^\bullet) et le dioxyde d'azote (NO_2), présents dans notre environnement (tabac, goudron, polluants industriels), participent à la genèse de radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (Pincemail *et al.*, 1998).

- Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux, qu'il s'agisse des rayons X, gamma, ou des rayons ultraviolets, ils sont capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) après activation de photosensibilisants (**Beani, 1995**).

I-4-Rôle physiologique des radicaux libres

Les radicaux libres sont les produits naturels du métabolisme cellulaire. A des niveaux physiologiques ils exercent des actions essentielles telles que la transduction du signal, la transcription des gènes et l'apoptose, la phagocytose, la respiration (**Delattre et al., 2005**).

Il est bien établi que le NO est une molécule de signalisation clé, il favorise la relaxation endothéliale et régule le tonus vasculaire. En outre, le NO produit par les neurones sert de neurotransmetteur, et celui produit par les macrophages activés est un médiateur important de la réponse immunitaire (**Yun-Zhong Fang et al., 2002; De Moffarts et al., 2005**).

Cependant, la production en quantité excessive de radicaux libres sur une période prolongée risque de provoquer un déséquilibre de la balance en pro-oxydant et anti-oxydant ce qui provoque ensuite l'oxydation des biomolécules (**Pincemail, 1999**).

I-5-Le stress oxydatif

I-5-1-Définition

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre prononcé entre la production des pro-oxydants et les systèmes de défense (antioxydants), en faveur des premiers avec comme conséquence l'apparition de dégâts irréversibles pour la cellule (**Defraigne et Pincemail, 2007; Sorg, 2004**). 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; Barouki, 2006**).

I-5-2-Conséquences biochimiques du stress oxydant

En plus des fonctions biologiques, les espèces réactives possèdent des propriétés toxiques importantes et diversifiées. En effet, toutes les macromolécules cellulaires sont des cibles potentielles (**Favier, 2006**).

I-5-2-1-L'oxydation des lipides

Les lipides, en particulier les acides gras polyinsaturés, sont la cible privilégiée des radicaux libres par une réaction appelée peroxydation lipidique: c'est une réaction en chaîne initiée par l'arrachement d'un atome d'hydrogène par HO^\bullet ou $\text{O}_2^{\bullet-}$ à des esters d'acides gras insaturés (Figure 2). Le radical carboné du constituant lipidique tend alors à se stabiliser par un réarrangement conduisant au diène conjugué. La phase de propagation débute lorsqu'une molécule d' O_2 attaque le radical acide gras, pour former un radical peroxyde lui-même susceptible d'arracher un atome d'hydrogène à un autre acide gras. Un nouveau radical lipidique est ainsi généré (Tweeddale *et al.*, 2007; Gardès-albert *et al.*, 2003).

Cette lipoperoxydation des membranes va altérer leur fonctionnalité (modification de leur perméabilité, de leur fluidité, perte d'activité d'enzymes, de récepteurs,...) dont la composition en acides gras insaturés module l'oxydabilité (Marnett, 1999).

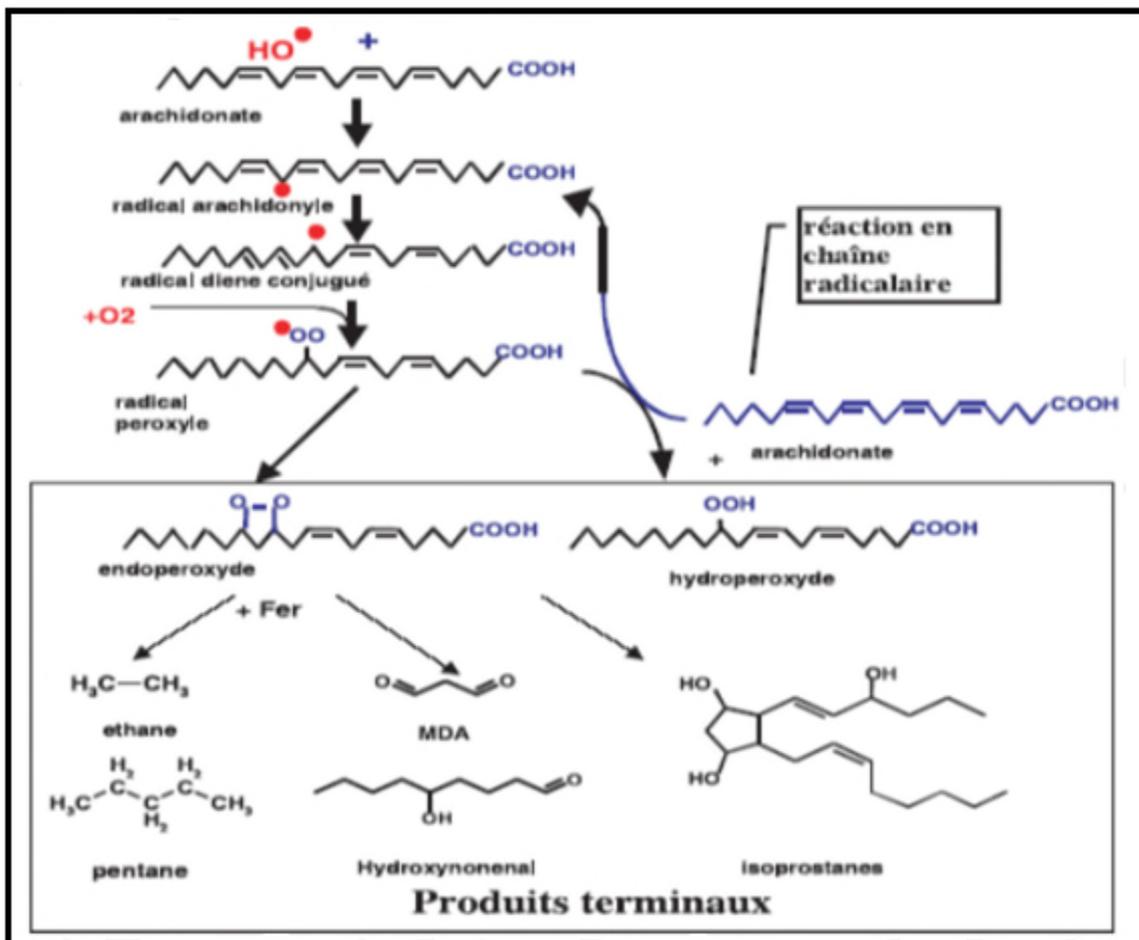


Figure 2 : Mécanismes en chaîne de la peroxydation lipidique et ses produits terminaux (Favier, 2003).

I-5-2-2-L'oxydation des protéines

Les protéines sont des constituants cellulaires structuraux et fonctionnels, essentiels, qui peuvent subir des modifications oxydatives. L'oxydation des acides aminés, surtout les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane), entraîne des modifications structurales des protéines, facilitant de ce fait leur agrégation ou leur digestion par les protéases (Figure 3) (Jung *et al.*, 2007).

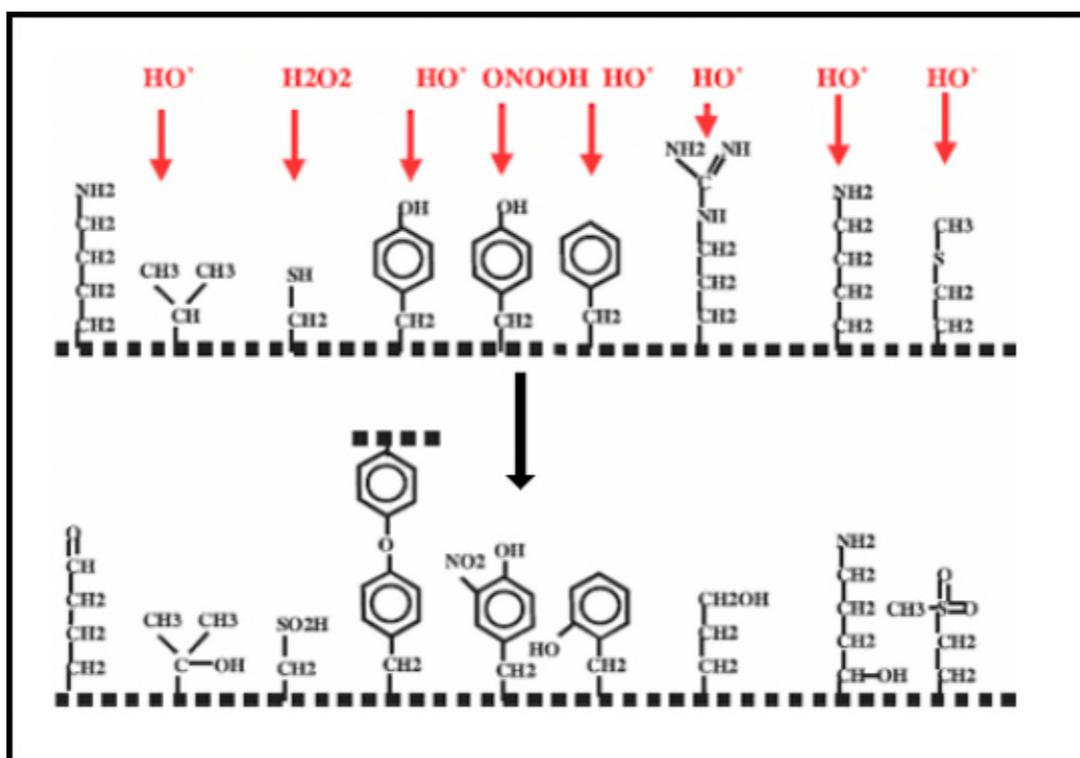


Figure 3: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

I-5-2-3-L'oxydation de l'ADN

Il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Au minimum, cinq classes principales de dommages oxydatifs peuvent être générées, parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2002).

Le radical OH^\bullet est le plus réactif envers les bases azotées et les sucres des acides nucléiques. Par exemple, la guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres.

Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Figure 4) (Baudin, 2006; Favier, 2003; Valko *et al.*, 2006).

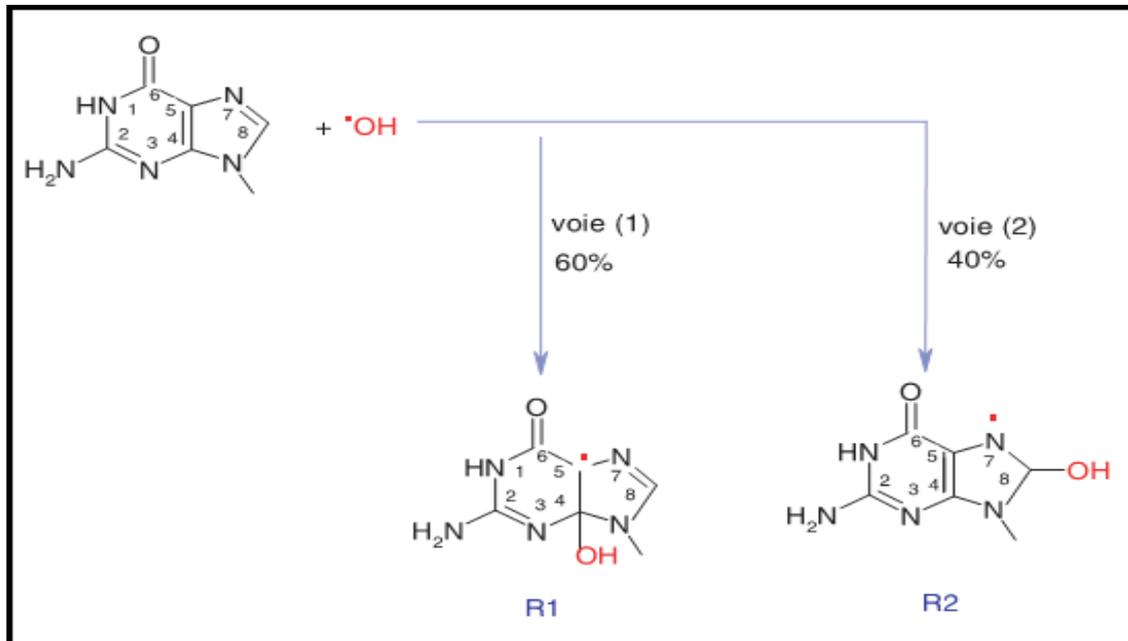


Figure 4: Illustration d'un mode d'action des radicaux hydroxyyles avec une base de l'ADN, la guanine (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

I-6-Pathologies liées au stress oxydant

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses maladies :

- Ainsi la relation entre stress oxydant et cancer s'avère très étroite. Les radicaux libres interviennent dans l'activation des procarcinogènes en carcinogènes, créent des lésions de l'ADN, amplifient les signaux de prolifération et inhibent les antioncogènes comme P53 (Favier *et al.*, 2006).
- Le vieillissement: les radicaux libres peuvent induire des lésions sur de multiples cibles de la cellule et de la matrice extracellulaire: sur l'ADN (mutations de l'ADN nucléaire ou mitochondrial, raccourcissement des télomères), sur les protéines (notamment formation d'agrégats amyloïdes non dégradables) et les glycoprotéines, sur les lipides et sur les glucides. Le vieillissement peut alors être compris comme une accumulation de lésions oxydatives (Roussel et Ferry, 2002).

- La sclérose latérale amyotrophique: maladie neurodégénérative qui peut être causée par la présence d'une mutation gain de fonction dans le gène de l'enzyme anti-oxydante la superoxyde dismutase SOD-1 situé sur le chromosome 21, induisant un stress oxydatif (**Harraz et al., 2008**). Ce qui peut aussi expliquer le vieillissement précoce chez les sujets trisomiques (1,5 fois supérieur à la normale) (**Rosen, 1993 ; De La Torre, 1996**).

- Le stress oxydatif est associé aussi à beaucoup d'autres maladies telles que : la cataracte, l'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le diabète et les maladies cardio-vasculaires (**Beal, 1995; Liu, 2003**).

II- Les antioxydants

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'espèces réactives, désignés par le terme "antioxydant" (**Kunwar et Priyadarsini, 2011**).

II-1- Définition

Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (**Young et Woodside, 2001; Salvayre et Salvayre, 2005**). Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, enzymatiques aux propriétés catalytiques spécifiques ou non enzymatique (**Kaliora et al., 2006**).

II-2- Les systèmes de défense antioxydante

II-2-1- Systèmes anti-oxydants enzymatiques

II-2-1-1- La superoxyde dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métallo-enzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène, composés stables et moins toxiques (**Frank et al., 2004; Matés et Sánchez-Jiménez, 1999**).

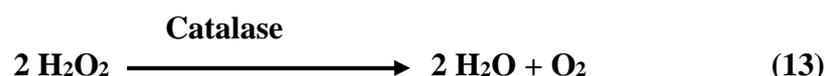


Chez les mammifères, on distingue dans cette famille trois isoenzymes qui catalysent la même réaction mais diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire: la SOD ferreux (Fe-SOD), la SOD à cuivre (Cu-SOD) et la SOD à manganèse (Mn-SOD) (**Zelko et al., 2002; Menvielle-Bourg, 2005**).

II-2-1-2-La catalase

C'est une enzyme tétramérique, dont chaque unité porte une molécule d'hème et une molécule de NADPH qui augmentent son efficacité et le protègent contre l'inactivation. Elle est principalement présente dans les hématies et les peroxysomes (**Goudable et Favier, 1997; Chelikani et al., 2004**).

La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène (**Matés et al., 1999**) :



II-2-1-3-Les glutathion peroxydase et réductase :

La glutathion peroxydase (GPx) est une enzyme qui assure la décomposition du peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau et des hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcool, en utilisant le glutathion réduit comme donneur d'hydrogène. Elle est constituée de quatre sous-unités contenant chacune un résidu sélénocystéine qui constitue le site actif de l'enzyme. Elle se situe principalement dans le cytosol et les mitochondries (**Delattre et al., 2005**).

Le glutathion oxydé sera régénéré grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui agit par oxydation du NADPH, H⁺ (**El Abed et al., 2009; Deneke et Fanburg, 1989**).



II-2-2-Systèmes antioxydants non enzymatiques

II-2-2-1-Les vitamines

❖ La vitamine C

La vitamine C ou l'acide ascorbique est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra et extracellulaires. Ses activités biologiques viennent de son puissant potentiel réducteur (Figure 5) (Padayatty *et al.*, 2003). Alors que la plupart des mammifères sont capables de la synthétiser, la majorité des primates dont l'être humain en sont incapables. Ils doivent donc l'amener dans leur alimentation (Hamid *et al.*, 2010).

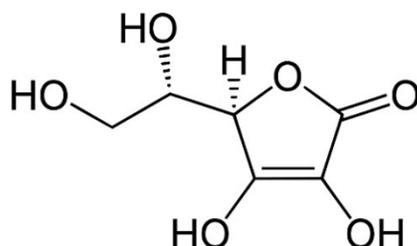


Figure 5: Structure chimique de l'acide ascorbique (vitamine C) (Adrian *et al.*, 1995).

L'acide ascorbique est un donneur d'atome d'hydrogène H qui réagit avec les radicaux libres OH[•] et O₂^{•-}, les transforme en molécules non toxiques (Allain, 2000-2005). Le mécanisme d'action de la vitamine C est schématisé dans la figure n° 6 qui suit :

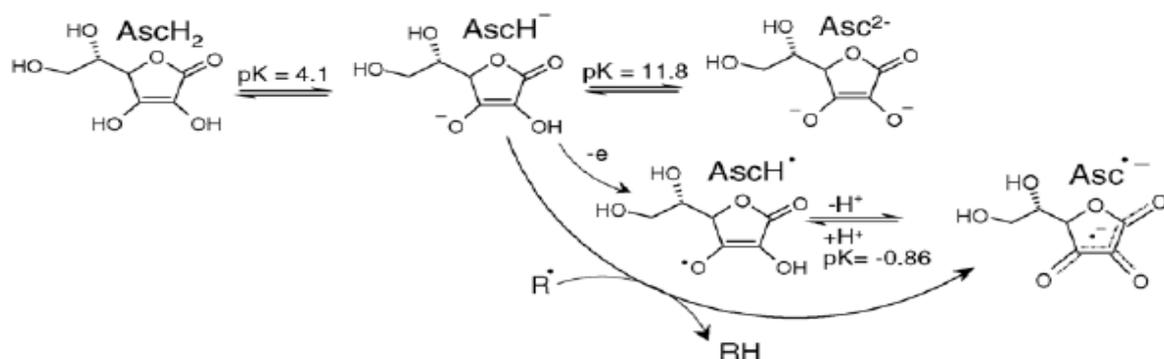


Figure 6: Les formes variées de l'acide ascorbique (vitamine C) et sa réaction avec les radicaux R[•] (Valko *et al.*, 2006).

❖ La vitamine E

La vitamine E ou l' α -tocophérol est liposoluble. Elle intervient directement au niveau des membranes biologiques et inhibe ainsi la propagation de la peroxydation. Grâce à sa régénération, une molécule d' α -tocophérol pourra réagir plusieurs fois en tant qu'antioxydant inhibant la peroxydation lipidique (Figure 7) (Ré et al., 2005; Maeda et al., 2005; Pekiner, 2003).

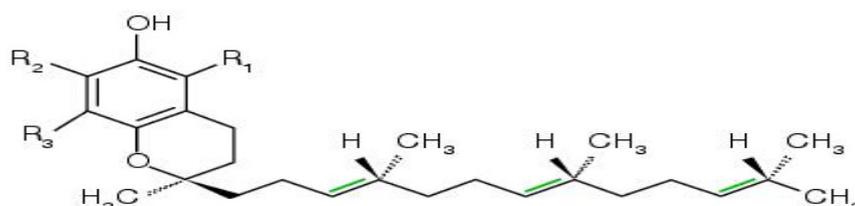


Figure 7: Structure chimique de la vitamine E ou α -tocophérol (Cuvelier, 2003).

➤ Interactions entre vitamine C et vitamine E

Par interaction avec un radical lipidique R^\bullet , la vitamine E (T-OH) se transforme en un radical tocophéryle (T-O $^\bullet$). Ce dernier est régénéré en T-OH sous l'action de la vitamine C (Asc) qui, à son tour, prend une forme radicalaire (Asc $^\bullet$). Le glutathion réduit (GSH) permet de régénérer la vitamine C en se transformant en un radical thiyle (GS $^\bullet$) qui, par réaction avec lui-même, donne du glutathion oxydé (GSSG) (Pincemail et al., 1998 ; Guillard, 2011).

Le mécanisme de la régénération de la vitamine E et C est schématisé dans la figure n° 8 qui suit :

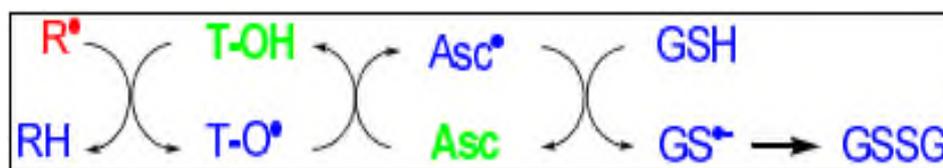


Figure 8: Relation entre les vitamines E et C (Pincemail et al., 1998).

❖ Le β carotène

Le β -carotène, qui constitue une provitamine A, est un antioxydant liposoluble apporté par l'alimentation. Ce sont les molécules les plus efficaces pour piéger l'oxygène sous sa forme singulet selon la réaction (16). L'énergie d'excitation de l'oxygène singulet est transférée vers le pigment, elle est ensuite dissipée au niveau des doubles liaisons conjuguées (Sergio et al., 1999; Costantini et Moller, 2008).



Les β -carotènes (β -CAR) peuvent également neutraliser les radicaux peroxydes ($\text{ROO}\cdot$) en donnant un cation radicalaire ($\text{CAR}^{\bullet+}$) et bloquent ainsi la réaction de peroxydation Lipidique en chaîne au niveau des membranes cellulaires selon la réaction suivante:



Les β -carotènes assurent l'intégrité de la peau et des muqueuses ainsi que de la vision, notamment par leur effet protecteur vis-à-vis des radiations solaires (UV) (Figure 9) (Ringer, 1991; Guillard, 2011).

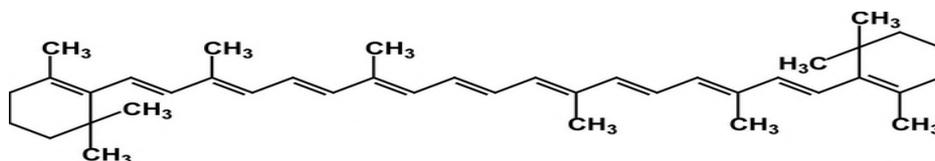


Figure 9: Structure du β -carotène (Gervaise, 2004).

II-2-2-2-Les composés phénoliques

II-2-2-2-1-définition et structure

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux très répandus dans le règne végétal, essentiels dans la contribution à la couleur et au goût des fruits et végétaux, et dans l'interaction avec leur environnement. Ce sont des éléments importants de la médecine traditionnelle chinoise et de la phytothérapie pour leurs divers effets pharmacologiques (Xu et al., 2007; Milde et al., 2004).

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, libres ou engagées dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) (Kasote, 2013).

II-2-2-2-Biosynthèse des polyphénols

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales :

➤ **La voie de l'acide shikimique :**

Elle s'effectue dans le chloroplaste. Le phosphoénolpyruvate et l'erythrose-4-phosphate sont convertis après condensation et au bout de plusieurs réactions enzymatiques en chorismate qui donne naissance aux acides aminés aromatiques (tyrosine et phénylalanine), dont la désamination conduit aux acides cinnamiques, précurseurs de la majorité des acides phénoliques (**Herrmann, 1995; Weaver et Herrmann, 1997**).

➤ **La voie de polyacétate :**

Cette voie permet la cyclisation des chaînes polycétoniques obtenues par condensations répétées d'unités acétate pour former un ensemble de noyaux aromatiques, à l'origine de divers composés tels que les flavonoïdes et les quinones (**Richter, 1993**).

II-2-2-3-Les principales classes des composés phénoliques

Il existe une classification des composés phénoliques qui se base sur la complexité de leur squelette carboné de base. Ils regroupent Plus de 8000 structures phénoliques, et comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins (**Dai et Mumper, 2010 ; Mamoudou et al., 2006**).

II-2-2-3-1-Les phénols simples et les acides phénoliques

Les phénols simples désignent les composés ayant un seul cycle phénolique monosubstitué (**Bruneton, 1993**).

Les acides phénoliques sont des composés possédant une fonction acide carboxylique en plus de la fonction phénols (**Shahriar, 2010**).

Deux classes d'acides phénoliques peuvent être distinguées en fonction de leur structure:

- Les acides hydroxybenzoïques: ils ont une structure générale de base de type C6-C1 et dérivent de l'acide benzoïque, comme l'acide gallique et l'acide protocatéchique (**Lai et al., 2013**).
- Les acides hydroxycinnamiques: de structure générale de base de type C6-C3, ils dérivent de l'acide cinnamique. Ils se composent principalement de l'acide coumarique, caféique et férulique (**Macheix et al., 2006**).

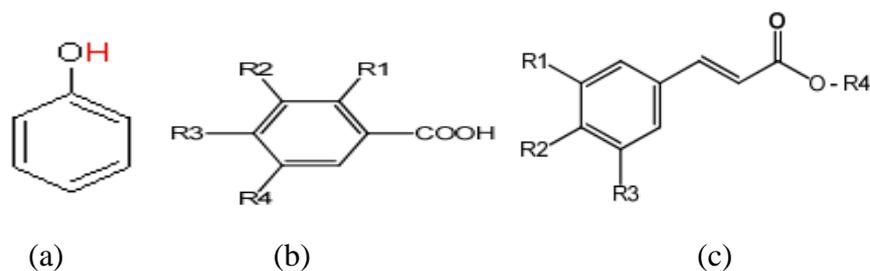


Figure 10: Structure de base des (a) : phénols simples, (b) : acides hydroxybenzoïques, (c) : acides hydroxycinnamiques (Handique et Baruah, 2002).

II-2-2-2-3-2-Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles, capables de se lier à des protéines en solution et de les précipiter. On distingue classiquement deux grands groupes de tannins: les tannins condensés et les tannins hydrolysables (Bossu *et al.*, 2006).

- **Les tannins hydrolysables:** ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique pour donner une fraction glucidique ou polyalcoolique et des acides carboxyphénoliques (acide gallique, acide ellagique) (Figure 11) (Khanbabae *et Ree*, 2001).

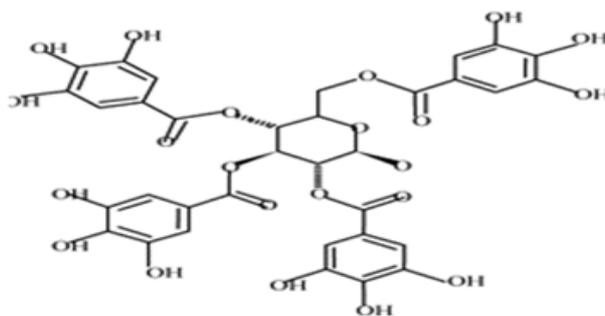


Figure 11: Les tannins hydrolysables (Sereme *et al.*, 2010).

- **Les tannins condensés:** ou pro-anthocyanidines, elles résultent de la condensation d'oligomères ou de polymères de flavanes (flavanes-3-ol, flavane-4-ol, flavane -3,4 diol). Ils dérivent de la catéchine ou de ses nombreux isomères. Ils sont résistants à l'hydrolyse la structure des tannins condensés est illustré dans la figure n° 12 (Rahim *et al.*, 2008).

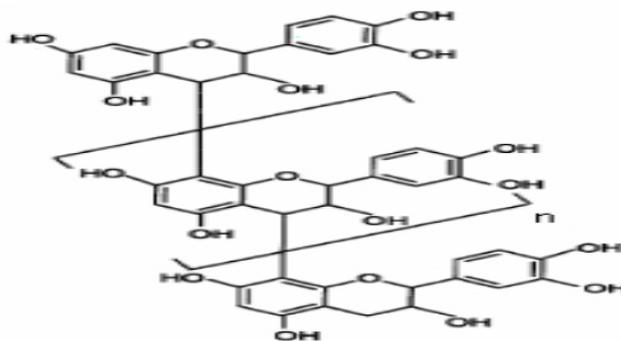


Figure 12: Les tannins condensés (Sereme et al., 2010).

II-2-2-2-3-3-Les flavonoïdes

II-2-2-2-3-3-1-Définition

Ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels, ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux. Tous les flavonoïdes possèdent le même élément structural de base, à savoir deux noyaux aromatiques (A et B) et un hétérocycle oxygéné (C) (figure 13) (Balasundram et al., 2006; Tsao et Deng, 2004).

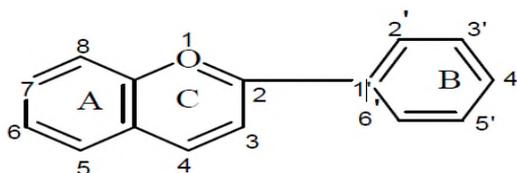
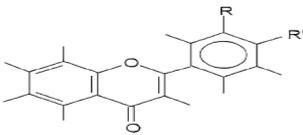
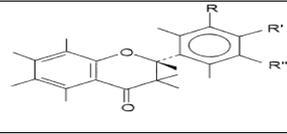
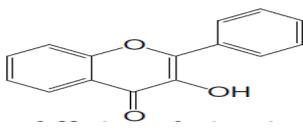
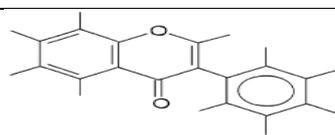
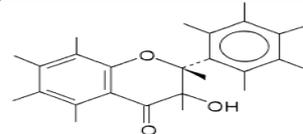
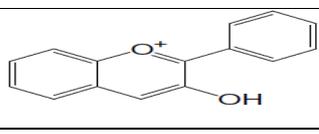


Figure 13: Squelette de base des flavonoïdes (Saraf et al., 2007).

II-2-2-2-3-3-2-Classification

Des substitutions (l'oxygénation, l'alkylation, la glycosylation, l'acylation et la sulfatation) des cycles A et B donnent naissance à des composés différents à l'intérieur de chaque classe de flavonoïdes. Selon leurs structures moléculaires les flavonoïdes sont divisés en six classes représentées dans le tableau ci-dessous (Balasundram et al., 2006).

Tableau III: Structures des catégories des flavonoïdes (Havsteen, 2002).

Classe	Structure chimique
Flavones	
Flavanones	
Flavonols :	
Isoflavones	
Flavanols	
Anthocyanidines	

II-2-2-2-4-Mécanismes antioxydants des polyphénols

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

II-2-2-2-4-1-Le piégeage direct des radicaux libres

Les polyphénols sont d'excellents capteurs de radicaux libres, car ils sont très réactifs comme donneurs d'hydrogènes ou d'électrons. Cette propriété anti-radicalaire des polyphénols est étroitement liée à leur structure en particulier le nombre et la localisation des groupements OH phénoliques présents, nécessaires pour une activité de piégeage des radicaux efficace (Figure 14) (Seyoum *et al.*, 2006).

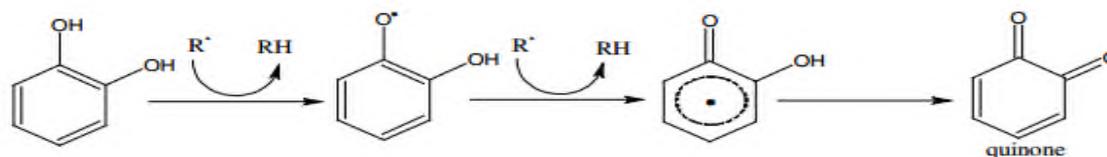


Figure 14: Piégeage des ERO (R^\bullet) par les polyphénols (Pietta, 2000).

II-2-2-2-4-2-L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres

Les polyphénols sont responsables de l'inhibition de très nombreuses enzymes directement impliquées dans le stress oxydant telles que la xanthine oxydase, l'oxyde nitrique synthase, la glutathioneS-tranférase et les lipoxygénases. Les modes d'inhibition peuvent être différents selon le polyphénol et l'enzyme étudiés. L'exemple le plus illustré est celui de la xanthine oxydase, qui est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Une relation a été établie entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité à inhiber la formation de superoxyde par inhibition de la xanthine oxydase par formation de complexes enzyme-inhibiteur, et/ou par réduction du superoxyde produit (Middleton *et al.*, 2000; Vorbach *et al.*, 2003).

Il existe plusieurs facteurs importants pour la liaison des flavonoïdes dans le site actif de la XO dont:

- Les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés. Par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine.
- L'absence du groupement hydroxyle en C3 augmente légèrement l'activité inhibitrice.
- Les groupements hydroxyles en C7 et C5 et le groupement carbonyle en C4 fournissent des liaisons hydrogènes favorables et des interactions électrostatiques entre les inhibiteurs et le site actif (Lin *et al.*, 2002; Cos *et al.*, 1998).

II-2-2-2-4-3-Chélation des ions métalliques

Les composés phénoliques possèdent une activité chélatrice des ions métalliques en raison de leur structure chimique spécifique (principalement les groupements carbonyles et hydroxyles). Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont représentés dans la figure n°15 : un noyau catéchol sur le cycle B, les groupements 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, les groupements 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles C et A (Moridani *et al.*, 2003).

Les polyphénols exercent une activité anti-oxydante par chélation en formant des complexes avec la forme réduite des métaux de transition, tels que Fe^{2+} , Fe^{3+} et Cu^{2+} qui participent à des réactions génératrices de radicaux libres. En conséquence, ils peuvent protéger les cibles biologiques potentielles du stress oxydatif (Malešev et Kuntić, 2007).

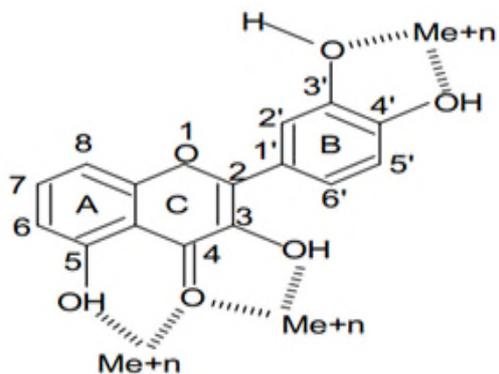


Figure 15: Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{+n}) (Tiqwari, 2001).

Chapitre II

Les plantes médicinales

I- *Camellia sinensis* (Thé vert)

I-1- Historique

Le thé vert (*Camellia sinensis*) est connu depuis plusieurs millénaires, en particulier dans les populations asiatiques qui lui attribuent des propriétés médicinales.

L'histoire de cette boisson remonterait, selon la légende chinoise, à 3000 ans avant Jésus Christ dans les régions du Sichuan dans le sud-ouest de la Chine. La découverte du thé est attribuée à l'Empereur Shen Nung (qui a développé la Médecine Traditionnelle Chinoise). Pour écrire le "Traité des plantes", Shen Nung goûta lui même une centaine de plantes afin de connaître leurs vertus mais il fût empoisonné par 72 d'entre elles et le thé le sauva à chaque fois. Il apprécia donc le thé qui est comme un excellent médicament.

Le thé est introduit au Japon et dans le monde arabe à partir du IXe siècle. Puis en Europe au XVIIe siècle par les commerçants portugais et hollandais. Actuellement, le thé est la boisson la plus consommée dans le monde après l'eau. La production mondiale a atteint 3 459 000 tonnes en 2005 (Wachira et al., 2001; Scharbert et Hofmann, 2005).

I-2- Description

Originaire d'Extrême-Orient, mais il est aujourd'hui cultivé partout dans le monde, le théier est un arbre à feuilles persistantes, pouvant atteindre jusqu'à 20 m pour certaines variétés. Sa hauteur est limitée par la taille en culture. Il a une forte racine pivotante, les fleurs sont blanches et il possède un génome de 4000 Mb.

La culture du thé affectionne les sols acides des régions au climat tempéré et humide (Tanaka et al., 2004; Namita et al., 2012).



Figure17: *Camellia sinensis* (fleurs) (1)



Figure16: Photographie d'une feuille de *Camellia sinensis*.

I-3- Classification botanique

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Theales

Famille : Theaceae

Genre : Camellia

Espèce : *Camellia sinensis* (Mahmood et al., 2010).

I-4- Composition biochimique

La feuille du thé ne contient pas moins de 350 constituants. A l'état frais, le thé renferme 27% de matière sèche dont on distingue:

* Les polyphénols (30 à 40%) :

Les propriétés pharmacologiques du thé vert sont dues principalement à la présence des polyphénols. Près de 75% de ces derniers appartiennent au groupe des flavanols, largement représentés par des catéchines. L'épigallocatechine, l'épigallocatechine-3-gallate, l'épicatéchine-3-gallate et épicatechine sont les principales catéchines du thé vert.

Le thé est aussi une source de flavonols, principalement la quercétine, le kaempferol et la myricétine. Ils sont présents dans les extraits du thé sous forme de flavonols glycosides. Il contient aussi une quantité significative d'acides phénoliques (acide gallique, acide coumarique,...) (Tariq et al., 2010; Rusak et al., 2008).

* La caféine (1 à 5 %) :

La caféine est un alcaloïde, appartenant à un groupe de stimulants appelés triméthylxanthine (Ahmad et al., 1999).

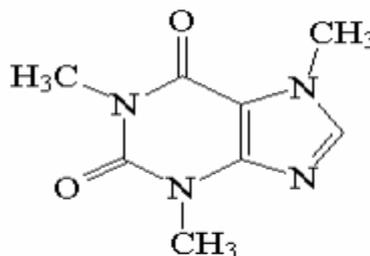


Figure 18: Structure moléculaire de la caféine (Ashihara et al., 2008).

*** Les vitamines :**

La teneur du thé en vitamines augmente le potentiel antioxydant, en particulier les vitamines du groupe B telles que (B1, B2, B3), la vitamine C, la vitamines E et la vitamine P (Nookabkaew et al., 2006).

***Autres composants:**

Le thé vert contient aussi d'autres constituants faiblement extraits lors de l'infusion: 40 % de glucides, 15 à 23 % de protides et 2 à 3 % de lipides, 9 % de matières minérales (le manganèse, le potassium, le magnésium et le fluor) (Cabrera et al., 2006).

I-6- Usage thérapeutique

En Médecine chinoise traditionnelle, le thé vert est utilisé pour traiter les troubles digestifs, favoriser la circulation sanguine, stimuler les fonctions cognitives, ainsi que pour accélérer l'élimination de l'alcool et d'autres toxines. En usage externe, la poudre de thé est utilisée comme cicatrisant dans la plaie ouverte et dans les affections oculaires. Mais ces usages traditionnels n'ont pas été évalués de façon scientifique (Ogle, 2009).

I-7- Propriétés biologiques**I-7-1- Activité anti-oxydante**

Les effets biologiques des polyphénols du thé sont principalement axés sur les effets des catéchines en raison de leur activité anti-oxydante.

Ainsi, des études ont démontré qu'un gramme de thé vert contient une quantité d'antioxydants équivalente à celle trouvée dans 50-275 mg d'acide ascorbique, ou de 156 à 813 mg de vitamine E (Hajimahmoodi et al., 2008).

D'autres études ont démontré que la capacité du thé vert à piéger le radical synthétique le Diphényle picryl-hydrazyle (DPPH) est de 90,8% (Gadow et al., 1997).

I-7-2- Activité anticancéreuse :

De nombreuses études ont été réalisées dans le but de tester l'effet du thé vert en particulier l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) sur des cellules normales et transformées.

Ainsi l'EGCG a montré une capacité à induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses sans affecter les cellules normales, y compris l'inhibition de la progression du cycle cellulaire, l'activation des caspases, enzymes induisant l'apoptose (**Du et al., 2012**).

En outre, l'EGCG peut bloquer l'urokinase : une enzyme produite en quantités importantes par la cellule cancéreuse. Elle détruit les tissus adjacents, de sorte qu'elle y pénètre et prolifère. L'inhibition de l'urokinase par l'EGCG empêche la tumeur de produire des métastases (**Jung et Ellis, 2001; Katiyar et al., 2000**).

I-7-3- Activité antidiabétique :

Les polyphénols du thé abaissent la glycémie en inhibant à la fois l'activité de α -amylase salivaire et intestinale: enzymes de digestion de l'amidon. En conséquence, l'amidon est décomposé plus lentement et la hausse soudaine de la glycémie est minimisée (**Sharangi, 2009**).

I-7-4- Prévention des maladies cardiovasculaires :

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que les catéchines et particulièrement l'EGCG du thé réduisent le taux de cholestérol, l'oxydation des LDL et l'agrégation plaquettaire. Chacun de ces facteurs pourrait être prometteur dans la réduction des maladies cardio-vasculaires.

Le thé vert peut aussi diminuer la tension artérielle en inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine (**Hernández Figueroa et al., 2004; Sinija et Mishra, 2008**).

I-7-5- Effet minceur :

La caféine est potentialisée dans le thé vert par la présence de catéchine et ce qui favorise une augmentation de la thermogénèse. De plus, la caféine aide à stimuler la lipolyse, et freine l'absorption intestinale des lipides en inhibant les lipases gastriques (**Dulloo et al., 1999; Westerterp-Plantenga, 2010**).

I-7-6- Effet revitalisant :

La caféine contenue dans le thé vert agit directement sur le système nerveux central. Dans le thé, l'action stimulante de la caféine est significativement modifiée par la présence des polyphénols qui génèrent un effet prolongé et modéré (**Arnal-Schnebelen et al., 2008**).

II- *Laurus nobilis* (Laurier)

II-1- Historique

Laurus nobilis ou le laurier, issu de la famille des Lauracées, et originaire du bassin méditerranéen (Iserin, 2001). Il est connu en Grèce au moins depuis l'Antiquité où il symbolisait la gloire, l'immortalité, d'où le nom de "lauréat" qui signifie littéralement "glorieux". Chez les Grecs et les Romains anciens, l'usage s'était établi de couronner de laurier les poètes et les vainqueurs. Au Moyen Âge aussi, on couronnait de laurier les savants distingués dans les universités. Dans les écoles de médecine, la couronne dont on entourait la tête des jeunes docteurs était faite de rameaux feuillés de laurier avec des baies, d'où le nom « baccalauréat » (bacca laurea : baie de laurier) (Ballabio et Goetz, 2010).

Les feuilles sont largement appliquées et connues comme assaisonnement et herbe médicinale depuis les périodes antiques grecs et romaines (Demir et al., 2004).

II-2- Description

Le laurier est un arbuste de la famille des Lauracées à feuilles persistantes et coriaces. Il est le seul arbuste comestible de la famille des Lauracées mesurant de 2 à 6 m et jusqu'à 15 m de haut, à tige droite et grise dans sa partie basse, verte en haut. Le nombre de chromosomes est $2n = 42$. Les feuilles sont vert foncé de forme lancéolée. Les fleurs, blanchâtres groupées par 4 à 5 en petites ombelles, apparaissent en Mars - Avril (Hopkinson et al., 2002, Rivera et Obon, 1995).



Figure19: *Laurus nobilis* (fleurs) (2).



Figure20: Photographie des feuilles de *Laurus nobilis*

II-3- Classification botanique

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Laurales

Famille : Lauraceae

Genre : Laurus

Espèce : *Laurus nobilis* (Ballabio et Goetz, 2010).

II-4- Composition biochimique

Les feuilles du Laurier sont riches en :

***Huile essentielle:** elle représente 1 à 3 % du poids sec dont: 30 à 70 % de cinéol, 3% d'eugénol, ainsi que plusieurs d'autres composés terpéniques : linalol, géranol, pinène, terpinène.

***Des polyphénols :** Plusieurs flavonoïdes et dérivés ont été déterminés dans les extraits du laurier comme des flavonoïdes O-glycosides ou C-glycoside, l'acide caféique, la catéchine, les cinnamtannin et certains dérivés du kaempférol.

***Des alcaloïdes aporphiniques :** comme la cryptodrine ou l'actinodaphnine.

***Des lactones sesquiterpéniques:** comme costunolide et zaluzanine D (Derwich et al., 2009; Flamini et al., 2007).

II-5- Usage thérapeutique

Le laurier est principalement utilisé pour soigner les troubles de l'appareil digestif et les douleurs arthritiques et les rhumatismes, les éruptions cutanées (Santos et Rao, 2000).

En outre, il stimule l'appétit et la sécrétion des sucs gastriques. Utilisées comme condiment, les feuilles facilitent la digestion et l'assimilation des aliments. Elles ont la même action bénéfique que la menthe (*Mentha spicata*) et le romarin (*Rosmarinus officinalis*) (Muñiz-Márquez et al., 2013).

II-6- Propriétés biologiques

II-6-1- Activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante des extraits des feuilles de *Laurus nobilis* a été étudiée au niveau de la peroxydation des lipides. Des recherches faites sur les extraits aqueux et éthanolique ont montré qu'ils présentent une forte activité anti-oxydante en émulsion d'acide linoléique. Différentes concentrations de ces extraits entre 20 et 60 mg/ml ont montré entre 85 et 98,6% d'inhibition de la peroxydation lipidique de l'émulsion d'acide linoléique, quand 60 mg/ml de BHA et de alpha-tocophérol présentaient 77 et 96% d'inhibition de la peroxydation des lipides en émulsion d'acide linoléique, respectivement (Elmasta et al., 2006).

II-6-2-Activité antibactérienne

Le laurier possède des propriétés antibactériennes très efficaces concernant les staphylocoques, streptocoques et gonocoques. Des études antibactériennes ont démontré que les huiles essentielles de *laurus nobilis* sont très efficaces contre la souche *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 13 mm.

L'activité antibactérienne a été principalement expliquée par la capacité des cycles aromatiques des terpènes et des groupements hydroxyphénoliques à former des liaisons hydrogènes avec les sites actifs des enzymes cibles (Derwich et al., 2009; Fukuyama et al., 2011).

II-6-3-Activité anticonvulsivante

L'huile essentielle de *laurus nobilis*, en particulier le méthyleugénol, et l'eugénol, ont montré un effet protecteur sur les souris contre les convulsions toniques induites par électrochoc maximal et surtout par le pentylènetétrazole (Sayyah et al., 2002).

II- Partie
pratique

Chapitre I

Matériel et méthodes

I-Matériel et méthodes

I-1- Cueillette de la plante

Les feuilles de *Camellia sinensis* ont été récoltées en février 2013 et celles de *Laurus nobilis* en mars 2013, dans un endroit naturel loin de la pollution situé dans la commune de Boukhlifa dans la wilaya de Bejaia. *Camellia sinensis* a été identifiée par Mr BOUADAM Saïd enseignant à la Faculté Science de la Nature et de la Vie.

I-2- Séchage et broyage

Après la récolte, Les feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* ont été débarrassées des débris, séchées à l'air libre puis pendant 24h à l'étuve à 40°C. Ensuite, les feuilles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre très fine.

I-3- Préparation des extraits

Le protocole d'extraction suivi dans cette étude est celui de Chiang et *al.*, (1994), ayant subi quelques modifications. Le principe de cette méthode se base sur l'extraction sélective liquide-solide des composés phénoliques en utilisant quatre solvants de différentes polarités : l'éthanol, l'eau, le chloroforme et l'hexane. Les étapes d'extraction qui suivront ont été réalisées à température ambiante.

Il s'agit de mettre 100g de poudre dans 600ml d'éthanol 96%, avec un rapport de 1/6 pour *Camellia sinensis* et dans 400ml d'éthanol 96%, avec un rapport de 1/4 pour *Laurus nobilis*, et de les laisser macérer sous agitation magnétique pendant 24 heures.

Après décantation de la suspension pendant 24 heures, l'extrait humide a été prélevé à l'aide d'une pipette et filtré à travers un filtre en papier puis versé dans une boîte de pétri, qui sera réservé pour les tests, et le reste dans un bécher qui servira pour la deuxième extraction. Finalement, l'extrait humide a été séché à l'étuve à 40°C jusqu'à atteindre un poids constant de l'extrait sec.

La deuxième étape consiste à dissoudre l'extrait sec d'éthanol dans un mélange de solvants : le chloroforme et l'eau (3/1, v/v) pour *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis*, et l'hexane et l'eau (3/1, v/v) pour *Camellia sinensis*. Après agitation et décantation pendant 24h, deux phases, organique et aqueuse, ont été observées puis récupérées et séchées (Figures 21 et 22).

Il est à noter, qu'après l'extraction, huit 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 de la boîte de pétri.

P : poids après évaporation du solvant.

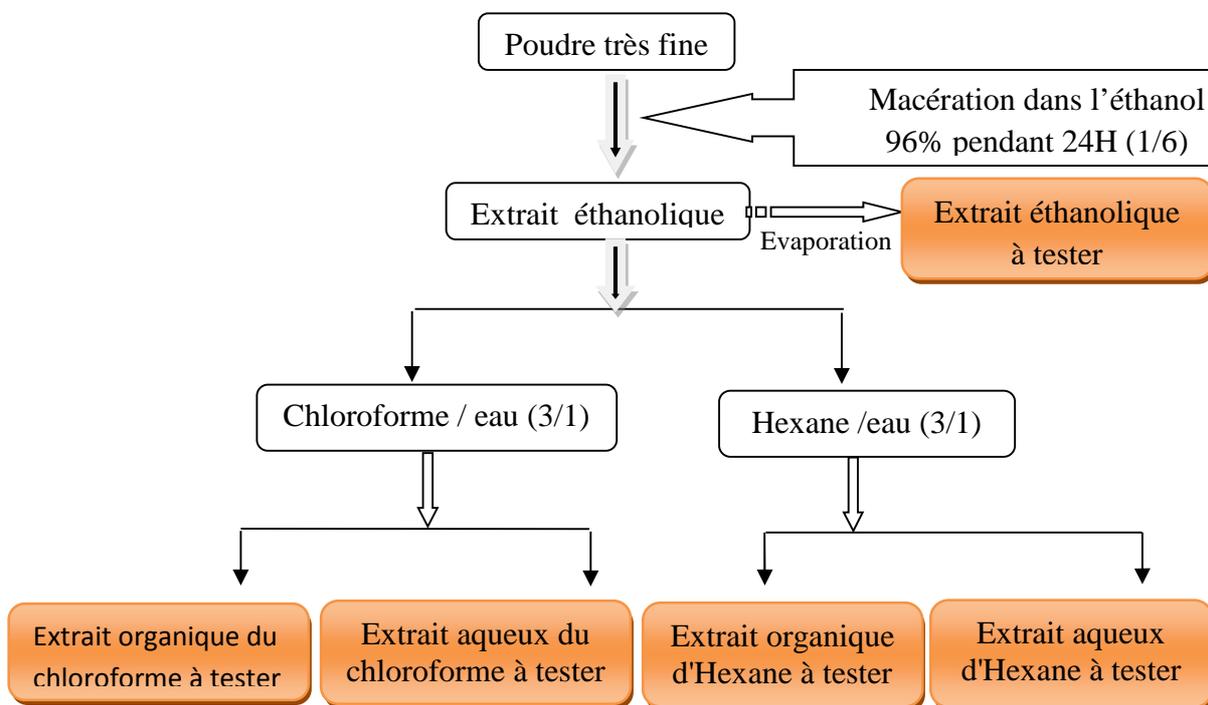


Figure 21: Schéma d'extraction de *Camellia sinensis* (Chiang et al., 1994).

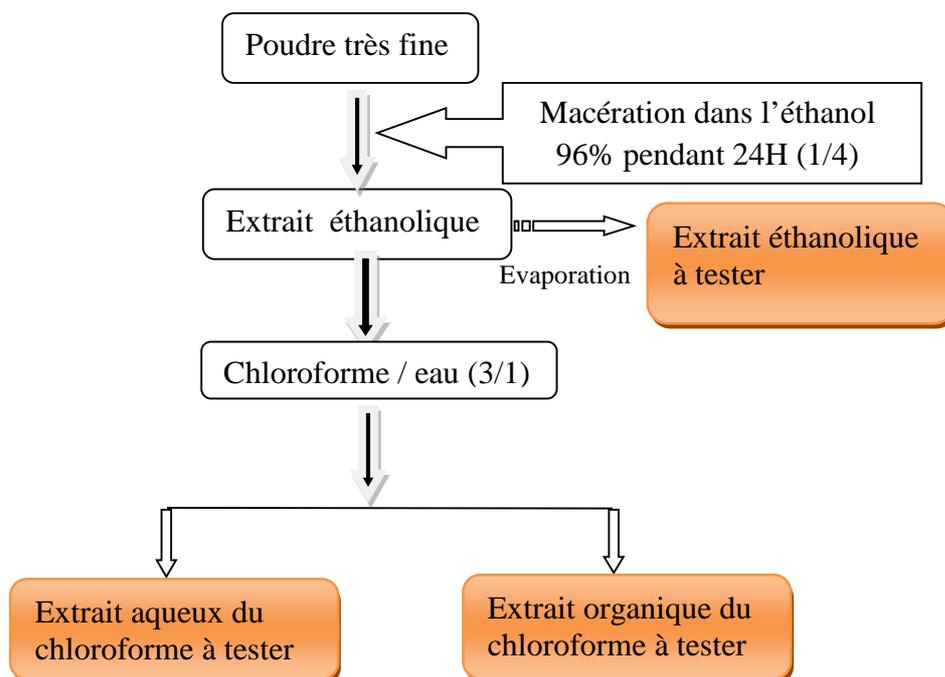


Figure 22: Schéma d'extraction de *Laurus nobilis* (Chiang et al., 1994).

I-4- Dosage des composés phénoliques

Dans le but d'évaluer qualitativement et quantitativement le contenu en composés phénoliques des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis*, trois protocoles ont été suivis afin de doser les teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

I-4-1- Dosage des phénols totaux

Le contenu en phénols totaux des extraits a été déterminé en utilisant le protocole de Yap et al., (2009), avec quelques modifications. La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphotungstène du réactif de Folin-Ciocalteu vers un complexe de couleur bleu, dans une solution alcaline en présence des composés phénoliques.

Pour cela, on tient à préciser que le réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Boizot et Charpentier, 2006). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

A 0,3 ml de solution d'extrait (1mg/ml) ont été ajoutés 1,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10%,v/v) suivis de 0,2 ml de carbonate de sodium (7,5%, w/v). Le mélange a été bien agité, les tubes à essais ont été incubés à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité ; puis l'absorbance a été mesurée à 765 nm.

Il est à noter qu'un blanc 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.

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.

I-4-2- Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été mesurée en suivant la méthode de Mimica-Dukic, (1992) in Abdou Bouba et *al.*, (2010), ayant subi quelques modifications.

Cette méthode se base sur le principe suivant : les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium), car ils contiennent des groupements hydroxyles libres (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

2 ml de solution d'extrait (1mg/ml) ont été mélangés avec 1 ml d'une solution d'acétate de sodium et de chlorure d'aluminium (133 mg d' AlCl_3 et 400 mg d'acétate de sodium dans 100 ml d'eau distillée). Après incubation pendant 10 min à température ambiante, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 430 nm.

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

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

I-4-3- dosage des tanins condensés (Pro-anthocyanidines)

La teneur en pro-anthocyanidines a été mesurée en suivant le protocole de Sun et *al.*, (1998) in Oyedmi et Afolayan., (2011) avec quelques modifications. Le principe est basé sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère (Figure 23) (**Ba et al., 2010**).

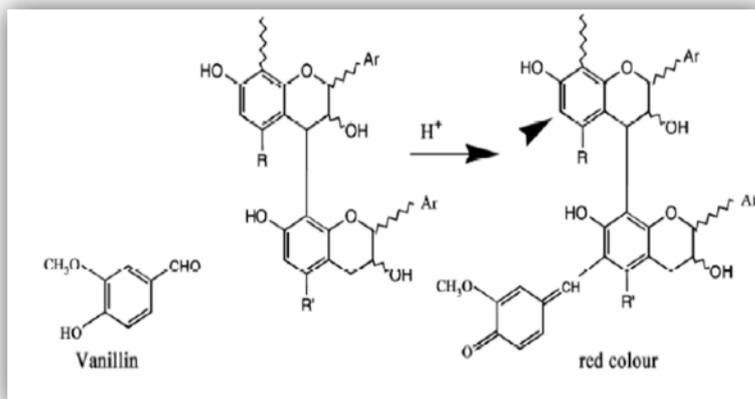


Figure 23: Mécanisme de la réaction de la vanilline avec les tanins condensés (Schofield *et al.*, 2001).

Un volume de 0,5 ml de la solution d'extrait (1 mg/ml) a été mélangé avec 3 ml de la solution de vanilline (4%, w/v), préalablement préparée dans du méthanol, et 1,5 ml d'HCl (37%). Le mélange a été bien agité, puis incubé pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 500 nm.

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

I-5- Activités anti-oxydantes des extraits

L'activité anti-oxydante a été évaluée en testant l'activité scavenging du radical DPPH[•], ABTS^{•+} et le pouvoir réducteur des extraits.

I-5-1- Activité scavenging du radical DPPH[•]

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits a été réalisée en mesurant l'activité scavenging du radical DPPH[•]. Le 1,1-Diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) est un radical libre stable centré sur l'azote, dont la couleur change du violet au jaune après réduction par le processus de donation, soit d'hydrogène ou bien d'électron (Figure 24) (Hinneburg *et al.*, 2006).

La mesure de l'activité scavenging du radical DPPH[•] a été effectuée en suivant le protocole de Hemalatha *et al.*, (2010).

Une solution de DPPH (0,1 mM) a été préparée dans du méthanol, et 1 ml de cette solution a été ajouté à 3 ml de solution d'extrait à différentes concentrations. Après incubation pendant 30 min et à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

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.

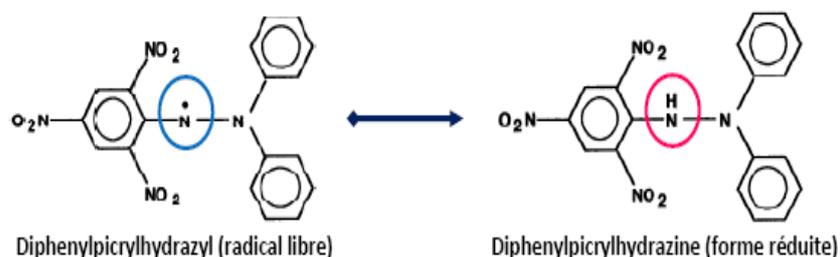


Figure 24: Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

L'acide ascorbique et la BHA ont été utilisés comme standards et à différentes concentrations. Le pourcentage de l'activité scavenging du radical DPPH[•] de chaque extrait a été calculé comme suit:

$$\% \text{ de l'activité scavenging du radical DPPH}^{\bullet} = \left[\frac{Ac - (At - Ae)}{Ac} \right] \times 100$$

Où :

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

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

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

I-5-2- Activité scavenging du radical ABTS^{•+}

La mesure de l'activité scavenging du radical ABTS (2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Figure 25) est réalisée par une méthode colorimétrique qui se base sur un test de décoloration afin de détecter le pouvoir antiradicalaire d'un composé donné. Le radical préformé ou ABTS^{•+} est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium. La formation du radical ABTS^{•+} se traduit par l'apparition d'une coloration vert bleu intense.

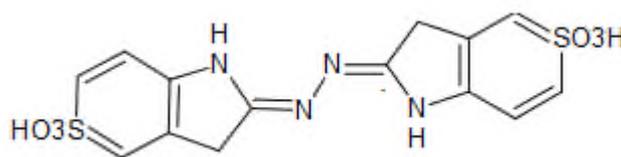


Figure 25: Structure de l'ABTS (acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzthiazoline)-6-sulfonique) (Re et al.,1999).

En présence d'un donneur de H[•], le passage du radical ABTS^{•+} à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 734 nm (Re et al., 1999).

Le protocole suivie est celui de Nenadis et al., (2004) in Le et al., (2007) avec quelques modifications.

Une solution de l'ABTS (7 mM) a été préparée en mélangeant 72mg de l'ABTS avec 13.24 mg de persulfate de potassium (2,45mM) dans 20ml d'eau distillée, et laissée incuber pendant 16h à l'obscurité. La solution d'ABTS^{•+} (7 mM) est diluée avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre une absorbance de 0,7±0,02 à 734 nm. 1,9ml de cette solution a été ajouté à 100µl de solution d'extrait à différentes concentrations. Après incubation pendant 7 min et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734nm. 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 concentrations (Miller et al., 1997).

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

$$\% \text{ de l'activité scavenging de l'ABTS}^{\bullet+} = [\text{Ac} - \text{At}/\text{Ac}] \times 100$$

Où :

Ac : Absorbance du blanc.

At : Absorbance du test.

I-5-3- Le pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis* a été déterminé selon le protocole d'Oyaizu (1986) in Ogunlana et Ogunlana (2008) avec quelques modifications.

Les extraits qui possèdent un potentiel réducteur réagissent avec le Ferricyanure de potassium (Fe³⁺) pour former le Ferrocyanure de potassium (Fe²⁺), qui réagit ensuite avec le Chlorure ferrique (Fe Cl₃) pour donner un complexe ferrique ferreux mesurable à 700 nm (Jayanthi et Lalitha, 2011).

1 ml de solution d'extrait (100 µg/ ml) a été mélangé avec 2,5 ml de solution tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et 2,5 ml de solution de Ferricyanure de potassium à 1% ($K_3Fe(CN)_6$). Le mélange a été incubé à 50°C pendant 20 min, puis les tubes à essais ont été retirés en leur rajoutant 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% (TCA).

A 2,5 ml du surnageant ont été ajoutés 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de $FeCl_3$ à 0,1% et la mesure de l'absorbance a été effectuée à 700 nm. Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol, et la BHA a été utilisée comme standard.

I-6-Fractionnement et caractérisation de l'activité antioxydante des extraits par chromatographie sur couche mince

I-6-1-Fractionnement des extraits par chromatographie sur couche mince

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.

Une plaque chromatographique est composée d'un support en aluminium sur lequel est posée une fine couche de silice qui constitue la phase stationnaire. 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, et l'autre à 3,5 cm de l'extrémité haute. Des échantillons de tous les extraits et des standards utilisés ont été déposés sur la ligne basse de la plaque chromatographique en respectant la même concentration (10 mg/ml) et le même volume (5 µl), puis laissés sécher.

La deuxième étape consiste à introduire de façon verticale la plaque chromatographique dans une cuve de chromatographie préalablement saturée par un système de solvant approprié spécifique pour les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis* celui-ci est composé de: acétone glaciale-toluène-acide formique (60 :60 :10, v/v).

Après l'élution, la plaque chromatographique a été séchée à l'air libre puis observée à la lumière du jour et sous UV. Finalement, une révélation à la vanilline sulfurique a été effectuée par une simple pulvérisation puis un chauffage à 100 °c pendant 5 mn. Les résultats ont été photographiés.

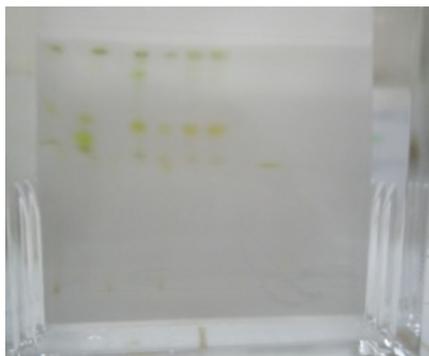


Figure 26: développement chromatographique d'une plaque.

N.B. :

Le rapport frontal de chaque spot a été déterminé :

$$\text{Le rapport frontal (RF)} = D1 / D0$$

Tel que :

D1 : Distance parcourue par la tache.

D0 : Distance parcourue par le front du solvant.

I-6-2-Caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits par chromatographie sur couche mince

Dans le but de révéler l'activité anti-oxydante des fractions chromatographiques obtenues, deux autres plaques de CCM ont été préparées de la même manière, l'une a été pulvérisée par une solution méthanolique de DPPH à 0,5 mM et l'activité fut caractérisée par l'apparition de spots jaunâtres sur un fond violet (Aké *et al.*, 2006), l'autre plaque a, quant à elle, été pulvérisée par une solution concentrée du radical-cation ABTS^{•+} et l'activité fut caractérisée par l'apparition de spots décolorés sur un fond bleu vert. Les résultats finaux ont été photographiés (Zampini *et al.*, 2010).

I-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 logiciel Anova. Les différences ont été considérées d'être significatives à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC50 ont été calculées en utilisant le logiciel Origine 8.

Chapitre II

Résultats et discussion

II- Résultats et discussion

II-1- Extraction

Le taux d'extraction des composés phénoliques dépend de la méthode, la nature du solvant, la température et de la taille des particules constituant la poudre de la plante (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 des solvants apolaires tels que : l'hexane et 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, le calcul des taux d'extraction dans chaque étape a donné les résultats suivants :

Tableau IV : Les pourcentages d'extraction des extraits de *Camellia sinensis*.

Extrait	Taux d'extraction
Extrait éthanolique des feuilles	10.57%
Extrait du chloroforme des feuilles	31.41%
Extrait aqueux du chloroforme des feuilles	38.14%
Extrait d'hexane des feuilles	2.10%
Extrait aqueux d'hexane des feuilles	5.89%

Tableau V: Les pourcentages d'extraction des extraits de *Laurus nobilis*.

Extrait	Taux d'extraction
Extrait éthanolique des feuilles	11.18%
Extrait du chloroforme des feuilles	43.14%
Extrait aqueux du chloroforme des feuilles	36.18%

D'après ces résultats, nous remarquons que les taux d'extraction de l'extrait éthanolique concernant les deux plantes sont similaires et appréciables, ce qui nous permet de conclure la richesse des deux plantes en composés phytochimiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par deux études. En effet, Gramza-Michalowska, (2007), a trouvé un pourcentage de 12.61% concernant un extrait éthanolique des feuilles de *Camellia sinensis*; de la même manière, ont obtenu un taux de 17.32 % pour un extrait des feuilles de *Laurus nobilis*.

Les extractions chloroforme/eau et hexane/eau ont donné des phases aqueuses plus concentrées que les phases organiques dans le cas de *Camellia sinensis*, contrairement à ce qui l'on est concernant *Laurus nobilis*, où la phase organique du chloroforme est nettement plus concentrée que la phase aqueuse correspondante. Cette différence dans les taux d'extraction pourrait traduire une différence dans la nature des composés phénoliques extraits des deux plantes. Ainsi, *Camellia sinensis* semblerait être plus riche en composés de polarité élevée dont les composés phénoliques, étant donné leur richesse en groupements hydroxyles (Iris et al., 1999); comparée à *Laurus nobilis* où les composés de polarité réduite seraient plus abondants. Effectivement une étude effectuée par Macchioni et ses collaborateurs, sur la détermination de la composition chimique de *Laurus nobilis*, a démontré que les huiles essentielles qui sont de nature peu polaire, constituent les principaux composants de *Laurus nobilis* (Macchioni et al., 2006).

II-2- Dosage des composés phénoliques

II-2-1-Dosage des phénols totaux

Les teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis*, exprimées en mg équivalent acide gallique /g d'extrait, sont représentées dans la figure ci-dessous :

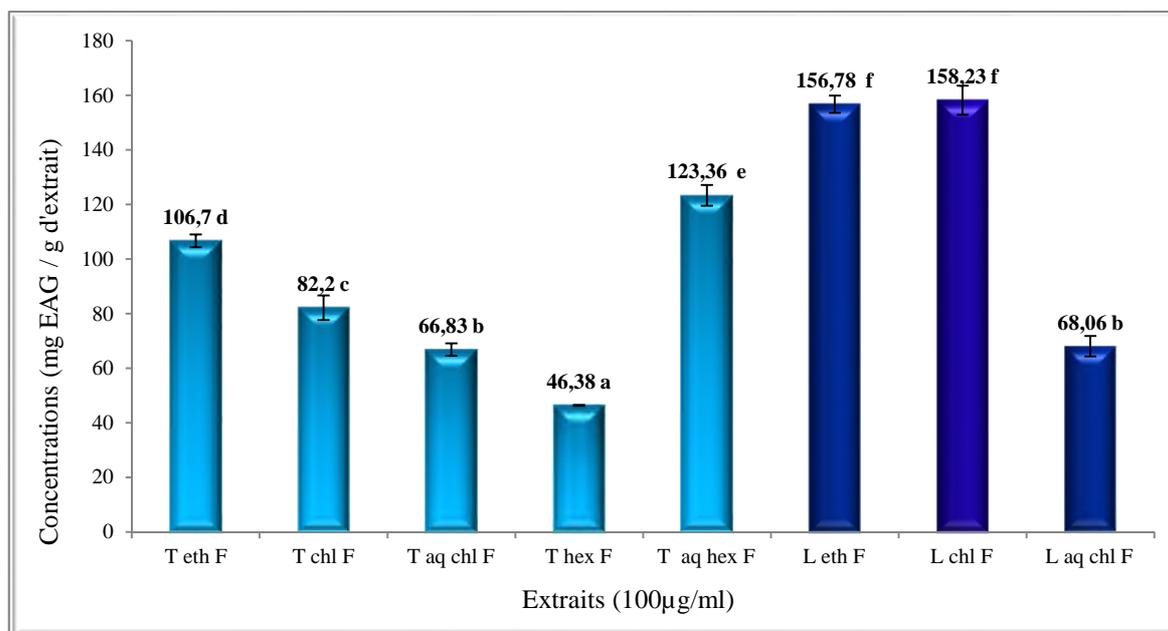


Figure 27: Teneurs en phénols totaux dans les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis*.

T eth F: Thé ethanol feuille; T chl F: Thé Chloroforme feuilles; T Aq chlo F: Thé Aqueux du chloroforme feuilles; T Hex F: Thé Hexane feuilles; T Aq hex F: Aqueux d'hexane; L eth F: Laurier ethanol feuille; chl: chloroforme; L Aq chlo F: Laurier Aqueux du chloroforme feuilles.

Si on calcule le taux en phénols totaux de l'extrait brut par rapport à un gramme de poudre, on obtient une concentration de 11.27 mg équivalent acide gallique (EAG)/g de poudre de *Camellia sinensis* et une concentration de 17.52 mg EAG/g de poudre pour *Laurus nobilis*; ces taux nous permettent de classer les deux plantes d'après une étude faite par Kähkönen et al., (1999), qui ont montré que la quantité en phénols totaux variait beaucoup dans les plantes et sont classées de 0,2 à 155,3 mg EAG/g de poudre. *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* font partir des plantes riches en polyphénols.

La figure n° 27 montre que le meilleur taux en phénols totaux est donné par l'extrait aqueux d'hexane concernant la plante *camellia sinensis* (123.36 ± 3.81 mg EAG/g d'extrait); cela semble évident étant donné que les polyphénols constituent des composés polaires grâce à leur richesse en groupement hydroxyles, donc solubles dans les solvants polaires (**Chen et Ho, 2007**). Ce résultat est semblable au résultat obtenu par Hajimahmoodi et al., (2008) qui ont montré que la concentration d'un extrait des feuilles de *Camellia sinensis* est de $108 \pm 0,07$ mg EAG/g d'extrait.

On constate aussi que c'est l'extrait organique (158.23 ± 5.37 mg EAG/g d'extrait) qui a donné plus que l'extrait aqueux du chloroforme de *Laurus nobilis* (68.06 ± 3.74 mg EAG/g d'extrait). Ce taux est similaire en moyenne à celui trouvé par Bozan et Karakaplan (2007), dont les valeurs sont comprises entre 142.4 - 168.1 mg EAG/g d'extrait. Cela peut être expliqué par la richesse de *Laurus nobilis* en tannins hydrolysables (non mesurés), qui constituent des structures polycycliques d'où leur caractère légèrement hydrophobe donc, se solubilisant dans les solvants organiques.

Nous faisons remarquer également que le taux en phénols totaux dans l'extrait éthanolique pour les deux plantes est légèrement inférieur par rapport à quelques extraits, cela pourrait être expliqué par le fait que les composés phénoliques n'ont pas été entièrement révélés par le réactif du Folin-Ciocalteu dans l'extrait éthanolique, car il y aurait un encombrement stérique résultant non seulement de la présence de composés phénoliques mais aussi d'autres composés appartenant à des classes de métabolites secondaires ou bien au fait qu'il se formerait des interactions moléculaires, provoquant ainsi la diminution de la quantité des groupements réducteurs spécialement les groupements hydroxyles (**Singleton et Rossi, 1965; Cicco et al., 2009**).

II-2-2- Les flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis*, exprimé en mg équivalent quercétine (EQ)/ g d'extrait, figure dans l'histogramme suivant :

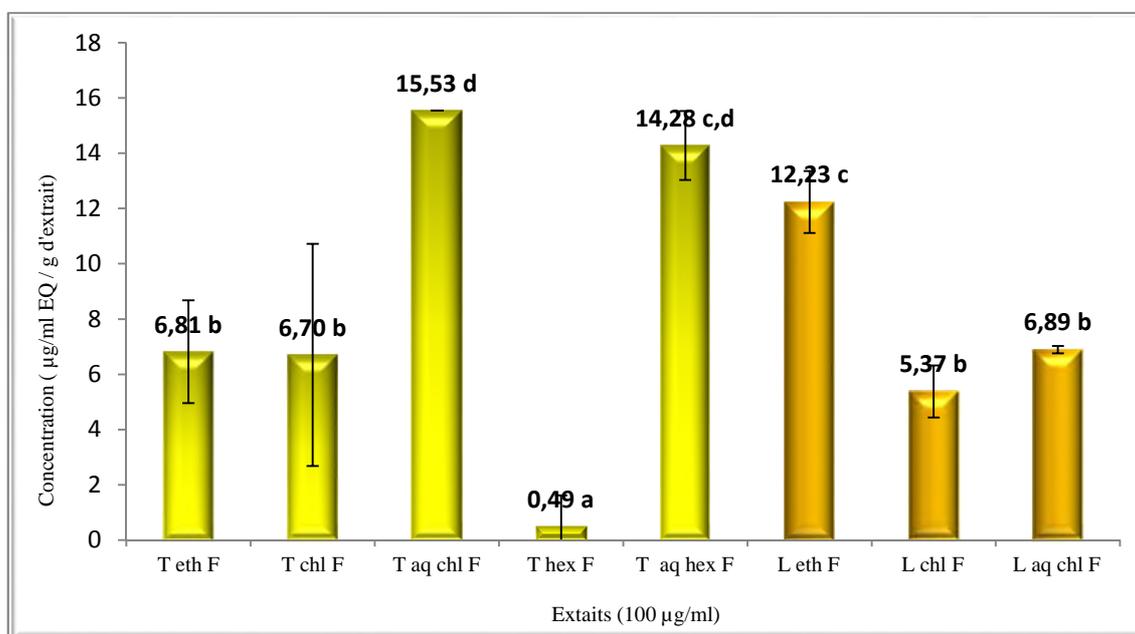


Figure 28: Teneurs en flavonoïdes dans les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis*.

T eth F: Thé ethanol feuille; T chl F: Thé Chloroforme feuilles; T Aq chlo F: Thé Aqueux du chloroforme feuilles; T Hex F: Thé Hexane feuilles; T Aq hex F: Aqueux d'hexane; L eth F: Laurier ethanol feuille; chl: chloroforme; L Aq chlo F: Laurier Aqueux du chloroforme feuilles.

Une vue d'ensemble de cette représentation graphique, nous montre que les deux plantes présentent des teneurs élevées en flavonoïdes, avec un taux légèrement supérieur pour *Camellia sinensis*.

D'après la figure ci-dessus, on constate que les phases aqueuses pour les deux plantes sont plus riches en flavonoïdes que les phases organiques correspondantes. Avec un taux maximal pour l'extrait aqueux du chloroforme ($15,53 \pm 0$ mg EQ/g d'extrait) suivi de l'extrait aqueux d'hexane ($14,28 \pm 1,25$ mg EQ/g d'extrait) pour *Camellia sinensis*; ces résultats sont conformes au résultat obtenu par Hajimahmoodi et al., (2008) qui est de $19,17 \pm 0,22$ mg EQ/g d'extrait. Cela serait dû au fait que les flavonoïdes sont de petites molécules très polaires, résultant de leur abondance en groupements hydroxyles, donc insolubles dans le chloroforme (Musialik et al., 2009; Papagiannopoulos et Galensa, 2005).

Il ne faut pas nier la constatation que l'extrait éthanolique représente un taux infime de (6.81 ± 1.86 mg EQ/g d'extrait) comparé à celui de l'extrait aqueux du chloroforme. En réalité, bien qu'il soit riche en flavonoïdes ou qu'il en contienne tout simplement la totalité, le réactif révélateur qui est le $AlCl_3$ n'a pas pu les détecter entièrement, on pourrait supposer que cela soit dû au fait que les groupements réagissant avec ce réactif ne soient pas disponibles dans l'extrait brut de *Camellia sinensis* à cause de l'encombrement stérique engendré, 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).

En ce qui concerne les extraits de *Laurus nobilis*, le taux le plus élevé a été obtenu avec l'extrait éthanolique (12.23 ± 1.12 mg EQ/g d'extrait) étant donné qu'il est le précurseur, donc englobe la totalité des composés phénoliques; suivi de l'aqueux du chloroforme (6.89 ± 0.13 mg EQ/g d'extrait), puisque les flavonoïdes sont solubles dans les solvants polaires, contrairement à l'extrait organique du chloroforme.

II-2-3- Les pro-anthocyanidines

Les résultats de dosage des pro-anthocyanidines dans les feuilles de *Camellia sinensis* et de *laurus nobilis*, exprimés en mg équivalent catéchine/g d'extrait, sont représentés dans la figure suivante:

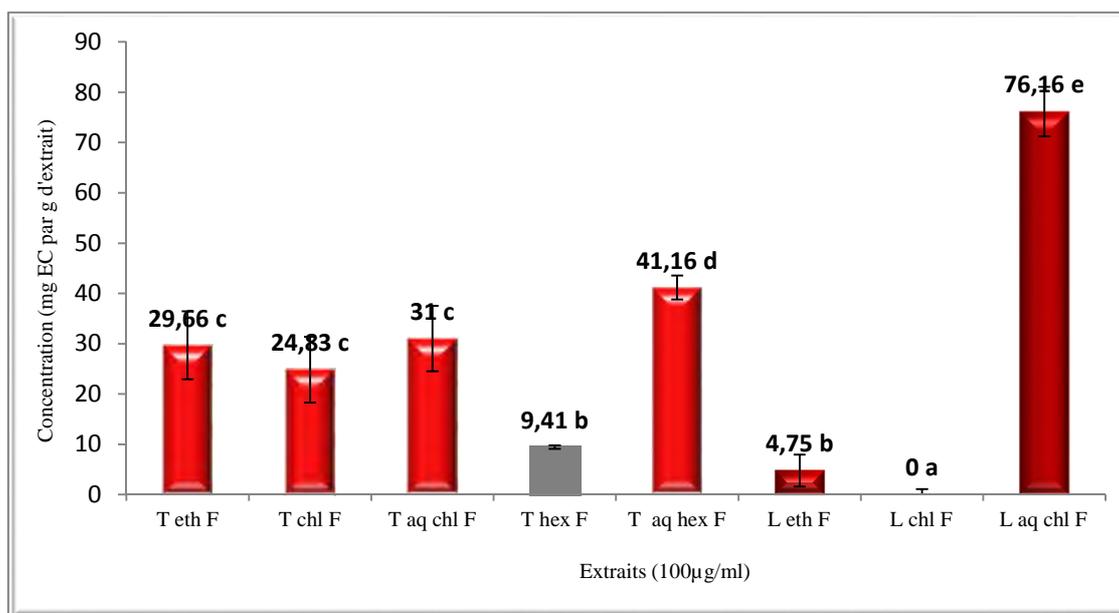


Figure 29: Teneurs en pro-anthocyanidines dans les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis*.

T eth F: Thé ethanol feuille; T Chl F: Thé Chloroforme feuilles; T Aq chlo F: Thé Aqueux du chloroforme feuilles; T Hex F: Thé Hexane feuilles; T Aq hex F: Aqueux d'hexane; L eth F: Laurier ethanol feuille; chl: chloroforme; L Aq chlo F: Laurier Aqueux du chloroforme feuilles.

Figure n° 29 nous a montré que les deux plantes présentent des teneurs appréciables en pro-anthocyanidines; allant de (9.41 ± 0.35) à (41.16 ± 2.36) mg équivalent catéchine (EC)/g d'extrait pour *Camellia sinensis*, avoisinant les 51.41mg équivalent catéchine /g d'extrait correspondant au taux trouvé par Hajimahmood et *al.*, (2008) et allant de (0 ± 1.06) à (76.16 ± 4.93) mg EC /g d'extrait pour *Laurus nobilis*.

Nous faisons remarquer également que ce sont les extraits aqueux qui ont donné les quantités les plus élevées par rapport aux extraits organiques; cela pourrait être dû à la nature biochimique des tanins condensés qui sont des polymères riches en groupements hydroxyles solubles ainsi dans les solvants polaires (Gu et *al.*, 2008).

En outre, l'extrait éthanolique a montré une concentration nettement inférieure à celle de l'extrait aqueux, étant donné que le réactif révélateur (la vanilline) réagit uniquement avec la première unité du polymère de pro-anthocyanidines et à cause de l'encombrement stérique engendré et de la possibilité d'interaction des polymères des pro-anthocyanidines entre eux.

II-3- L'activité anti-oxydante

II-3-1- L'activité scavenging du radical DPPH'

L'étude de l'activité scavenging du radical DPPH' selon le protocole de Hemalatha et *al.*, (2010), nous a fourni les résultats exprimés dans la figure suivante :

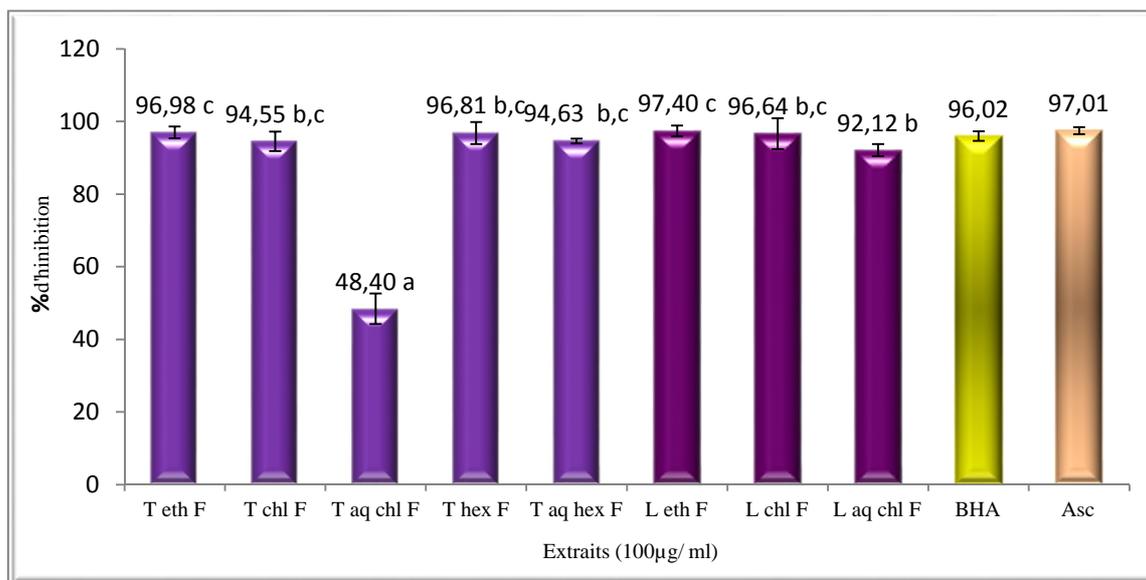


Figure 30: les pourcentages de l'activité scavenging du radical DPPH' des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *laurus nobilis* et des standards. T eth F: Thé ethanol feuille; T Chl F: Thé Chloroforme feuilles; T Aq chlo F: Thé Aqueux du chloroforme feuilles; T Hex F: Thé Hexane feuilles; T Aq hex F: Aqueux d'hexane; L eth F: Laurier ethanol feuille; chl: chloroforme; L Aq chlo F: Laurier Aqueux du chloroforme feuilles.

A partir de cette figure, nous constatons que tous les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* ont dévoilé une très forte activité scavenging du radical DPPH^{*} par rapport aux standards utilisés: l'acide ascorbique et la BHA qui ont donné un pourcentage d'inhibition de $97,01\% \pm 0,95$ et de $96,02\% \pm 1,33$ respectivement (à $100\mu\text{g/ml}$).

L'inhibition du radical DPPH^{*} par les extraits des feuilles des deux plantes montre que les extraits éthanolique ont exhibé les pourcentages d'inhibition les plus importants avec un taux de $96,98\% \pm 1,63$ pour *Camellia sinensis* et de $97,40\% \pm 1,50$ pour *Laurus nobilis*, étant donné que ce sont les extraits bruts, donc ils contiennent la totalité des composés phénoliques riches en groupement OH donneur d'électrons et d'hydrogènes. Cette activité scavenging élevée du radical DPPH^{*} a été déjà rapportée par Markowicz Bastos et *al.*, (2007), avec un taux de $92,20\% \pm 0,52$.

Concernant *Camellia sinensis*, c'est l'extrait organique du chloroforme qui a donné plus que son extrait aqueux correspondant proportionnellement à leur teneur en phénols totaux. Bien que les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et pro-anthocyanidines de l'extrait aqueux d'hexane soient supérieures à celles de l'extrait d'hexane, c'est ce dernier qui a montré le pourcentage le plus élevé; Ce résultat pourrait bien s'expliquer par le fait que l'extrait organique d'hexane posséderait des composés phénoliques doués d'une efficacité fonctionnelle indépendante de la quantité mais de la nature biochimique de ces composés actifs.

Quant à *Laurus nobilis* c'est l'extrait du chloroforme qui a exhibé l'activité la plus importante avec ($92,12\% \pm 1,67$). Ces résultats sont en très bonne corrélation avec ceux du dosage des phénols totaux ($R=0,98$) qui possèdent une très bonne activité anti-radicalaire.

❖ Détermination des IC50

La IC50 est la concentration d'extrait de plante ou de standard pour laquelle 50% des radicaux DPPH[•] sont inhibés.

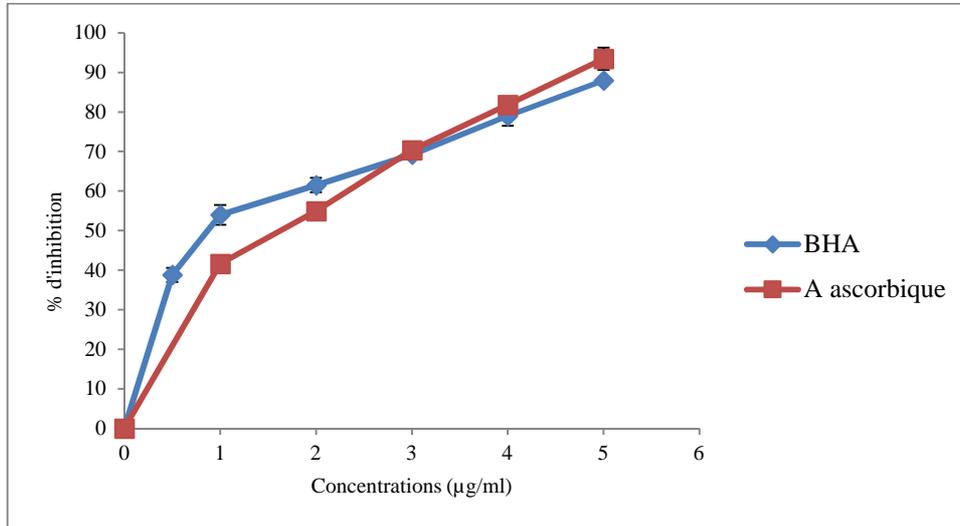


Figure 31: Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH[•] en fonction de la concentration de la BHA et de l'Acide ascorbique.

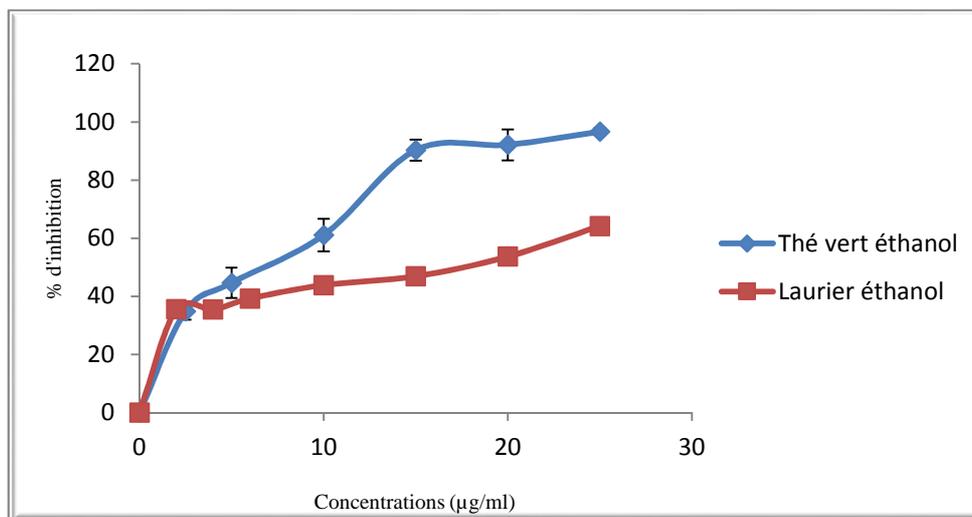


Figure 32: Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du DPPH[•] en fonction de la concentration en extrait éthanolique de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis*.

Les figure ci-dessus montrent que la variation de l'activité scavenging du radical DPPH[•] des extraits et des standards (acide ascorbique et BHA) est dépendante de la concentration, avec des IC50 des extraits éthanolique de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* de 5.79 µg/ml et 9.90 µg/ml respectivement qui se rapproche de celles des standard utilisés qui sont de 0.98 µg/ml et 1.61µg/ml pour la BHA et acide ascorbique respectivement.

Par ailleurs, la valeur de l'IC50 calculée pour l'extrait de *Camellia sinensis* avoisine celle retrouvée par Khalaf *et al.*, (2008) qui est de 6.7 µg/ml. D'autre part, *Laurus nobilis* la IC50 qui est un peu proche de la valeur trouvée par Vardapetyan *et al.*, (2013) qui est de 25.3 µg/ml.

II-3-2- L'activité scavenging du radical ABTS^{•+}

Le radical ABTS^{•+} est largement utilisé pour déterminer l'activité antioxydante des extraits des plantes. L'ABTS^{•+}, en contact avec un donneur d'hydrogène conduit à la forme réduite de l'ABTS et à la décoloration de la solution à 734nm. L'activité scavenging du radical ABTS^{•+} des différents extraits est représentée dans la figure suivante:

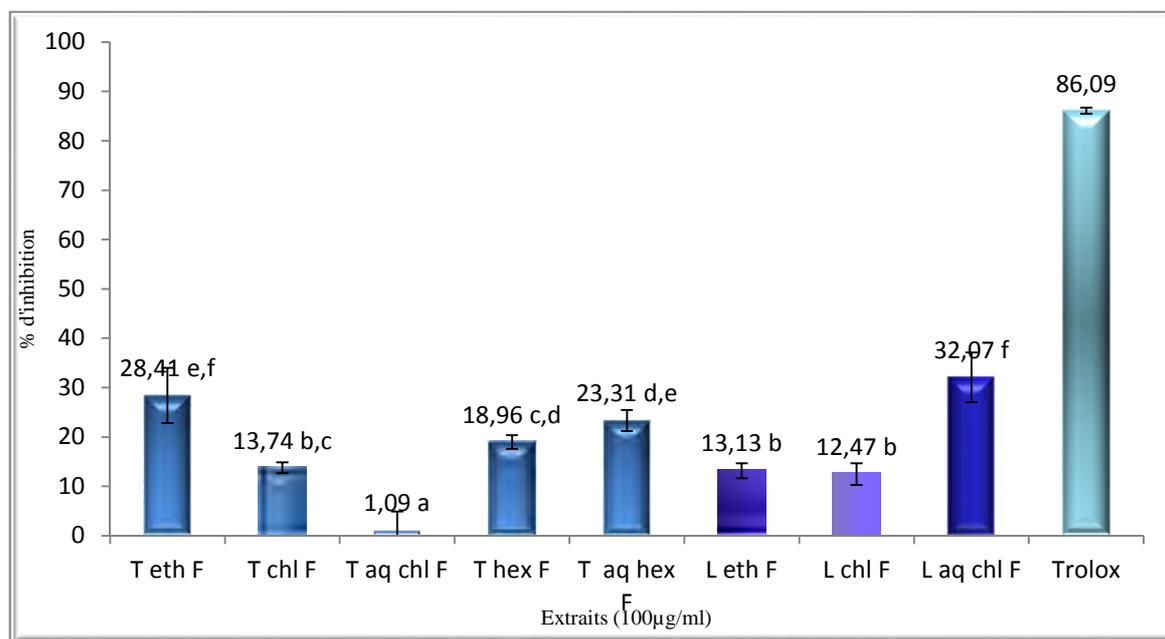


Figure 33: Les pourcentages de l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis* et des standards. T eth F: Thé ethanol feuille; T Chl F: Thé Chloroforme feuilles; T Aq chlo F: Thé Aqueux du chloroforme feuilles; T Hex F: Thé Hexane feuilles; T Aq hex F: Aqueux d'hexane; L eth F: Laurier ethanol feuille; chl: chloroforme; L Aq chlo F: Laurier Aqueux du chloroforme feuilles.

A partir de cette figure, nous constatons que tous les extraits de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* n'ont pas exhibé une forte activité anti-radicalaire à 100 µg/ml, comparativement à l'activité montrée par le standard utilisé : le Trolox, dont le pourcentage d'inhibition du radical ABTS^{•+} a été de 86.09%.

La figure montre que les extraits éthanolique et aqueux d'hexane de *Camellia sinensis* ont exhibé une activité inhibitrice significative qui correspond à 28.41 ± 5.57 % et 23.31 ± 2.13 %, respectivement. Les autres extraits ont montré une activité plus faible. Ces résultats sont en corrélation avec ceux du dosage des phénols totaux ($R=0.55$) qui sont des puissants antioxydants, vu leur richesse en groupements OH donateurs d'électrons et d'hydrogènes.

En revanche, pour *Laurus nobilis* c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a donné l'activité inhibitrice la plus forte qui correspond à $32.97\% \pm 5.02$. Ces résultats sont en bonne corrélation positive avec les teneurs en pro-anthocyanidines ($R = 0.99$) et en flavonoïdes qui sont connus pour leur importante activité anti-oxydante .

En outre, l'extrait éthanolique de *Laurus nobilis* a exhibé une activité antiradicalaire inférieure à celle de l'extrait aqueux du chloroforme; ceci apparait irrationnel étant donné que c'est l'extrait brut. Cela pourrait bien s'expliquer par un encombrement stérique, puisque l'extrait brut ne contient pas que des flavonoïdes et des pro-anthocyanidines; ces derniers sont probablement séquestrés par d'autres composants.

❖ Détermination des IC50

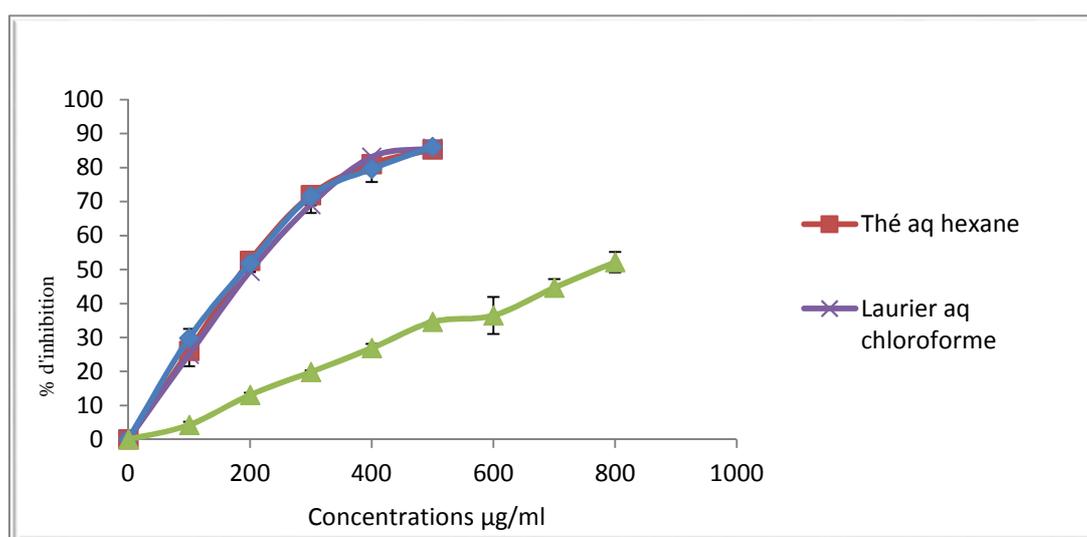


Figure 34: Activité scavenging du radical ABTS^{•+} des différentes concentrations des extraits de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis*.

Comme le montre la figure n° 34, l'activité scavenging du radical ABTS^{•+} est proportionnelle aux concentrations des extraits, avec des IC50 indiquées dans le tableau n qui sont légèrement supérieures à celle du Trolox qui est de 50.18µg/ml (figure n° 35).

Tableau VI: Les IC50 de quelques extraits de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis*

Extraits	IC50
Extrait éthanolique de camellia sinensis	184.19 µg/ml
Extrait aqueux d'hexane de camellia sinensis	188.19µg/ml
Extrait éthanolique de Laurus nobilis	778.36 µg/ml
Extrait aqueux du chloroforme de Laurus nobilis	199.60 µg/ml

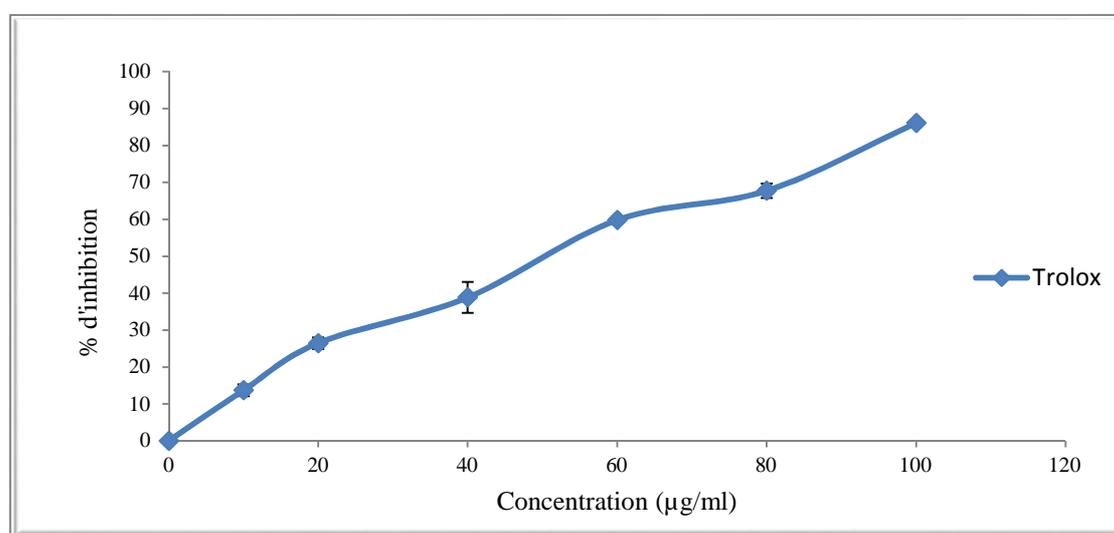


Figure 35: Représentation graphique de l'évolution du pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration en Trolox.

II-3-3- Le pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité antioxydants de l'extrait testé. Les résultats obtenus sont récapitulés dans la figure ci-dessous:

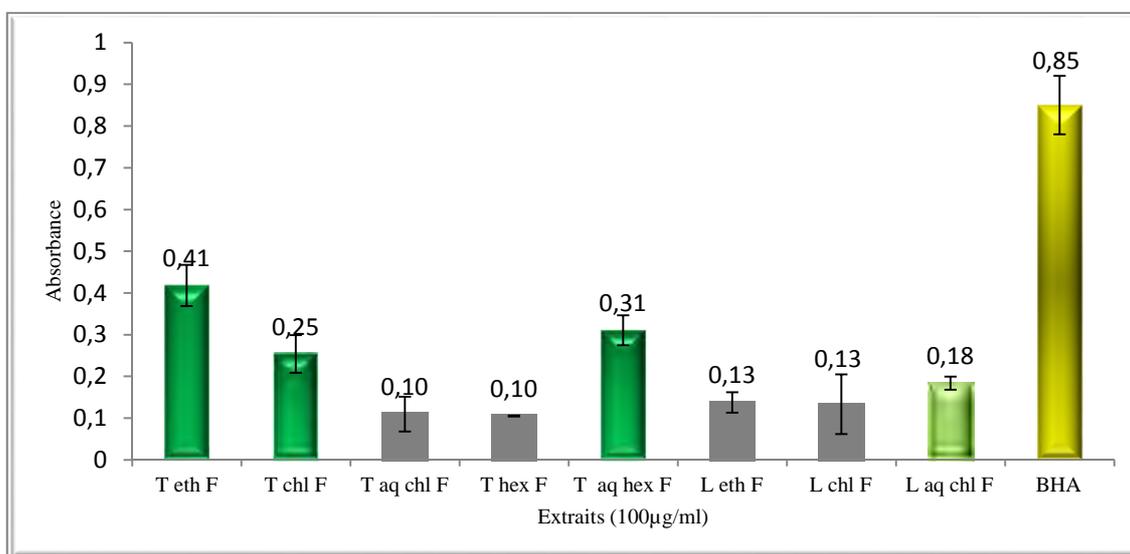


Figure 36: Représentation graphique de l'absorbance de l'ion ferreux (Fe^{2+}) du pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis*. T eth F: Thé ethanol feuille; T chl F: Thé Chloroforme feuilles; T Aq chlo F: Thé Aqueux du chloroforme feuilles; T Hex F: Thé Hexane feuilles; T Aq hex F: Aqueux d'hexane; L eth F: Laurier ethanol feuille; chl: chloroforme; L Aq chlo F: Laurier Aqueux du chloroforme feuilles.

A partir de cet histogramme, on remarque en premier lieu que les extraits des feuilles des deux plantes ne possèdent pas un fort pouvoir réducteur ; il varie (de $0,1 \pm 0,04$ à $0,41 \pm 0,04$) pour *Camellia sinensis*, et (de $0,13 \pm 0,07$ à $0,18 \pm 0,01$) pour *Laurus nobilis* comparativement à la BHA ($0,85 \pm 0,07$). à $100\mu g/ml$.

D'après la figure n° 36 nous remarquons que la capacité la plus élevée pour *Camellia sinensis* a été obtenue avec l'extrait éthanolique ($0,41 \pm 0,04$) ; étant donné que c'est l'extrait brut. Quant au *Laurus nobilis* c'est l'extrait aqueux du chloroforme qui a exhibé le pouvoir réducteur le plus important qui est de $0,18 \pm 0,01$.

On constate également que le pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* est en parfaite corrélation avec les teneurs en phénols totaux ($R = 0,85$) qui contribuent fortement dans le pouvoir réducteur, vu leur capacité à transférer des électrons. Cependant le pouvoir réducteur de *Laurus nobilis* est en parfaite corrélation avec les proanthocyanidines et les flavonoïdes caractérisés par leur abondance en groupements hydroxyles donateurs d'électrons et d'hydrogène.

Finalement nous déduisons que *Camellia sinensis* possèdent un pouvoir réducteur supérieur à celui obtenu par *Laurus nobilis*.

II-4- Fractionnement et caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits par chromatographie sur couche mince

II-4-1- Fractionnement des extraits par chromatographie sur couche mince

Afin d'avoir une appréciation qualitative des composés phénoliques présents dans les huit extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis*, des chromatographies sur couche mince (CCM) comparatives par rapport à quelques standards, ont été réalisées. L'observation des chromatogrammes à la lumière du jour, sous lampe UV et après révélation à la vanilline sulfurique a permis de visualiser différentes fractions. Les rapports frontaux calculés à partir du chromatogramme visualisé à la lumière du jour sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau VII: Les rapports frontaux des différentes fractions visualisées sur le chromatogramme à la lumière du jour des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis*.

Extraits	Rapports frontaux						
Thé vert éthanol	0.32	0.5	0.54	0.60	0.67	0.82	0.98
Thé vert chloroforme	0	0	0.54	0.60	0.70	0.76	0.98
Thé vert aqueux du chloroforme	0	0.46	0.54	0.60	0	0	0
Thé vert hexane	0	0	0.54	0.57	0.71	0.92	0.98
Thé vert aqueux hexane	0	0.5	0.54	0.71	0	0	0.98
Laurier éthanol	0	0.5	0.54	0.67	0.91	0.97	0
Laurier chloroforme	0	0	0.54	0	0.64	0.92	0.98
Laurier aqueux du chloroforme	0	0	0	0	0	0	0
Quercétine			0.54				
Rutine	0.10						
Acide tannique	0.07						
Acide gallique	0.17						
Catéchine		0.53					

La CCM permet de séparer les composants des extraits dans le but de les caractériser. Le profile chromatographique des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* à la lumière du jour est représenté dans la figure 37:

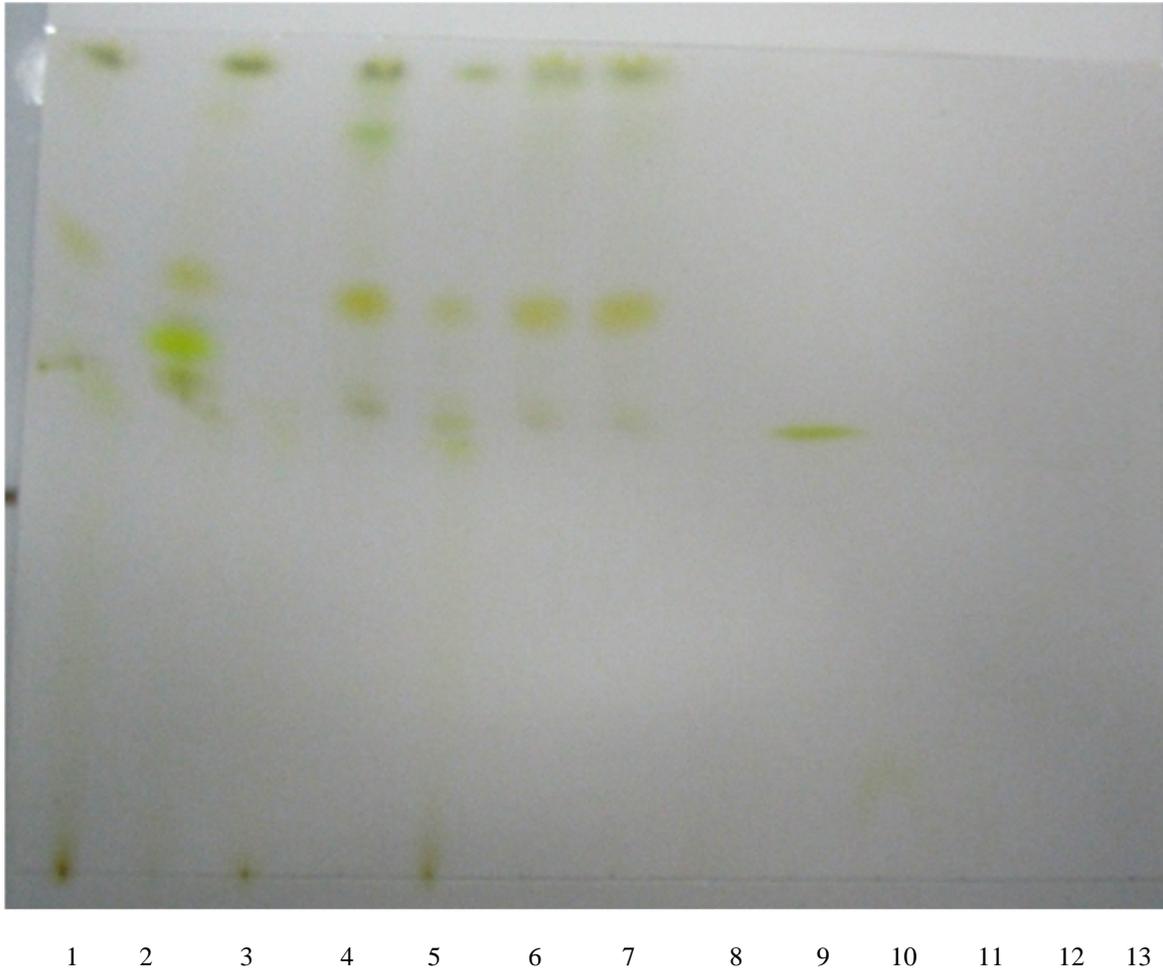


Figure 37: Profile chromatographique à la lumière du jour des extraits des feuilles de: a) *Camellia sinensis*: (1) : extrait éthanolique ; (2) : extrait de chloroforme ; (3) : extrait aqueux de chloroforme ; (4) : extrait d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane. b) *Laurus nobilis*: (6) : extrait éthanolique; (7): extrait du chloroforme ; (8): extrait aqueux du chloroforme. (9) : quercétine; (10): rutine; (11): acide tannique; (12) : acide gallique ; (13) : catéchine.

D'après ce chromatogramme on constate que l'extrait éthanolique a laissé apparaître approximativement toutes les bandes retrouvées dans les différents extraits, que ce soit pour *Camellia sinensis* ou *Laurus nobilis*. On peut constater également la diversité et la richesse des extraits organiques comparés aux extraits aqueux pour *Laurus nobilis*, ce qui nous permet de supposer la richesse de la plante en composés de polarité réduite (Ghasemi et al., 2007).

En comparant les rapports frontaux (RF) ainsi que la coloration des spots observée sur le chromatogramme à la lumière du jour, on a pu identifier la quercétine (RF=0,54) au niveau de la majorité des extraits des deux plantes; cette dernière constitue un très bon scavenger des radicaux libres (**Lakhanpal et Rai, 2007**). Ceci nous permettrait de déduire que les feuilles des deux plantes contiendraient bien de la quercétine (**Mihara et al., 2004; Kaurinovic et al., 2010**).

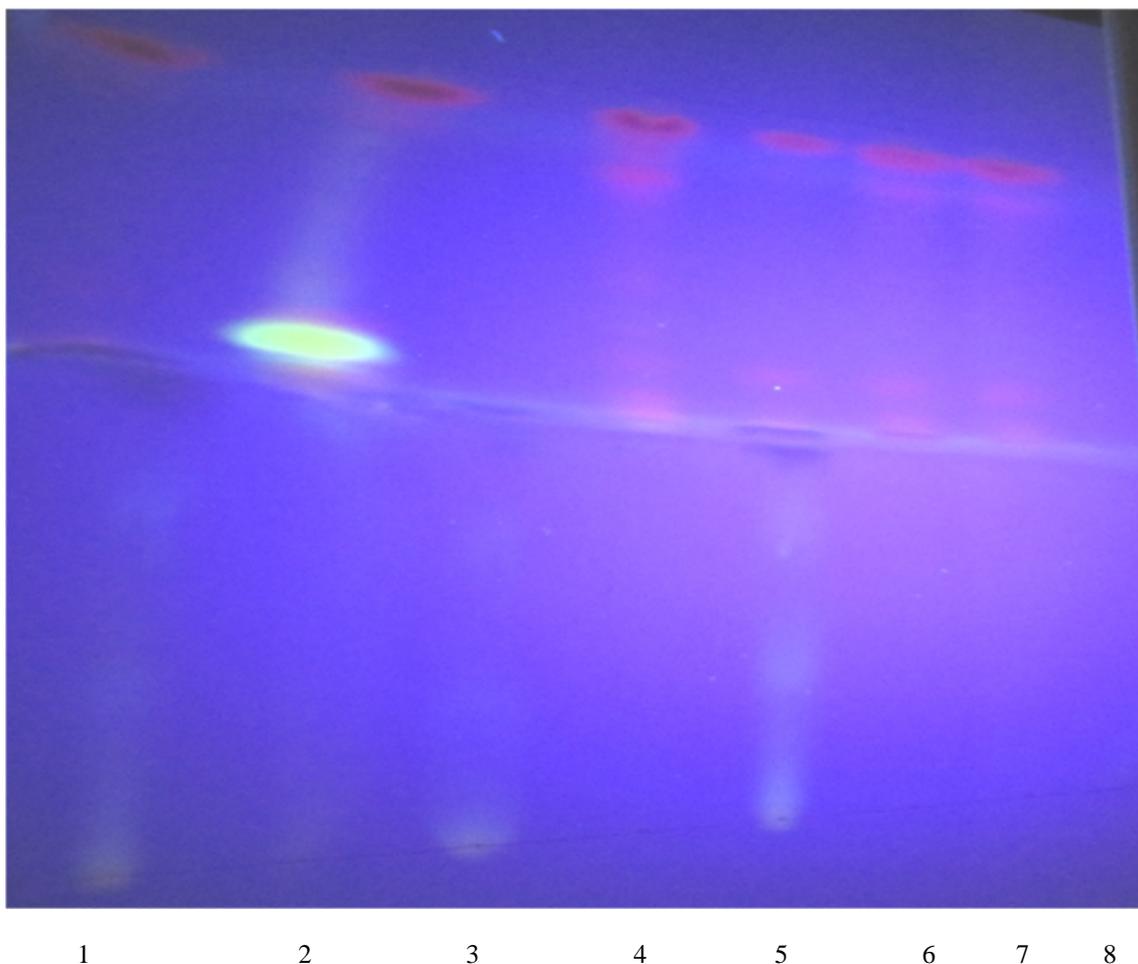


Figure 38: Profile chromatographique sous UV des extraits des feuilles de: a) *Camellia sinensis*: (1): extrait éthanolique; (2): extrait de chloroforme; (3): extrait aqueux de chloroforme; (4) :extrait d'hexane; (5):extrait aqueux d'hexane. b) *Laurus nobilis*: (6): extrait éthanolique; (7): extrait du chloroforme; (8): extrait aqueux du chloroforme.

Le profile chromatographique sous UV nous permet encore une fois de constater que l'extrait éthanolique contient le maximum de spots.

Nous faisons remarquer également que les spots de l'extrait éthanolique pour les deux plantes ont été partagés entre les deux extraits: l'organique et l'aqueux; les bandes des extraits organiques se trouvent dans la partie haute parce qu'elles contiendraient des composés de polarité réduite qui fuiraient la silice et migreraient rapidement (loin); par contre les bandes des extraits aqueux se trouvent dans la partie basse car elles sont de polarité élevée, elles vont donc s'adsorber à la silice.

D'après le chromatogramme, nous observons des spots de différentes couleurs qui sont illustrés dans le tableau suivant:

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

Couleur	Identification
Jaune	Flavonoïdes, Quercétine, coumarines.
Blanc	Flavonols, flavonones, flavones Isoflavonones.
Rose	Hydroxyflavonol, Anthocyanidine
Rose foncé	Tanin, terpènes et triterpènes
Bleu	Acide phénolique, flavonoïdes

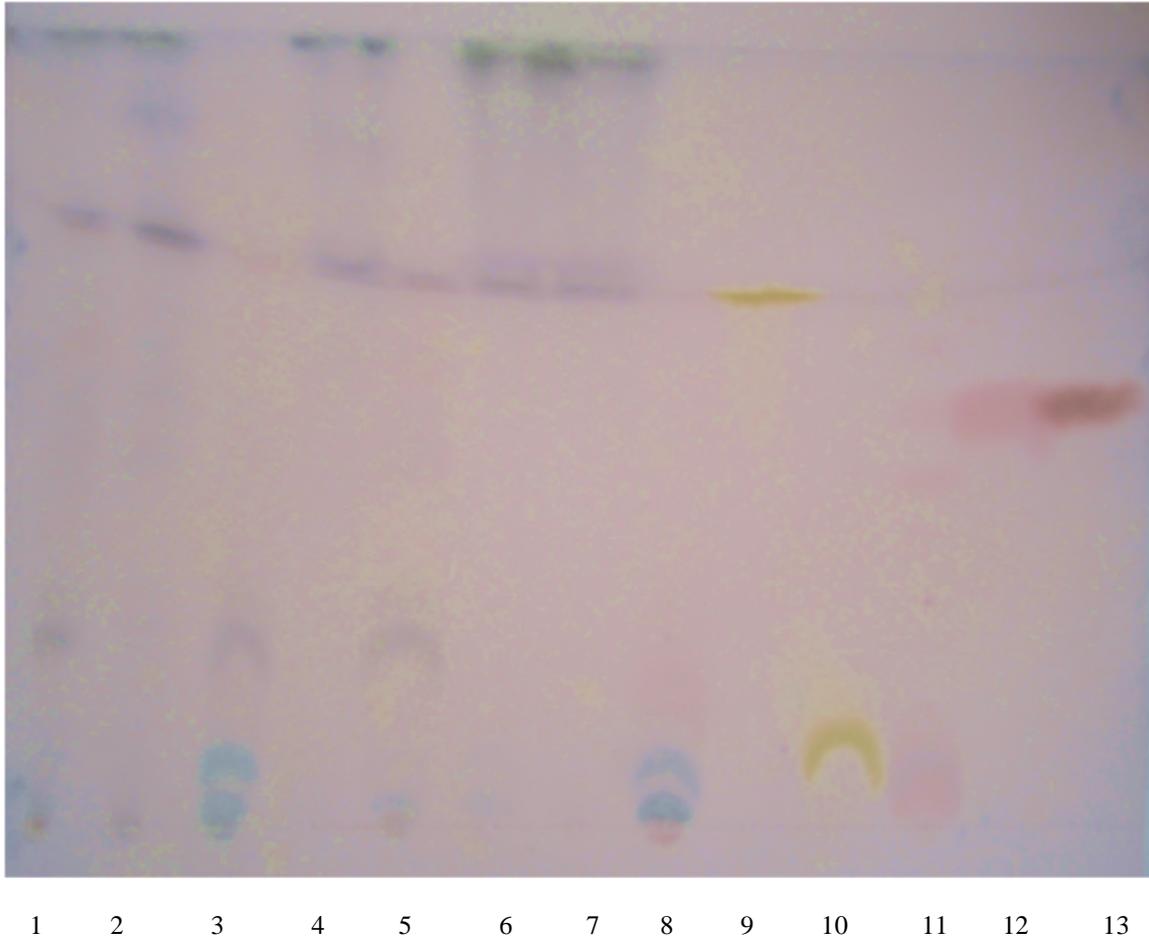


Figure 39: Profile chromatographique des extraits des feuilles des deux plantes pulvérisés par la vanilline sulfurique: a) *Camellia sinensis*: (1) :extrait éthanolique; (2): extrait de chloroforme; (3): extrait aqueux de chloroforme; (4): extrait d'hexane; (5) :extrait aqueux d'hexane. b) *Laurus nobilis*: (6): extrait éthanolique; (7): extrait du chloroforme ; (8): extrait aqueux du chloroforme. (9): quercétine; (10): rutine; (11): acide tannique; (12): acide gallique; (13) : catéchine.

Le profile chromatographique révélé par la vanilline sulfurique des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* (figure 39) montre la présence de plusieurs taches de différentes couleurs qui correspondraient à des composés phytochimiques bien définis (voir tableau IX).

Tableau IX: Les couleurs des bandes des extraits après pulvérisation par la vanilline sulfurique (Akhanovna et al., 2012; Jork et al., 1994):

Couleur	Identification
Bleu	Flavonoïdes
Bleu-vert	Terpènes
Marron	Cineole
Violet	Terpènes et Triterpènes
Vert	Terpène
Rose	Acide tannique
Jaune	Flavonoïdes

Quant aux standards, ils apparaissent sous différentes couleurs à savoir: les flavonoïdes tels que la quercétine et la rutine en jaune, la catéchine en rouge et l'acide tannique et l'acide gallique en rose.

Finalement, d'après les tableaux I et II, on constate que les feuilles de *Camellia sinensis* seraient riches en composés de polarité élevée tels que les flavonoïdes (flavonols, flavonones, flavones, isoflavonones et la quercétine) (Owuor et Obanda, 2007). Tandis que, les feuilles de *Laurus nobilis* se caractériseraient par leur richesse en composés peu polaires tels que les terpènes, triterpènes, cineole, en plus des hydroxyflavonols, anthocyanidines et des tanins (Vardapetyan et al., 2013; Derwich et al., 2009).

II-4-2- Caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits par chromatographie sur couche mince

II-4-2-1 Caractérisation de l'activité scavenging du radical DPPH^{*}

La figure ci-dessous montre le chromatogramme des extraits des deux plantes après pulvérisation avec une solution de DPPH:

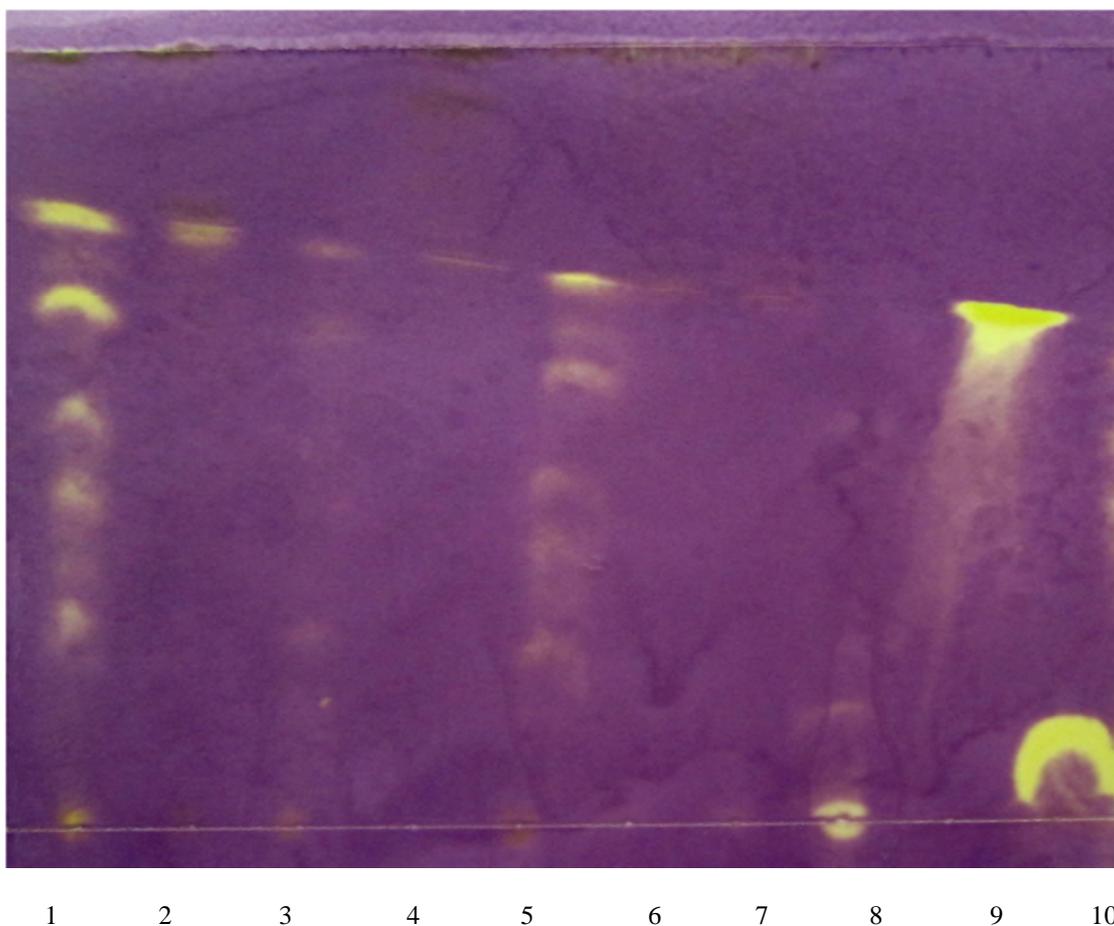


Figure 40: Profile chromatographique des extraits des feuilles des deux plantes pulvérisés par la solution de DPPH: a) *Camellia sinensis*: (1): extrait éthanolique ; (2) : extrait de chloroforme ; (3) : extrait aqueux de chloroforme ; (4) : extrait d'hexane ; (5) : extrait aqueux d'hexane. b) *Laurus nobilis*: (6) : extrait éthanolique; (7): extrait du chloroforme ; (8): extrait aqueux du chloroforme. (9) : quercétine ; (10) : rutine.

Le DPPH^{*} est un radical libre stable de couleur violacée; en présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH^{*} est réduit et change de couleur en virant au jaune (forme réduite). Par conséquent, une bande active se manifeste par une bande jaune signifiant le virage de la couleur violette du DPPH^{*}.

Une vue générale, nous permet de constater que les extraits de *Camellia sinensis* ont une très forte activité scavenging du radical DPPH^{*} comparativement à *Laurus nobilis*.

D'après ces résultats, l'extrait éthanolique de *Camellia sinensis* apparaît le plus actif en manifestant plusieurs bandes de couleur jaune intense, ceci serait évident étant donné que c'est l'extrait brut et de ce fait il constitue la source initiale du reste des extraits des feuilles; suivi par l'aqueux d'hexane et l'aqueux du chloroforme, proportionnellement à leurs concentrations en pro-anthocyanidines et en flavonoïdes qui constituent de puissants agents antioxydants (**Harvsteen, 2002**).

En comparant les rapports frontaux ainsi que la coloration des spots observés sur le chromatogramme, on a pu identifier la quercétine qui se trouve dans la majorité des extraits des deux plantes; cette dernière donne une bande très active étant donné sa forte activité antioxydante (**Liang et al, 2001**).

En outre, la pulvérisation avec la solution de DPPH a révélé des bandes actives au niveau de l'extrait aqueux du chloroforme de *Laurus nobilis*, puisque c'est l'extrait qui a montré une teneur élevée en flavonoïdes et en pro-anthocyanidine (figures n° 28 et n° 29).

II-4-2-2-Caractérisation de l'activité inhibitrice du radical ABTS^{•+}

La figure montre le chromatogramme des extraits des deux plantes après pulvérisation avec une solution d'ABTS:

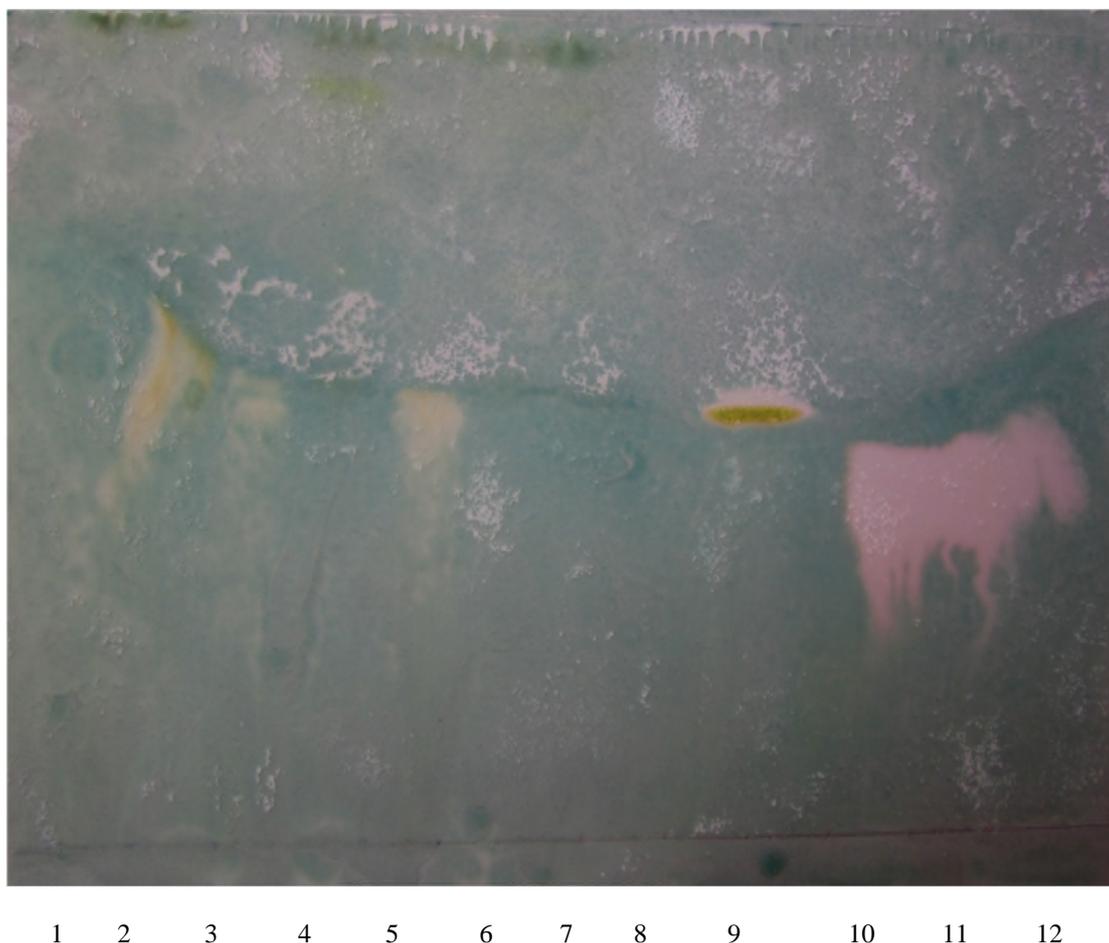


Figure 41: Profile chromatographique de la caractérisation de l'activité inhibitrice du radical ABTS^{•+} des extraits des feuilles des deux plantes: a) *Camellia sinensis*: (1): extrait éthanolique ; (2) : extrait de chloroforme ; (3) : extrait aqueux de chloroforme; (4) : extrait d'hexane ; (5) :extrait aqueux d'hexane. b) *Laurus nobilis*: (6) : extrait éthanolique; (7): extrait du chloroforme; (8): extrait aqueux du chloroforme. (9): quercétine ; (10) : rutine; (11): acide gallique; (12) : catéchine.

Le principe est basé sur la décoloration du radical ABTS^{•+} de couleur bleu-vert. Ceci est clairement apparent (figure 28) pour les standards utilisés, à savoir: la quercétine, la rutine, l'acide gallique et la catéchine. Quant aux extraits des deux plantes, nous observons la décoloration de quelques spots actifs. Ce profile chromatographique nous permet également de constater que *Camellia sinensis* présente une activité scavenging du radical ABTS^{•+} plus importante que celle de *Laurus nobilis* car elle présente plus de bandes actives décolorées.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Camellia sinensis et *Laurus nobilis* sont deux plantes médicinales considérées depuis longtemps comme source majeure des produits utilisés en thérapeutique. Actuellement, ces produits sont identifiés comme étant des métabolites secondaires qui suscitent aujourd'hui beaucoup d'intérêt en raison du bénéfice qu'ils pourraient apporter en termes de prévention des maladies. De ce fait, les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis* ont fait l'objet d'une étude détaillée, commençant par l'extraction et le dosage des composés phénoliques, l'évaluation de leur effet anti-radicalaire et, enfin, la caractérisation de cet effet par chromatographie sur couche mince.

Ainsi, notre étude réalisée sur les extraits des feuilles de *Camellia sinensis*, nous a permis d'émettre les résultats suivants:

- Les taux d'extraction obtenus montrent que *Camellia sinensis* serait plus riche en composés phytochimiques polaires que apolaires, contrairement à *Laurus nobilis* qui serait riche en composés de polarité réduite.
- L'évaluation du contenu en phénols totaux en adoptant la méthode de Folin ciocalteu a révélé des teneurs importantes en composés phénoliques pour les deux plantes.
- Les résultats des dosages des composés phénoliques montrent que les phases aqueuses représentent les teneurs les plus élevées en flavonoïdes et en proanthocyanidines, étant donné que ces derniers sont des composés riches en groupements hydroxyles ce qui leur confère un caractère hydrophile. Ils sont donc solubles dans les solvants polaires.
- En ce qui concerne les activités anti-radicalaires, les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et de *Laurus nobilis* ont montré une forte activité scavenging du radical DPPH[•]. À 100 µg/ml, les meilleurs effets scavenger du radical DPPH[•] ont été obtenus avec les extraits éthanoliques dépassant même celle du standard utilisé (BHA et acide ascorbique), leurs IC50 ont été estimées à 5.79 µg/ml et 9.90 µg/ml, respectivement.

- Les extraits de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* n'ont pas exhibé une forte activité inhibitrice de l'ABTS à 100 µg/ml, comparativement à celle montrée par le standard utilisé (le Trolox).
- La mesure du pouvoir réducteur a montré que les extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* possèdent des capacités réductrices appréciables à 100µg/ml.
- L'analyse chromatographique des extraits des feuilles des deux plantes à la lumière du jour, sous UV et avec la vanilline sulfurique nous a permis d'identifier certains composés phénoliques dont l'un correspondrait probablement à la quercétine chez les deux plantes, avec l'éventuelle présence des acides phénoliques et des flavonoïdes chez *Camellia sinensis*; quant à *Laurus nobilis*, on a pu identifier en plus des flavonoïdes, des cinéoles, des terpènes et des triterpènes.
- La caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits des feuilles de *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis* par chromatographie sur couche mince a confirmé leur richesse en divers composés doués d'une forte activité anti-radicalaire.
- En fin, l'activité anti-oxydante peut être attribuée à la présence des polyphénols dans les extraits, les résultats indiquent une forte corrélation entre les activités anti-oxydantes testées et les composés phénoliques, suggérant que les composés phénoliques sont probablement responsables de cette activité.

Notre étude, même générale, nous permet de conclure que les extraits des deux plantes constituent une source inestimable en divers composés phénoliques doués d'activité anti-oxydante, 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 intéressant de :

- purifier et d'identifier les principes actifs responsables de ces activités par des techniques plus performantes telles que HPLC, GC-MS et RMN. Aussi, il serait important de suivre cette étude par des applications *in vivo* en étudiant la toxicité de ces composés, leur activité antimicrobienne et anticancéreuse.

Glossaire

Acide urique: Acide présent dans le sang, produit par la dégradation des acides nucléiques et qui s'élimine par les urines.

Adénosine triphosphate (ATP): Est une substance chimique qui participe à la transformation du glycogène en glucose dans les organismes vivants.

Alvéoles pulmonaires: Sont, dans les poumons, les lieux où se font les échanges gazeux entre l'air et le sang. Ils se situent aux extrémités des bronchioles. Ils font partie des voies aériennes intrathoraciques.

Alzheimer : Maladie chronique du cerveau altérant les facultés intellectuelles de façon irréversible.

Apoptose: Mort cellulaire programmée selon un programme génétique établi.

Arbuste : Petit arbre (en générale moins de 5 m à l'âge adulte).

Cancer : Maladie caractérisée par la prolifération anarchique de cellules malignes qui essaient et détruisent de proche en proche les tissus sains.

Cardio-vasculaires: Sont les maladies qui concernent le cœur et la circulation sanguine.

Cataracte : Opacité du cristallin, entraînant une baisse de la vue, pouvant évoluer.

Citrulline: Est un acide aminé non protéique, c'est-à-dire qu'il n'entre pas dans la composition des protéines.

Dismutation: Réaction d'une espèce moléculaire (ou radicalaire) sur elle-même, générant simultanément une espèce plus oxydée et une espèce plus réduite que la molécule de départ.

Endothélium: Tissu qui tapisse la paroi interne des vaisseaux et du cœur.

Hypoxanthine: Désigne la base purique de certains ARNt, formée par désamination de l'adénine par une adénase.

lancéolée: Est une feuille dont le limbe a l'aspect d'une lance étroite.

Mitochondrie: Organite intracellulaire où siège le métabolisme énergétique de la cellule.

Mutagenèse: Est le processus d'apparition d'une mutation, il peut être naturel ou artificiel.

Ombelle: Mode de disposition des fleurs sous la forme d'un parasol.

Parkinson: Est une des maladies neurodégénératives les plus répandues. Elle se traduit par une destruction lente et progressive des neurones de la substance noire du cerveau.

Phagocytose: Est le processus cellulaire par lequel les microbes sont détruits par certaines catégories de leucocytes, appelés phagocytes.

pivotante: Est un type racinaire caractérisé par la présence d'une racine principale d'où émergent des racines latérales secondaires.

Quinone: Composé benzénique utilisé dans la fabrication de certains produits colorants.

Scavenger : Stress oxydant (situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux libre).

thiyles: Formé par L'oxydation monoélectronique des thiols par radicaux oxydants .

Tonus: Etat de légère tension des muscles au repos qui détermine la position, les attitudes du corps .

. **Transduction de signal:** Désigne le mécanisme par lequel une cellule répond à l'information qu'elle reçoit, par des agents chimiques ou autres signaux.

Xanthine: Est une substance issue de la désamination (on enlève un $-NH_2$) des bases puriques (adénine et guanine).

*Références
bibliographiques*

References bibliographiques

- **A**bdou Bouba, A., Njintang, Y.N., Scher, J., and Mbofung, C.M. (2010). Phenolic compounds and radical scavenging potential of twenty Cameroonian spices. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(3): 213-224.
- Adrian, J., Potus, J., and Frangne, R. (1995). *La science alimentaire de A à Z*. Paris : Ed Tec & Doc. 2^e éd p: 32.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., and Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7):636-643.
- Ahmad, N., and Hasan, M. (1999). Green tea polyphenols and cancer: biological mechanisms and practical implications. *Nutrition Review*, 57(3): 78-83.
- Ahmad, S. (1995). *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. New York: Ed Chapman & Hall. 1^e éd. pp: 1-457.
- Aké, B., Mamidou, W. K., Kamanzi, A.T., and Aké, M. (2006). Évaluation de quelques propriétés biologiques de produit de cueillette non ligués vendus sur les marchés d'Abidjan et ses environs. *Pharm. Méd. Trad. Afr.*, 14: 1-17.
- Akhanovna, M. B. J., Benson, B. B., Christian, K. K., and Yves-Alain, B. (2012). Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de 2 plantes antihypertensives utilisées à N'gramanssabo en Côte d'Ivoire. *Nature & Technologie*, 8: 2-12.
- Arnal-Schnebelen, B., Goetz, P., Paris, M., Grassart, E., Hunin, M., Iserin, P., Jacquemin, M., Lejeune, R. and Leroux, J. (2008). *Les plantes médicinales*. Ed Selection du Reader's Digest, 2^e éd p: 214.
- Ashihara, H., Sano, H., and Crozier, A. (2008). Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*. 69: 841-856.
- **B**a, K., Tine, E., Destin, J., Cissé, N., and Thonart, P. (2010). Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 14 (1): 131-139.
- Barouki, R. (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences*, 22(3): 266-72.

- Barreira, J.C.M., Ferreira, I. C. F. R. Oliveira, M. B. P. P. and Pereira, J. A. (2008). Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, 107: 1106-1113.
- Baudin, B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*, 2 (1): 43-52.
- Baxter, N. J., Williamson, M. P., Lilley, T. H., and Haslam, E. (1996). Stacking interactions between caffeine and methyl gallate. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 92(2): 231-234.
- Beal, M.F. (1995). Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of neurology*, 38(3):357-366.
- Beani, J.C. (1995). Actions biologiques du rayonnement solaire sur la peau. *Revue Internationale de Pédiatrie*, 259:2-7.
- Blasundram, N., Sundram K. and Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1): 191-203.
- Boek, D., and Larcier, S.A. (2006). *Biochimie structurale et métabolique*. bruxelles. 3^e éd. p 327.
- Boizot, N., and 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., Thérond, P., and Delattre, J. (2003). Radicaux libres et antioxydants. In: *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Delattre, J., Durand, G., and Jardillier J.C. Paris : Flammarion pp: 59-81.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2007). Stress oxydant et vieillissement. *Spectra biologie*, 157:23-26.
- Bossu, C. M., Ferreira, E. C., Chaves, F. S., Menezes, E. A., and Nogueira, A. R. A. (2006). Flow injection system for hydrolysable tannin determination. *Microchemical Journal*, 84(1): 88-92.
- Bozan, B., and Karakaplan, U. (2007). Antioxidants from laurel (*Laurus nobilis* L.) berries: Influence of extraction procedure on yield and antioxidant activity of extracts. *Acta Alimentaria*, 36(3), 321-328.

- Bruneton, J. (1993). Composés phénoliques: Shikimate-acétates. In: «Pharmacognosie: phytochimie, Plantes médicinales». Paris : Tec &Doc . Lavoisier edition. Chap. 3: pp199-383.
- **C**abrera, C., Artacho, R., and Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea, a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2): 79-99.
- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.L., and Sauvaigo, S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biological Chemistry*, 383(6): 93-100.
- Chelikani, P., Fita, I., and Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Molecular Life Science*, 61(2):192-208.
- Chen, C.W., and Ho, C.T. (2007). Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *Journal of Food Lipids*, 2 (1): 35-46.
- Cicco, N.T., Lanorte, M., 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 (1): 107-110.
- Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D., and Menichini, F. (2006). Comparative Chemical Composition and Antioxidant Activities of Wild and Cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (10): 2056-2064.
- Cos, P., Ying L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van-Poel B., Pieters, L., Vlietinck, A. J., and Berghe, V. D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61(1):71-76.
- Costantini, D., and Moller, A.P. (2008). Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology*, 22(2): 367–370.
- Cuvelier, C., Dotreppe, O., and Istasse, L. (2003). Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Méd. Vet*, 147: 315-324.
- **D**ai, J., and Mumper, R.J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10):7313-7352.

- De La Torre, R., Casado, A., López-Fernández, E., Carrascosa, D., Ramírez, V., and Sáez, J. (1996). Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia*, 52(9):871-873.
- De Moffarts, D.B., Kirschvink, N., Pincemail, J., and Lekeux, P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Annales Médecine Veterinaire*, 149(1):1-9.
- Defraigne, J.O., and Pincemail, J. (2007). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liege*, 62:1-9.
- Delattre, J., Beaudoux, J.L., and Bonnefont-Rousselot D. (2005). *Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques*. Paris : TEC & DOC. Lavoisier édition, p 547.
- Deneke, S.M., Fanburg, B.L. (1989). Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 257(4):163-173.
- Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Boloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., and Lele, R.D. (2004). Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *JAPI2004*, 52: 794-804.
- Droge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82(1): 47–95.
- Du, G.J., Zhang, Z., Wen, X. D., Yu, C., Calway, T., Yuan, C.-S.; Wang, C.Z. (2012). Epigallocatechin Gallate (EGCG) Is the Most Effective Cancer Chemopreventive Polyphenol in Green Tea. *Nutrients*, 4: 1679-1691.
- Dulloo, A.G., Duret, C., Rohrer, D., Girardier, L., Mensi, N., Fathi, M., ... and Vandermander, J. (1999). Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 70(6):1040-1045.
- **E**l Abed, K., Trabelsi, K., Gharbia, A., Masmoudia, L., Hakim, A., Zbidi, A., and Tabkaa, Z. (2009). Cinétique des antioxydants enzymatiques au cours de la récupération après le test de Wingate : étude comparative entre judokas et sédentaires. *Science et sports*, 24(6):302-307.
- Elhoussine, D., Benziane, Z., and Boukir, A., (2009). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4): 3818-3824.

- Emam, A.M., Mohamed, M.A., Diab, Y.M., and Megally, N.Y. (2010). Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of *Laurus nobilis* and *Emex spinosus*. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 4(3): 202-207.
- **F**ang, Y.Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10):872-879.
- Faraci, F. M., Didion, S. P. (2004). Vascular Protection Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall. *Thrombosis and Vascular Biology*, 24(8):1367-1373.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 11:108-115.
- Favier, A. (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 64(6): 390-396.
- Favier, A., Hercberg, S., and Galan, P. (2006). Effets biologiques des anti-oxydants: les données de l'étude SU. VI. MAX. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 13(1): 35-38.
- Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P.L., Ceccarini, L., Ricci, A.S., and Longo, I.(2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *J. Chromatogr*, 1143 : 36-40.
- Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., and Lerverve, X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11: 411.
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *The American journal of medicine*, 97(3):5-13.
- **G**adow, A., Joubert, E. and Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*, 60: 73 -77.
- Galaris, D., Mantzaris, M., Amorgianiotis, C. (2008). Oxidative stress and aging: the potential role of iron. *Hormones*, 7(2):114-122.
- Galaris, D., and Evangelou, A. (2002). The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Oncology Hematology*, 42:93-103.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91-96.

- Gervaise, Y. (2004). Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. *Polyphénols-Euroforum*, 1-3
- Ghasemi, E., Yamini, Y., Bahramifar, N., and Sefidkon, F. (2007). Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Artemisia siebe*. *Journal of food engineering*, 79(1), 306-311.
- Gill, I., Plotkine, M., and Lerouet, D., (2005). Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(4): 429 – 443.
- Goudable, J., Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11(2):115-120.
- 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.
- Guiland, J.C. (2011). Les interactions entre les vitamines A, D, E et K : synergie et/ou compétition. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 18(2): 59-67.

- **H**ajimahmoodi, M., Hanifeh, M. R. , Oveisi, M., Sadeghi, N., Jannat, B. (2008).

Determination of total antioxidant capacity of green teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* 5(3): 167-172.

- Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O., Usman, L.A., Ameen, O.M. and Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8):142-151.
- Handique, J.G., and Baruah, J.B. (2002). Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive and Functional Polymers*, 52(3):163-188.
- Harraz, M.M., Marden, J.J., Zhou, W., Zhang, Y., Williams, A., Sharov, V.S., Nelson, K., Luo, M., Paulson, H., Schoneich, C. and Engelhardt, J.F. (2008). SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *The Journal of clinical investigation*, 118(2): 659-670.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2): 67– 202.
- Hemalatha, S., Lalitha, P. and Arulpriya, P. (2010). Antioxidant activities of the extracts of the aerial roots of *Pothos aurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, 2 (6): 84-89.

- Hernández Figueroa, T.T., Rodríguez-Rodríguez, E., and Sánchez-Muniz, F.J. (2004) The green tea, a good choice for cardiovascular disease prevention?. *Arch Latinoam Nutr.*, 54(4):380-94.
- Herrmann, K.M. (1995). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell*, 7(7):907-919.
- Hinneburg, I., Damier-Dorman, H.J. and Hiltunen, R.(2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97: 122- 129.
- **J**ayanthi, P., and Lalitha, P. (2011). Reducing power of the solvent extracts of *Eichhornia Crassipes* (MART.) Solms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (3): 126-128.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W. and Wimmer, H. (1994). Thin-Layer Chromatography: reagents and detection methods. 1: 448.
- Jung, T., Bader, N., and Grune, T. (2007). Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2): 231-237.
- Jung, Y. D., and Ellis, L. M. (2001). Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a major component of green tea. *International journal of experimental pathology*, 82(6) : 309-316.
- **K**aliora, A.C., Dedoussis, G.V.Z., and Schmidt, H. (2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, 187(1): 1-17.
- Kasote, D.M. (2013). Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *International Food Research Journal*, 20(1): 27-34.
- Katiyar, S. K., Perez, A., & Mukhtar, H. (2000). Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. *Clinical cancer research*, 6(10): 3864-3869.
- Katiyar, S. K., Perez, A., and Mukhtar, H. (2000). Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA. *Clinical cancer research*, 6(10): 3864-3869.
- Kaurinovic, B., Popovic, M., and Vlasisavljevic, S. (2010). In vitro and in vivo effects of *Laurus nobilis* L. leaf extracts. *Molecules*, 15(5), 3378-3390.

- Khanbabaee, K., and Ree, T. (2001). Tannins: classification and definition. *Natural product reports*, 18(6):641-649.
- Koechlin-Ramonatxo, C.(2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et métabolisme*, 20(4): 165-177.
- Kunwar, A., and Priyadarsini, K.I. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical & Allied Sciences*, 1(2):53-60.
- **L**ai, T.N.H., Herent, M.F., Quetin-Leclercq, J., Nguyen, T.B.T., Rogez, H., Larondellea, Y., and André, C.M. (2013). Piceatannol, a potent bioactive stilbene, as major phenolic component in *Rhodomyrtus tomentosa*. *Food Chemistry*, 138:1421-1430.
- Lakhanpal, P., and Rai, D.K. (2007). Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2(2), 22-37.
- Le, K., Chiu, F., and Ng, K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105: 353–363.
- Lee, J., Koo, N., and Min, D.B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1): 21-33.
- Liang, Y., Ma, W., Lu, J., and Wu, Y. (2001). Comparison of chemical compositions of *Ilex latifolia* Thunb and *Camellia sinensis* L. *Food Chemistry*, 75(3): 339–343.
- Lin, C.M., Chen, C.S., Chen, C.T., Liang, Y.C., and Lin, J. K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(1): 167-172.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American journal of clinical nutrition*, 78(3): 517-520.
- Liu, J., Xing, J., and Fei, Y. (2008). Green tea (*Camellia sinensis*) and cancer prevention: a systematic review of randomized trials and epidemiological studies. *Chinese medicine*, 3(1) :12.
- **M**acchioni, F., Perrucci, S., Cioni, P., Morelli, I., Castilho, P., and Cecchi, F. (2006). Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. *Journal of Essential Oil Research*, 18(1), 111-114.

- Macheix, J. J., Fleuriet, A., and Sarni-Manchado, P. (2006). Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, réparation et rôle *in* les polyphénols en agroalimentaire. *Edition Technologie et document, paris*: pp380- 398.
- Maeda, H., Sakuragi, Y., Donald A. Bryant, D.A., and DellaPenna, D. (2005). Tocopherols Protect *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 from Lipid Peroxidation. *Plant Physio*, 138(3): 1422–1435.
- Mahmood, T., Akhtar, N., and Khan, B.A. (2010). The Morphology, Characteristics, and Medicinal Properties of *Camellia sinensis*' Tea. *J Med Plant Res*, 4: 2028-2033.
- Malešev, D., and Kuntic, V. (2007). Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(10):921–939.
- Mamoudou, H.D., Gruppen, H., Alfred, S.T., Voragen, A.G.J., and Willem, J.H.B. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1 (1): 21-38.
- Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. *Thèse de doctorat. Université de limoges*, P:7-62.
- Margail, I., Plotkine, M., and Lerouet, D. (2005). Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(4): 429-443.
- Marnett, L.J. (1999). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3): 361-370.
- Matés, J.M., perez-Gomez, C., and Castro, N.I. (1999). Antioxydant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8):595-603.
- Matés, J.M., Sánchez-Jiménez, F. (1999). Antioxidant Enzymes and their Implications in Pathophysiologic Processes. *Frontiers in Bioscience*, 4:339-345.
- Menvielle-Bourg, E.J. (2005). Superoxide Dismutase (SOD), a Powerful antioxidant, is now available orally. *Phytothérapie*, 3:1-4.
- Middleton, E., Kandaswami, C., and Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.

- Mihara, R., Mitsunaga, T., Fukui, Y., Nakai, M., Yamaji, N., and Shibata, H. (2004). A novel acylated quercetin tetraglycoside from oolong tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Tetrahedron Letters*, 45(26): 5077–5080.
- Milane, H.(2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat. Université de Louis Pasteur*. p 155.
- Milde, J., Elstner, E.F., and Grabmann, J.(2004). Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, α -terpinene, and ascorbic. *Phytomedicine*, 11: 105-113.
- Miller, N.J., and Rice-Evans, C.(1997). Factor influencing the antioxydant 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. *Original article*, 26(2): 211-219.
- Moridani, M.Y., Pourahmad, J., Bui, H., Siraki, A. and O'Brien, P.J.(2003). Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Boilogy and Medcine*, 34(2): 243-253.
- Muñoz-Márquez, D.B, Martínez-Ávila, G.C., Wong-Paz, J.E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. 20(5):1149-54.
- Musialik, M., Kuzmicz, R., Pawłowski, T.S., and Litwinienko, G.(2009). Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *The Journal of Organic Chemistry*, 74(7): 2699-2709.
- Namita, P., Mukesh, R., and Vijay, K.J. (2012). *Camellia Sinensis* (green tea): a review. *Global. J. Pharmacol*, 6: 52-59.
- Nookabkaew ,S., Rangkadilok, N., and Satayavivad, J. (2006). Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. *J Agric Food Chem*, 54:6939-6944.
- Ogle, N. (2009). Green tea *Camellia sinensis*. *Australian Journal of Medical Herbalism*, 21(2): 1-3.
- **O**gunlana, O.E., and Ogunlana, O.O. (2008). *In vitro* assessment of antioxidant activity of *Newbouldia laevis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(8): 176-179.

- Owuor, P.O., and Obanda, M. (2007). The use of green tea (*Camellia sinensis*) leaf flavan-3-ol composition in predicting plain black tea quality potential. *Food Chemistry*, 100(3): 873–884.
- Oyedemi, S.O., and 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**adayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., and Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1):18-35.
- Papagiannopoulos, M., and Galensa, R. (2005). Increased retention of polar flavonoids in RP-HPLC on a polaris amide C18 column. *Application Food*, 12-13.
- Pekiner, B.D. (2003). Vitamin E as an antioxidant. *J. Fac. Pharm Ankara*, 32 (4) 243-267.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huyc, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2): 89-96.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal Natural Products*, 63(7):1035-1042.
- Pincemail, J., Limet, R., and Defraigne, J.O. (2001). Stress oxydant et transmission cellulaire: implication dans le développement du cancer. *Medi.Sphere*, 134:1-4.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., and Defraigne, J. (1999). Evaluation du stress oxydant: une réalité pour le médecin généraliste. *Vaisseaux, Cœur, Poumon*, 4:148-154.
- Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., and Defraigne, J.O.(1998). Fumée de cigarette: une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. *Medi Sphère*, 78: 37-39.
- Poston, L., and Raijmakers, M.T.M.(2004). Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome a review. *Placenta*, 18 :72-78.
- **R**ahim, A.A., Rocca, E., Steinmetz, J., Kassim, M.J., Ibrahim, M.S., and Osman, H. (2008). Antioxidant activities of mangrove *Rhizophora apiculata* bark extracts. *Food Chemistry*, 107: 200-207.

- Re, D.B., Nafia, I., Nieoullon, A., Le Goff, L.A., and Had-aussouni, 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.
- Re, R., Pellegrini, N.A., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.*, 26: 1231-1237.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris : Dunod. pp : 91-107.
- Richter, G. (1993). *Les composés phénoliques métabolismes des végétaux (physiologie et biochimie)*, 3^e ed. Ed Dunod: pp : 317-339.
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., and al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415):59-62.
- Roussel, A.M., and Ferry, M. (2002). Stress oxydant et vieillissement. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4): 285-291.
- Rozanowska, M., Jarvis-Evans, J., Korytowski, W., Boulton, M. E., Burke, J. M., and Sarna, T. (1995). Blue light-induced reactivity of retinal age pigment in vitro generation of oxygen-reactive species. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32):18825-18830.
- Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., and Kovač, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4):852-858.
- Rustin, P., Von Kleist-Retzow, J.C., Vajo, Z., and Munnich, A. (2000). Defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality or mythochondria. *Mech Ageing Dev*, 114(3):201-206.
- **S**alvayre, A.N., Salvayre, R. (2005). Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif: implication en physiopathologie vasculaire. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 12 (5): 433-438.
- Santos, F.A., and Rao V.S.N. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1.8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, 14: 240-244.

- Saraf, S., Ashawat, M.S., and Saraf, S. (2007). Flavonoids: A Nutritional Protection against oxidative and UV induced cellular damages. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 30- 40.
- Scharbert, S., and Hofmann, T. (2005). Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *J Agric Food Chem*, 53:5377-84.
- Schisler, N.J., and Singh, S.M.(1989). Effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free radicals. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(2): 117-123.
- Schofield, P., Mbugua, D.M. and Pell, A.N. (2001). Analysis tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91: 21- 40.
- Sebastian, J., Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S.K., and Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1):18-35.
- Sennequier, N., Sandrine., Goff, V.L. (1998). Biosynthèse de monoxydes d'azote(NO):mécanisme, régulation et contrôle. *médecine/sciences*, 14 : 1185-1195.
- Sereme, A., Millogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., and Nacro M. (2010). Anatomie et concentration des tanins des plantes tannifères du burkina faso. *Journal des Sciences*, 10(2): 24-32.
- Sergio, A.R., and Robert, M. (1999). β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5):426-433.
- Seyoum, A., Asres, K., and El-Fiky, F.K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67:2058-2070.
- Shahriar, K.R.J.(2010). Marles Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*, 15: 7985-8005.
- Sharangi, A. B. (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) –A review. *Food research international*, 42(5): 529-535.
- Singal, P.K., Petkau, A., Gerrard, J.M., 1988. Free Radicals in health and disease. *Mol.Cell.Biochem.*, 121-122.
- Singleton, V.L., and Rossi, J.A.(1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-Phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.

- Sinija, V.R., and Mishra H.N. (2008). Green tea: Health benefits. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*, 17(4): 232–242.
- Sorg, O.(2004).Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, 327:649-662.
- Tanaka , J., Hirai, N., Taniguchi, F., and Yamaguchi, S.(2004). Estimations of the genomesizes of *Camellia sinensis*, *C. japonica* and their interspecific hybrids by flow cytometry. *Tea Res J*, 98: 88-89.
- Tariq, M. A. , Naveed, K., and Barkat, A. (2010). The morphology, characteristics and medicinal properties of ‘*Camellia sinensis*’ tea. *J. Med. Plants Res*, 4(19): 2028-33.
- **T**hannickal, V.J., and Fanburg, B.L.(2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279(6):1005-1028.
- Tiqwari, A.K.(2001). Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current science*, 81(9): 1179-1181.
- Tsao, R., and Deng, Z.(2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography*, 812: 85-99.
- Tweeddale, H.J., Kondo, M., and Gebicki, J.M. (2007). Proteins protect lipid membranes from oxidation by thiyl radicals. *Archives of biochemistry and biophysics* 459(2):151-8.
- **V**alko, M., Rhodes, C.J., Moncol, L., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1): 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1):44-84.
- Vardapetyan, H., Tiratsuyan, S., Hovhannisyan, A., Rukhkyan, M., and Hovhannisyan, D. (2013). Phytochemical composition and biological activity of *Laurus nobilis* l. leaves collected from two regions of south caucasus. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 1(2): 46-51.
- Vergely, C., and Rochette, L. (2003). Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique Cardiologie*, 1(3):131-139.

- Vorbach, C., Harrison, R., and Capecchi, M.R. (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends in Immunology*, 24 (9): 512-517.
- Wachira, F.N., Tanaka, J., and Takeda, Y. (2001). Genetic variation and differentiation in tea germplasm revealed by RAPD and AFLP variation. *J Hort Sci Biotechnol*, 76(5), 537-563.
- **W**eaver, L.M., and Herrmann, K.M., (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science*, 2(9):346-351.
- Wei, Y.H., Lu, C.Y., Wei, C.Y., Ma, Y.S., and Lee, H.C. (2011). Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chinese Journal of Physiology*, 44(1): 1-11.
- Westerterp-Plantenga, M.S. (2010). Green tea catechins, caffeine and body-weight regulation. *Physiology & behavior*, 100(1) : 42-46.
- **X**u, Y.C., Leung, S.W.S., Yeung, D.K.Y., Hu, L.H., Chen, G.H., Che, C.M., and Man, R.Y.K. (2007). Structure–activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry*, 68(8):1179-88.
- **Y**akhlef, G., laroui, S., hambaba, L., Aberkane, M-C., and Ayachi A. (2011). Evaluation de l'activité antimicrobienne de thymus vulgaris et de l'aurus nobilis, plante utilisées en médecine traditionnelle. *Phytherapie*, 9: 209 – 218.
- Yap, C.F., Ho, C.W., Aida, W.M., Chan, S.W., Lee, C.Y., and Leong, Y.S. (2009). Optimazation of extraction condition of total phenolic compounds from star fruit (*Averrhoacarambola* L.) residues. *Sains Malaysiana*, 38 (4): 511- 520.
- Young, I.S., and Woodside, J.V.(2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3):176-186.
- **Z**ampini, I.C., Ordoñez, R.M., and Isla, M.I. (2010). Autographic Assay for the Rapid Detection of Antioxidant Capacity of Liquid and Semi-solid Pharmaceutical Formulations Using ABTS⁺ Immobilized by Gel Entrapment. *AAPS PharmSciTech*, 11(3):1159-1163.

- Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3): 337-345.

Sites internet:

- (1): www.aggie-horticulture.tamu.edu.
- (2): [www.google/image/laurus nobilis](http://www.google/image/laurus+nobilis).

Annexes

Annexes

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

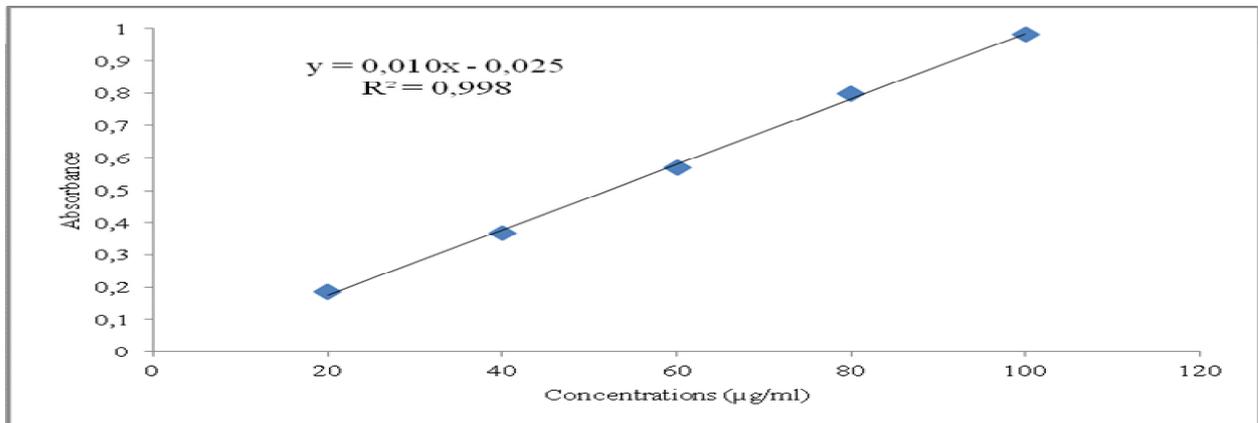


Figure 01: Courbe d'étalonnage avec l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux ($\lambda = 765$ nm).

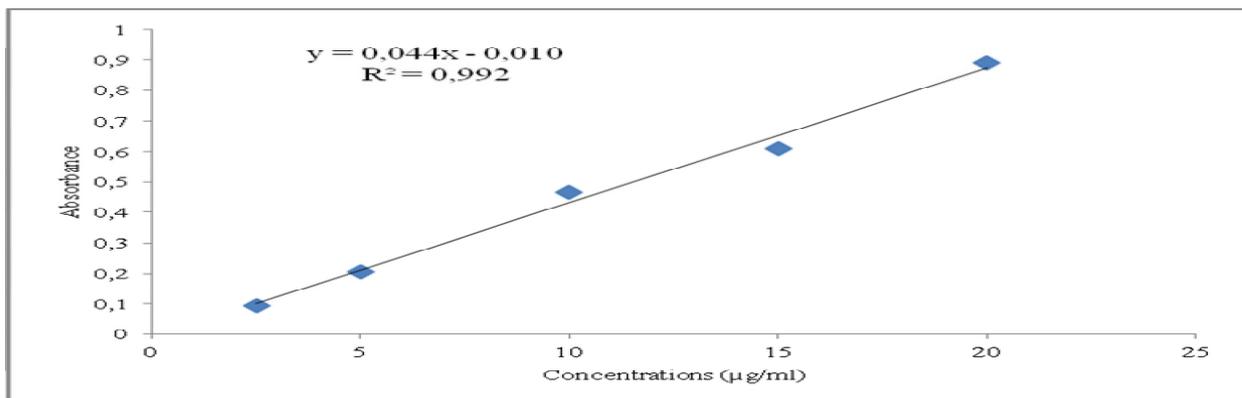


Figure 02: Courge d'étalonnage avec la quercétine pour le dosage des flavonoïdes ($\lambda = 430$ nm).

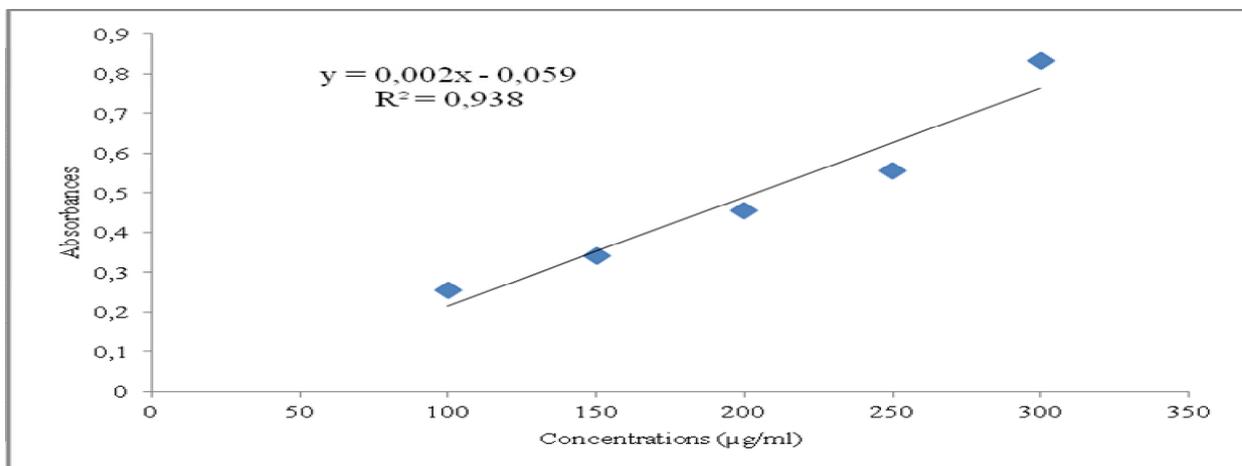


Figure 03: Courbe d'étalonnage avec la catéchine pour le dosage des tannins ($\lambda = 500$ nm).

Annexe N° 02: courbes obtenues par origin 8 utilisées pour le calcul des IC₅₀

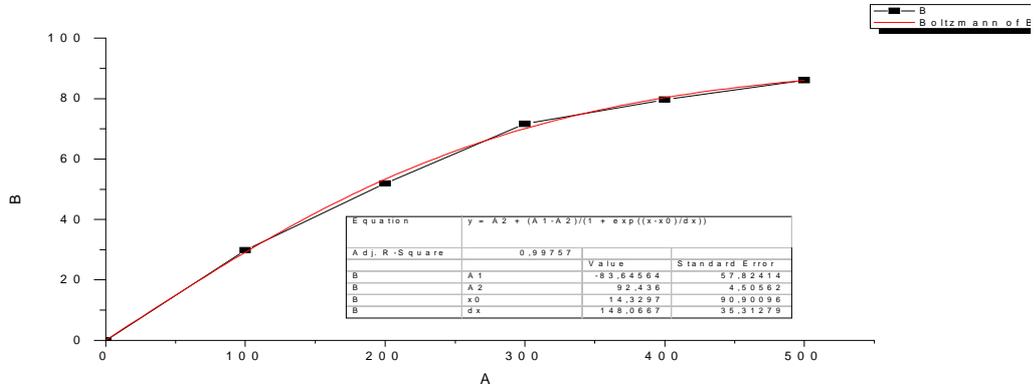


Figure 05: Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique des feuilles de *Camellia sinensis* dans l'activité scavenging de l'ABTS.

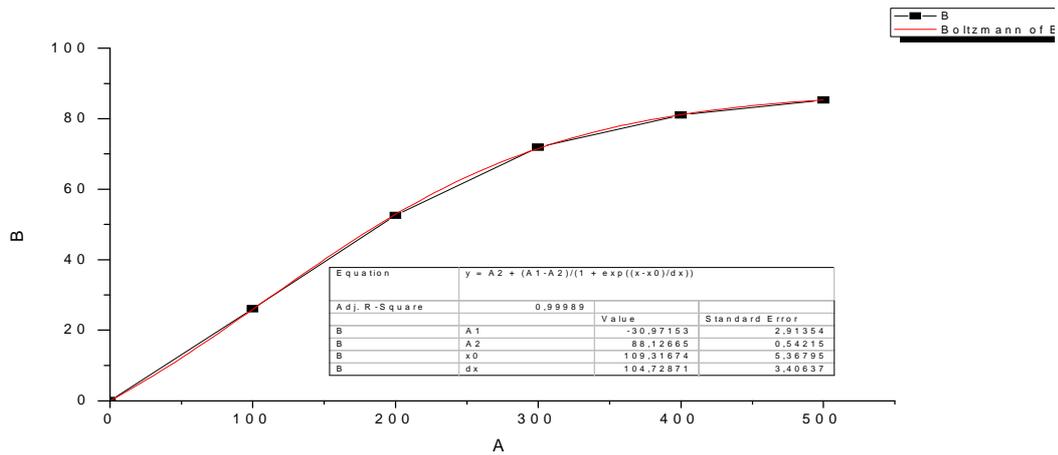


Figure 06: Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait aqueux d'hexane des feuilles de *Camellia sinensis* dans l'activité scavenging de l'ABTS.

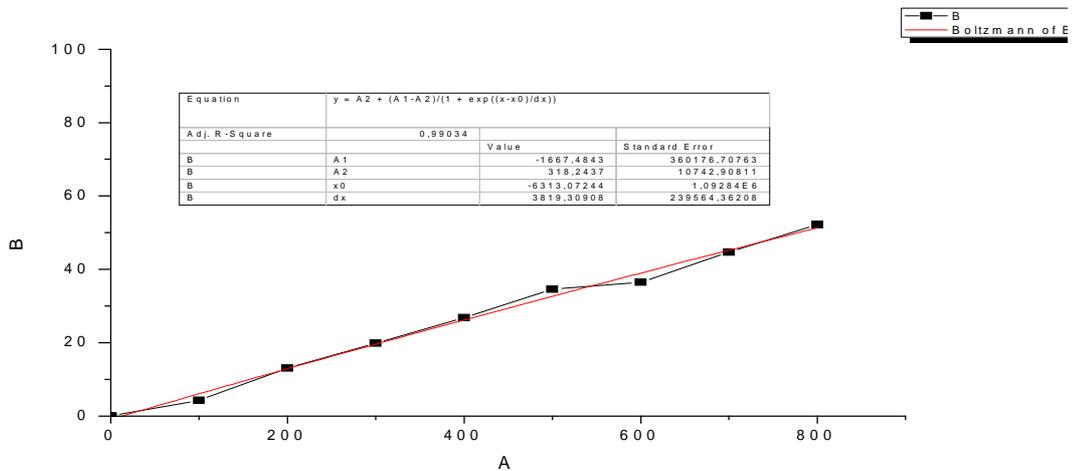


Figure 07: Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'extrait éthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* dans l'activité scavenging de l'ABTS.

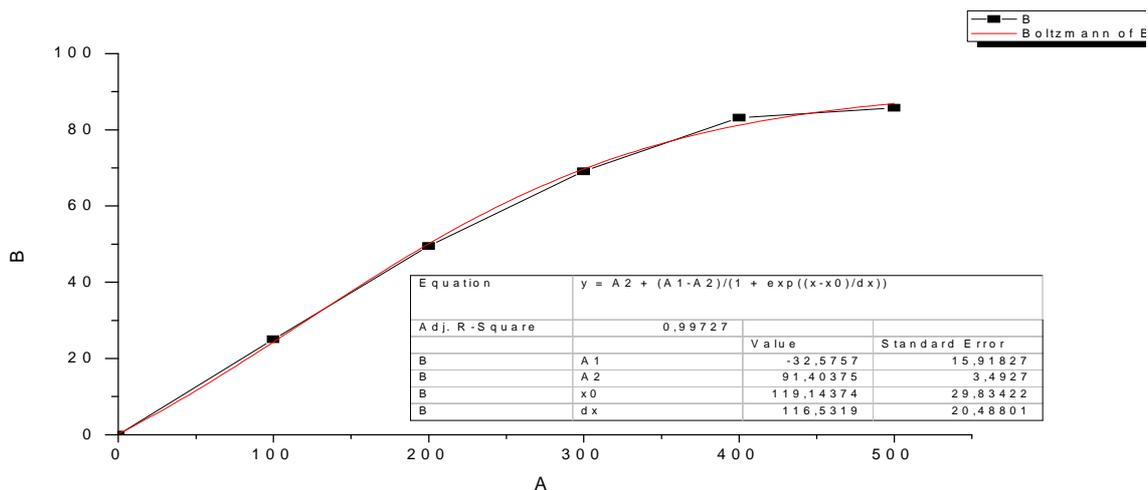


Figure 08: Courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait aqueux d'hexane des feuilles de *Laurus nobilis* dans l'activité scavenging de l'ABTS.

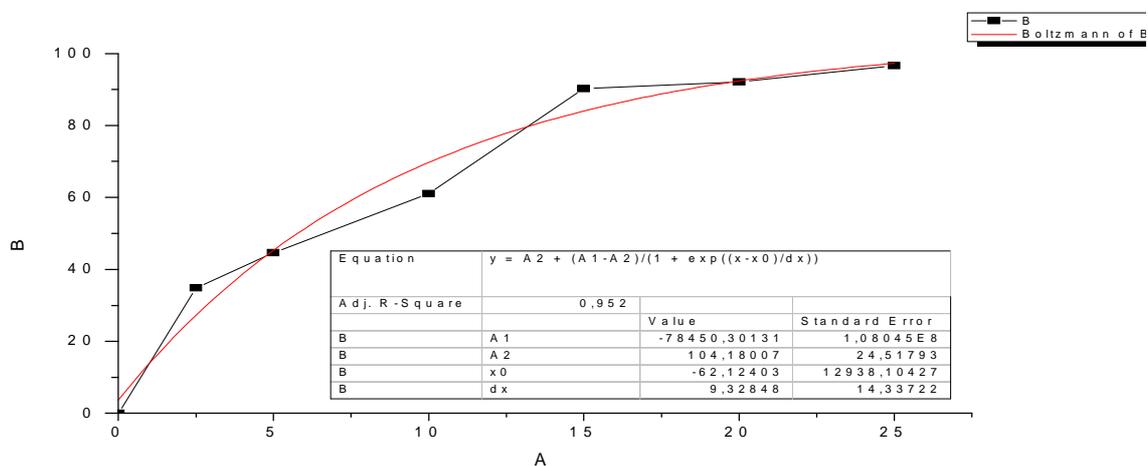


Figure 09: Courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait éthanolique des feuilles de *Camellia sinensis* dans l'activité scavenging du DPPH.

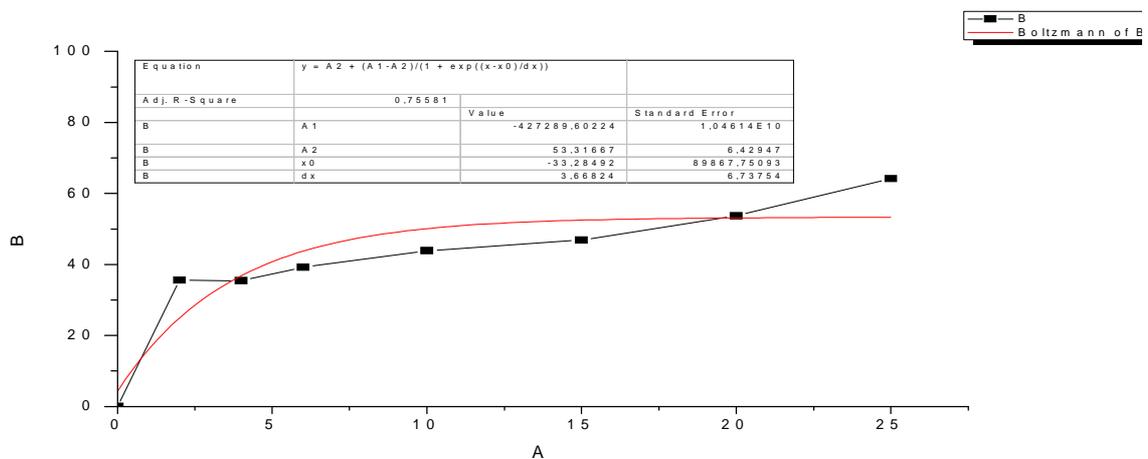


Figure10: Courbe pour le calcul de l'IC50 de l'extrait éthanolique des feuilles de *Laurus nobilis* dans l'activité scavenging du DPPH.

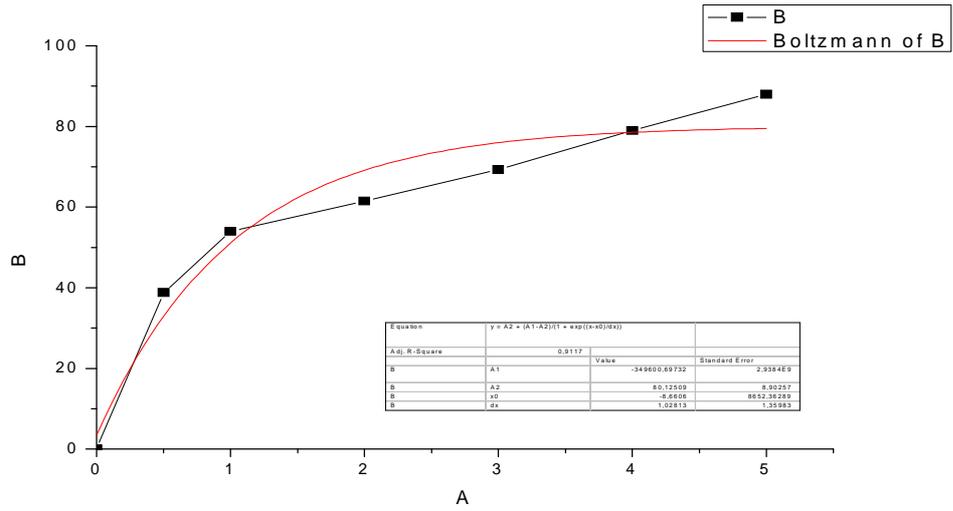


Figure 11: Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de la BHA dans l'activité scavenging du DPPH.

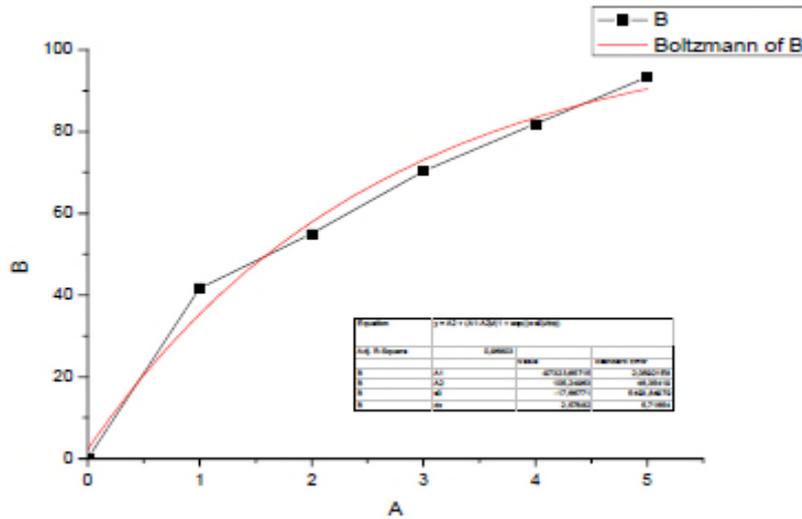


Figure 12: Courbe pour le calcul de l'IC₅₀ de l'acide ascorbique dans l'activité scavenging du DPPH.

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

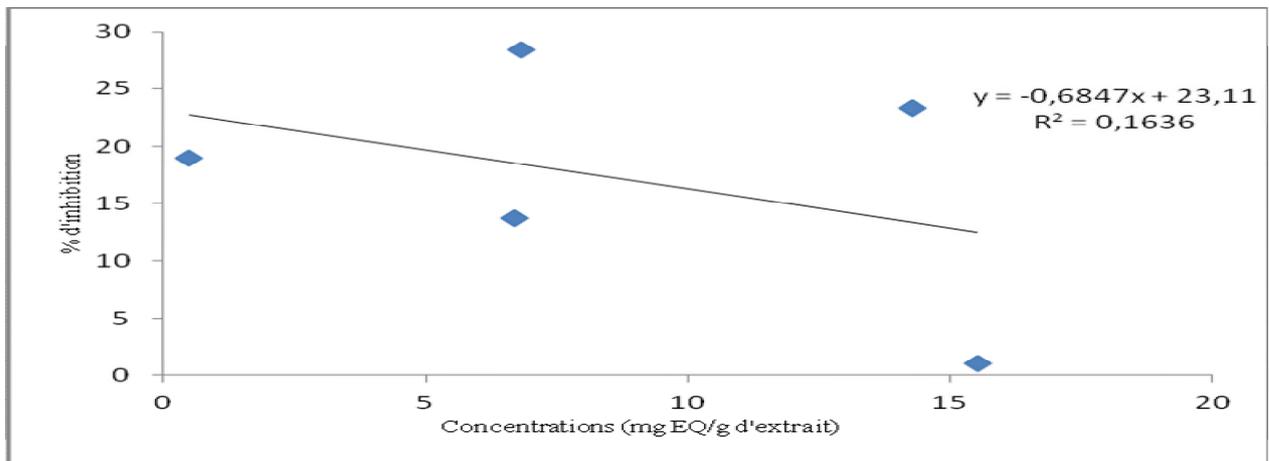


Figure 13: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et les teneurs en flavonoïdes des extraits de *Camellia sinensis*.

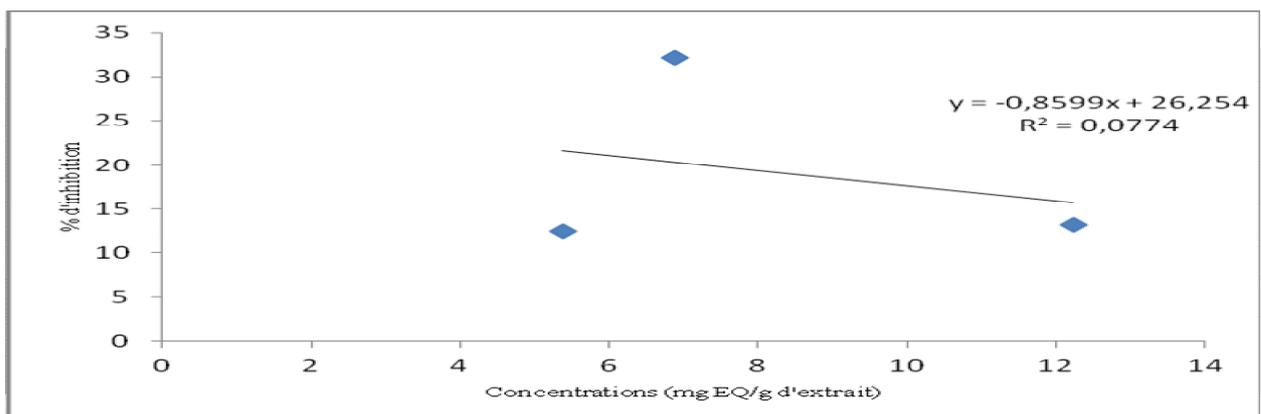


Figure 14: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et les teneurs en flavonoïdes des extraits de *Laurus nobilis*.

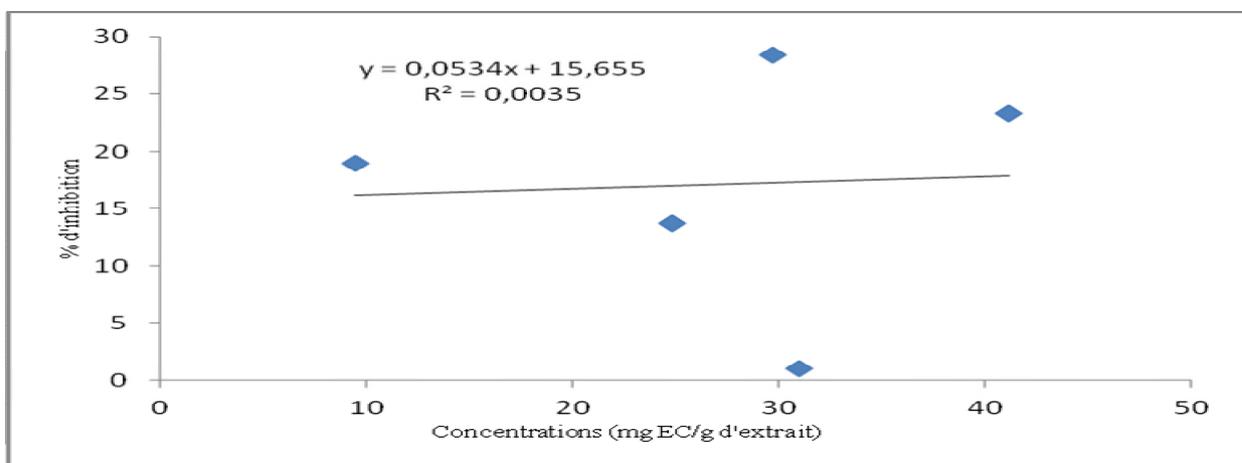


Figure 15: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en proanthocyanidines de *Camellia sinensis*.

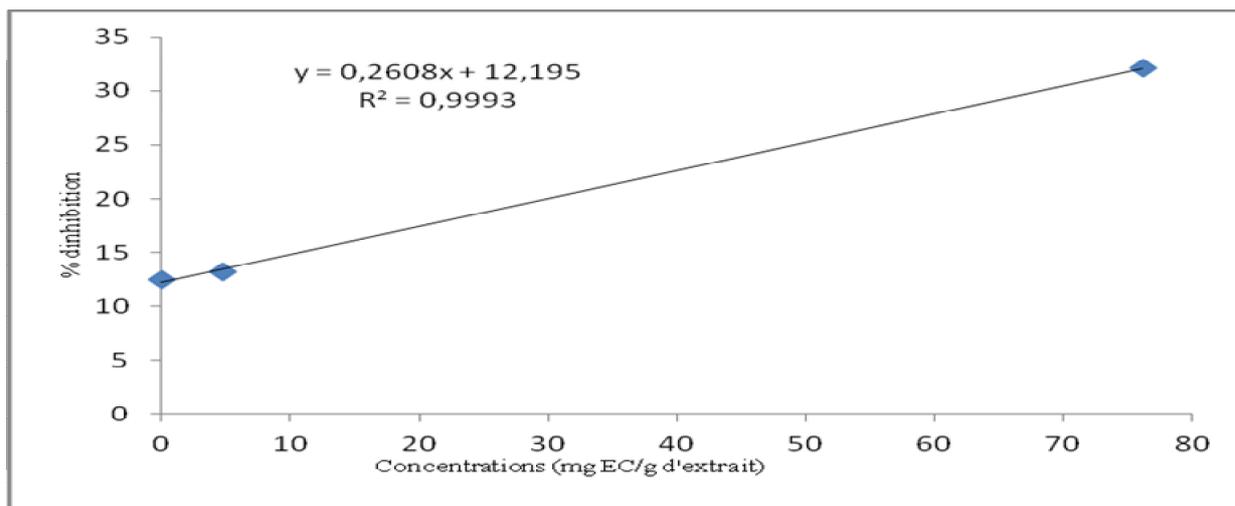


Figure 16: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et la teneur en proanthocyanidines de *Laurus nobilis*.

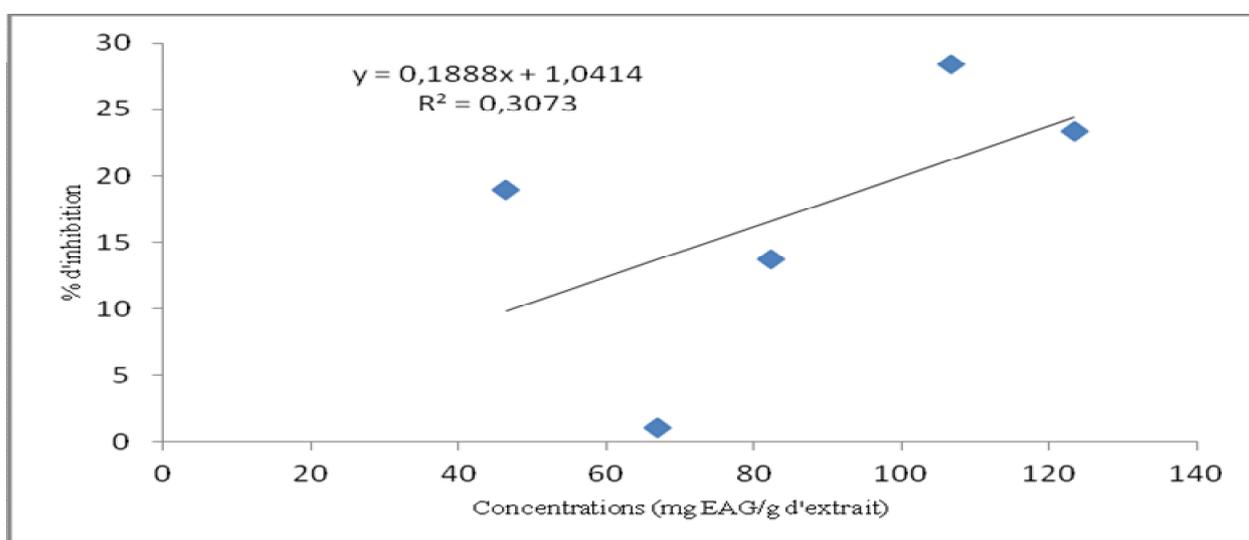


Figure 17: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et les teneurs en phénols totaux des extraits de *Camellia sinensis*.

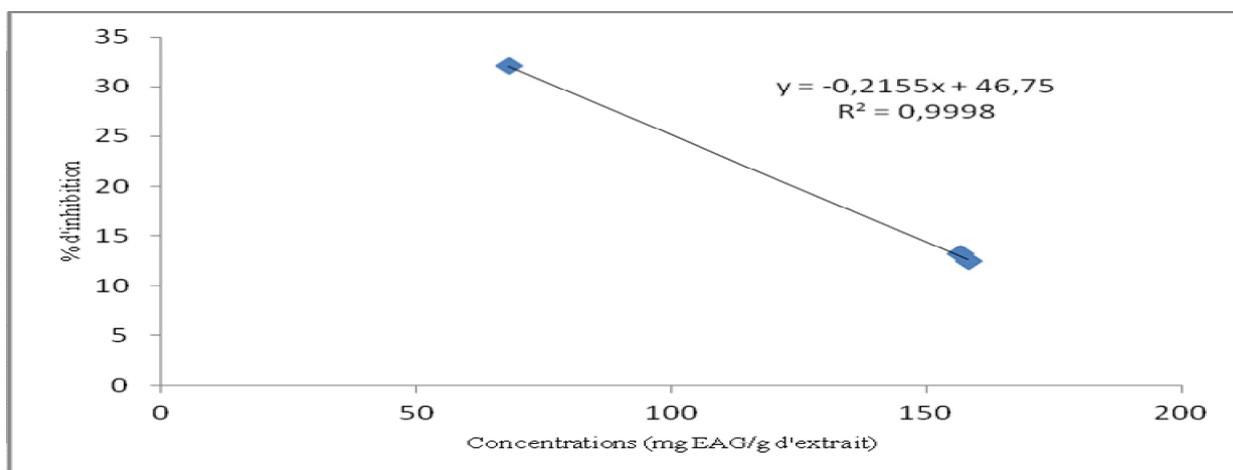


Figure 18: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical ABTS et les teneurs en phénols totaux des extraits de *Laurus nobilis*.

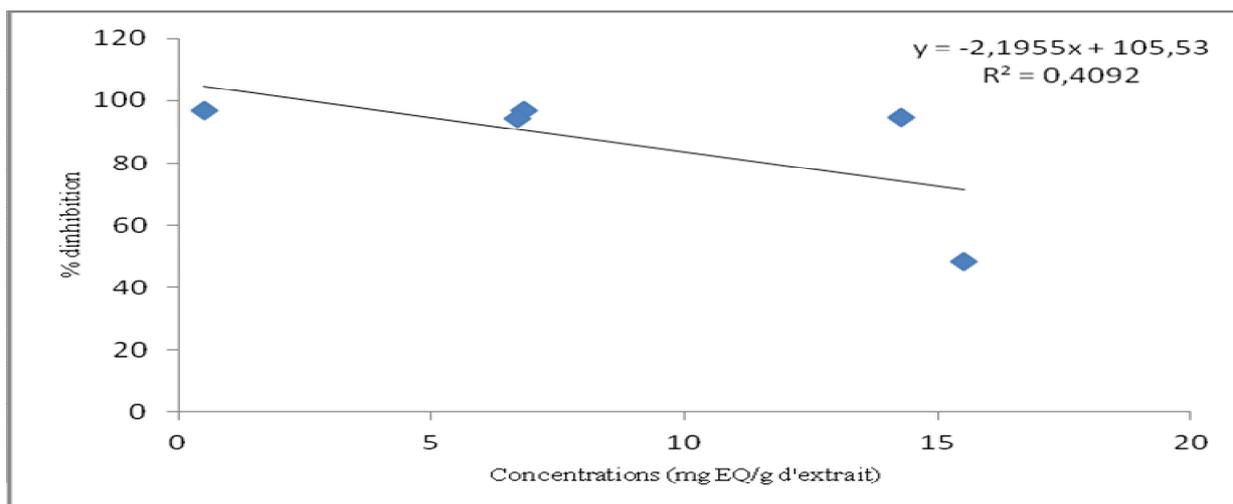


Figure 19: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et les teneurs en flavonoïdes des extraits de *Camellia sinensis*.

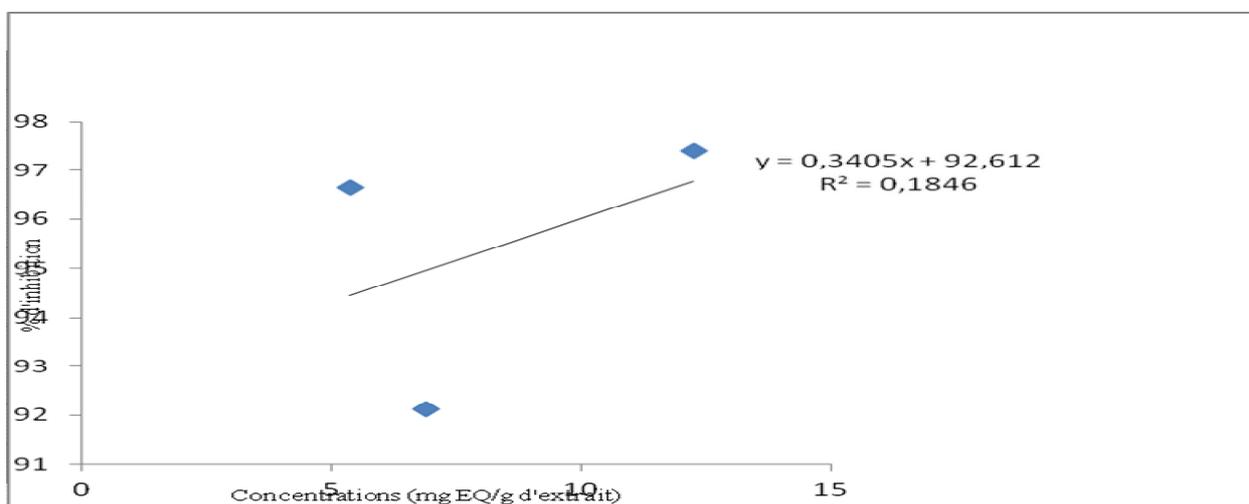


Figure 20: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et les teneurs en flavonoïdes des extraits de *Laurus nobilis*.

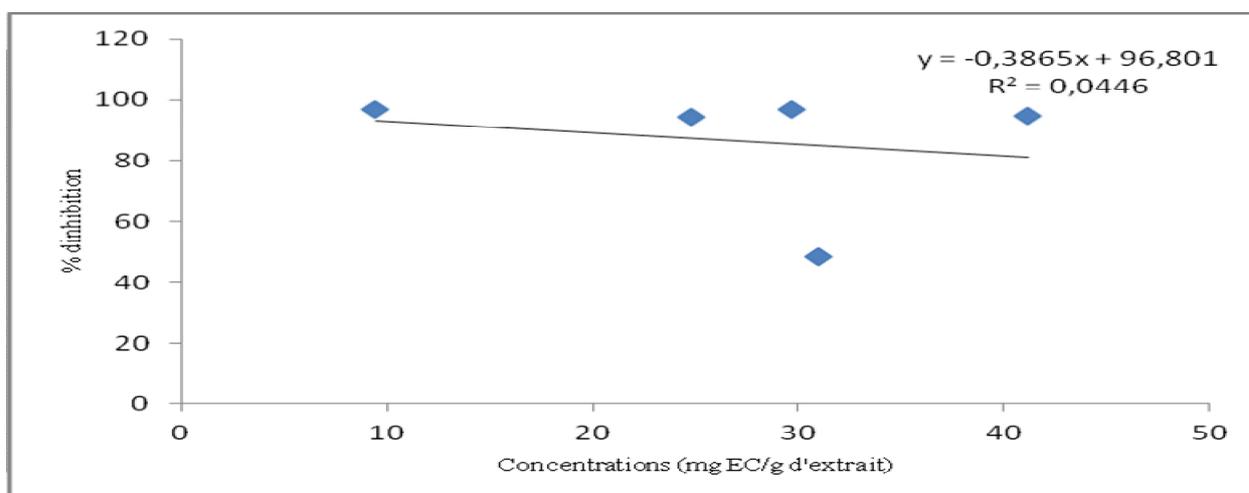


Figure 21: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en proanthocyanidines de *Camellia sinensis*.

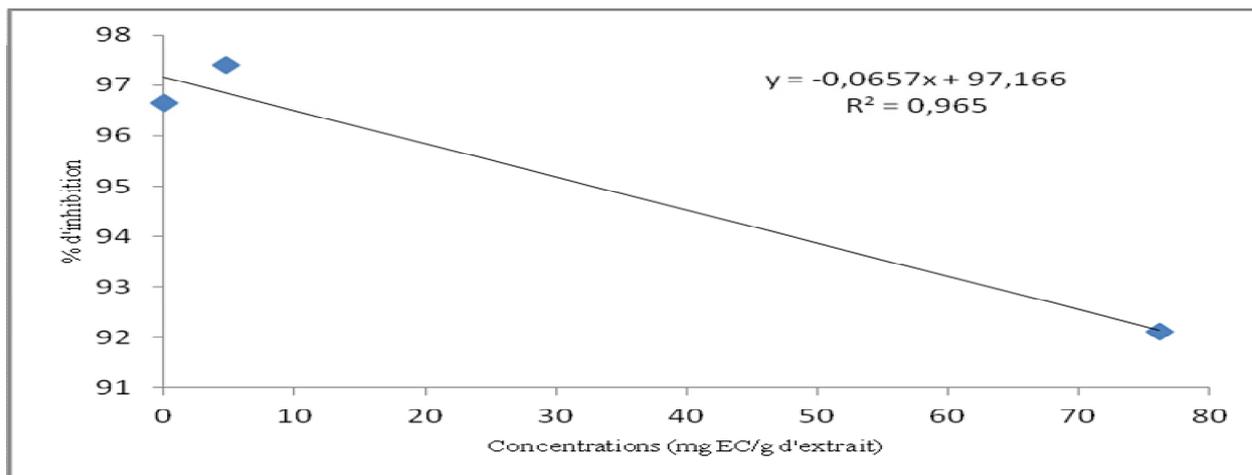


Figure 22: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et la teneur en proanthocyanidines de *Laurus nobilis*.

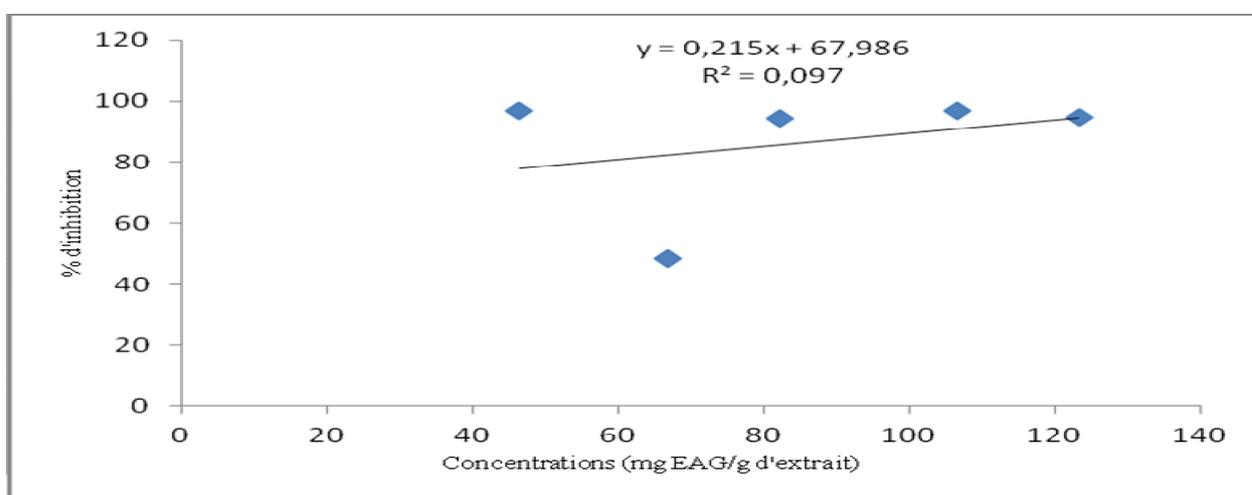


Figure 23: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et les teneurs en phénols totaux des extraits de *Camellia sinensis*.

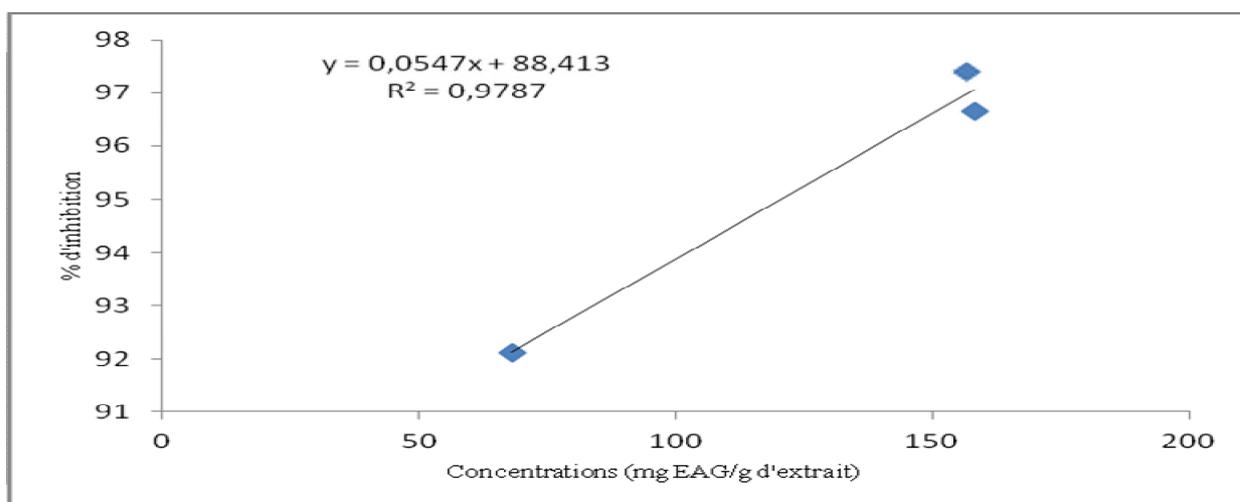


Figure 24: Courbe de corrélation entre l'activité scavenging du radical DPPH et les teneurs en phénols totaux des extraits de *Laurus nobilis*.

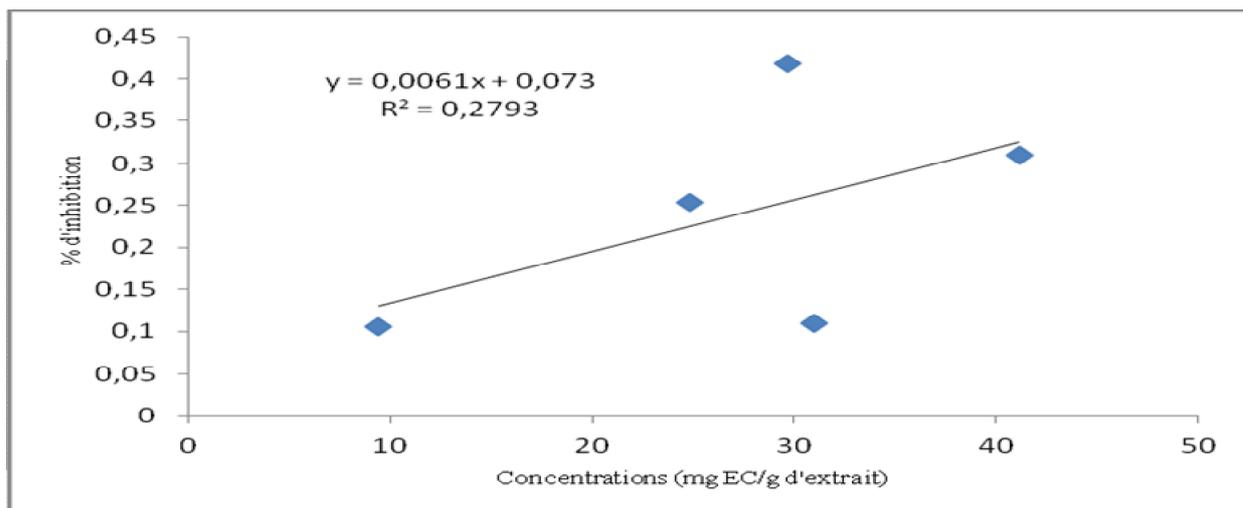


Figure 25: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur avec la teneur en proanthocyanidines de *Camellia sinensis*.

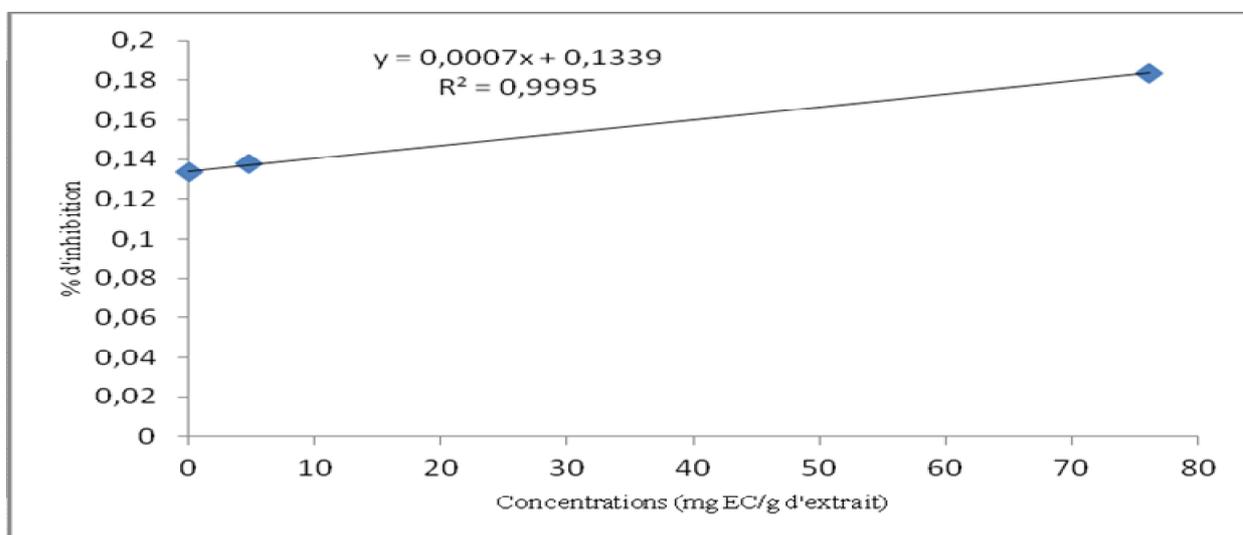


Figure 26: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur avec la teneur en proanthocyanidines de *Laurus nobilis*.

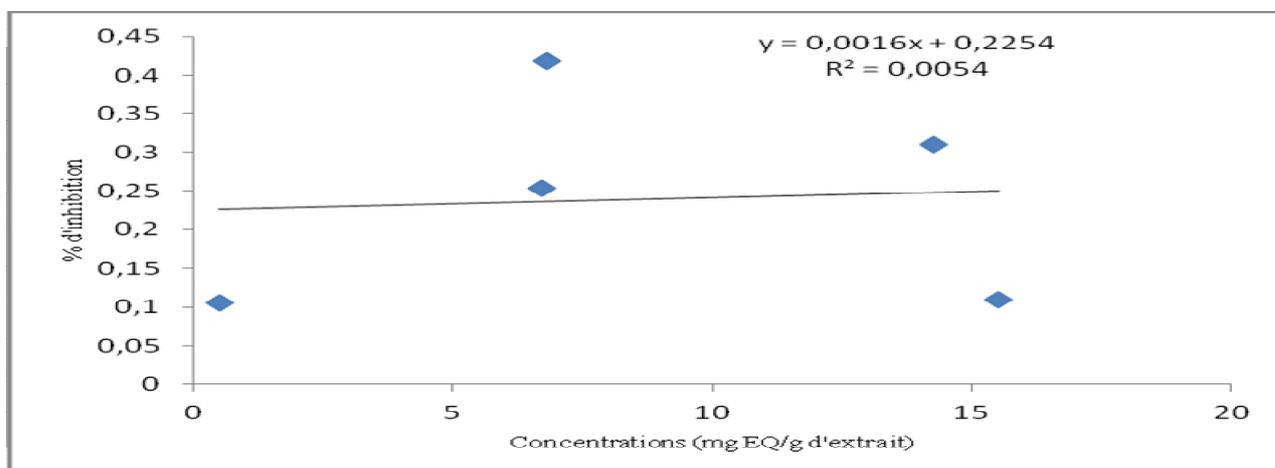


Figure 27: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur avec la teneur en flavonoïdes de *Camellia sinensis*.

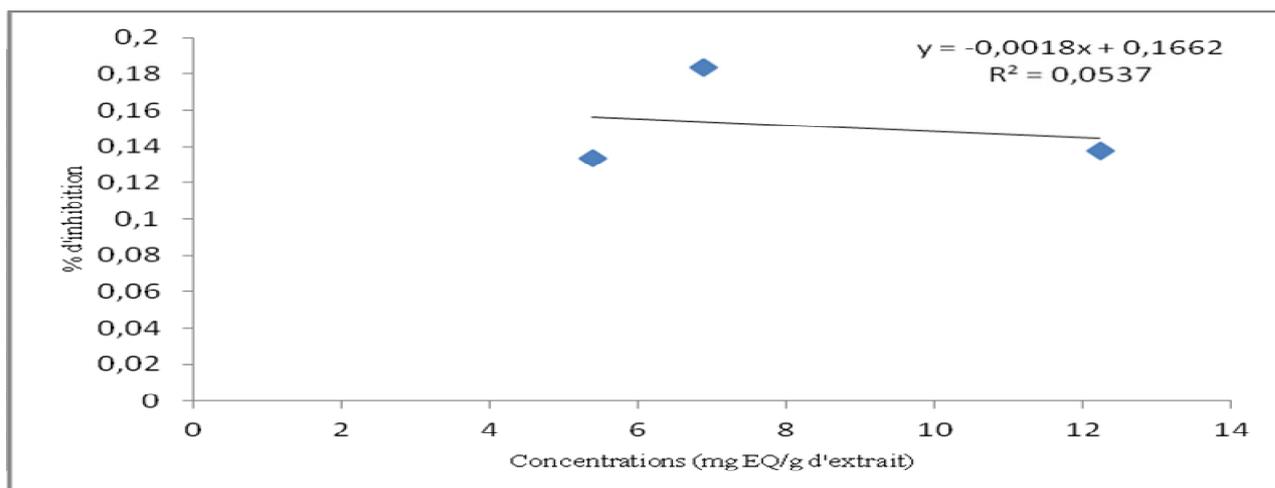


Figure 28: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur avec la teneur en flavonoïdes de *Laurus nobilis*.

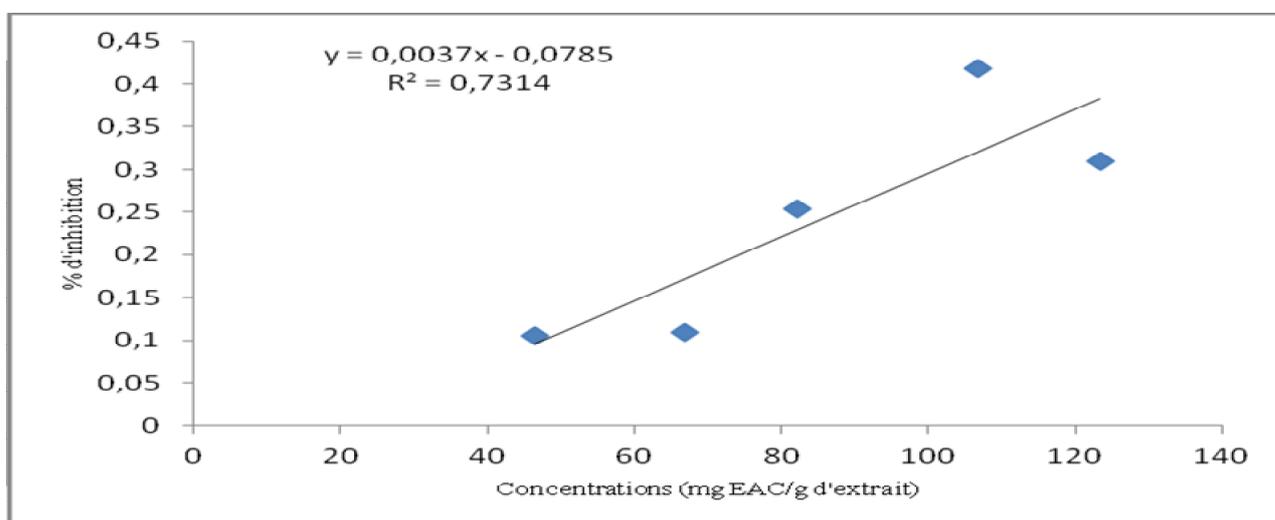


Figure 29: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur avec la teneur en phénols totaux de *Camellia sinensis*.

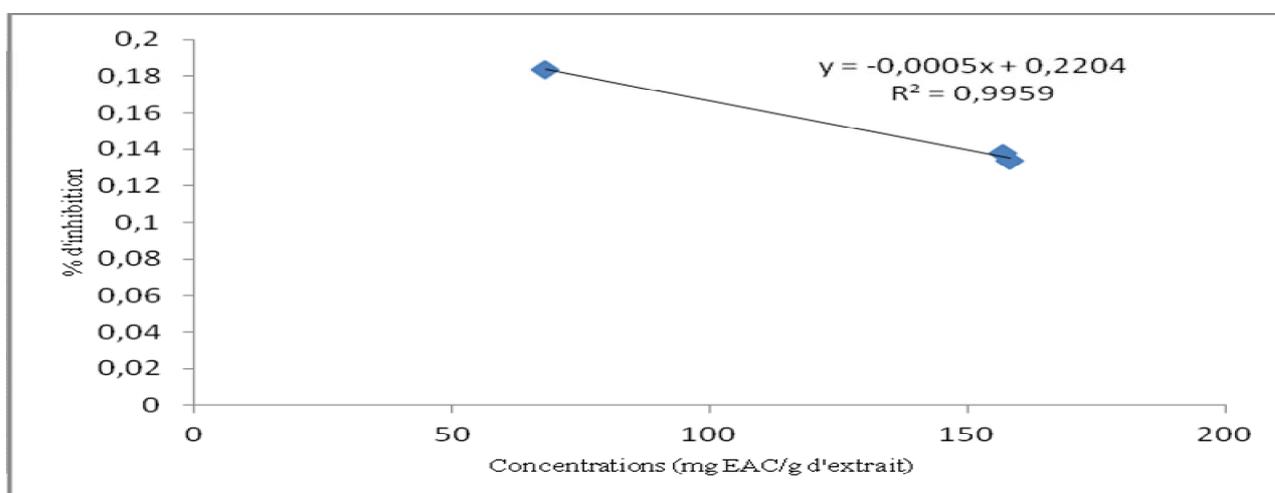


Figure 30: Courbe de corrélation entre le pouvoir réducteur avec la teneur en phénols totaux de *Laurus nobilis*.

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 de deux plantes médicinales locales, *Camellia sinensis* et *Laurus nobilis*, et cela en faisant trois types de manipulations, après, bien évidemment, avoir obtenu les différents extraits des feuilles des deux plantes. 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 trois tests : le pouvoir réducteur et l'activité scavenging des deux radicaux DPPH et ABTS. On a clôturé notre étude par le fractionnement et la caractérisation de l'activité anti-oxydante des extraits par chromatographie sur couche mince. Les résultats expérimentaux ont révélé que les extraits des deux plantes ont été riches en phénols totaux et en flavonoïdes et ont montré des teneurs appréciables en tanins condensés. Quant aux activités anti-oxydantes des deux plantes, les extraits ont été de très bons scavengers du radical DPPH. En revanche, l'activité inhibitrice du radical ABTS et le pouvoir réducteur ont été relativement faibles. Finalement, l'analyse des profils chromatographiques des extraits a confirmé que *Camellia sinensis* serait riche en composés polaires; alors que *Laurus nobilis* serait riche en composés de polarité réduite. Par ailleurs, la caractérisation de l'activité scavenging des radicaux ABTS et DPPH des extraits des feuilles des deux plantes a confirmé encore une fois leur richesse en divers composés doués d'une forte activité anti-radicalaire. Ces constatations nous laissent imaginer des études plus poussées sur des extraits d'une panoplie de plantes médicinales afin d'en bénéficier d'avantage.

Mots clés : *Camellia sinensis*, *Laurus nobilis*, radicaux libres, antioxydants, composés phénoliques, 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 two local medicinal plants, *Camellia sinensis*, *Laurus nobilis*, and their antioxidant activity was evaluated by doing three 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 and the reducing power. Our study was fenced by the fractionation and the characterization of the antioxidant activity of the extracts. The experimental results revealed that *Camellia sinensis* and *Laurus nobilis* extracts were rich in total phenolics and flavonoids, and they exhibited significant condensed tannins amounts. For the antioxidant activity of the plant, the extracts were very good scavengers of DPPH radical. Whereas, the ABTS radical scavenging activity and the reducing power were relatively low. Finally, analysis of chromatographic profiles of extracts confirmed that *Camellia sinensis* is rich in compounds of high polarity; while, *Laurus nobilis* is rich in compounds of low polarity. Moreover, the characterization of the ABTS and DPPH radical scavenging activity of extracts from the leaves of both plants has once again confirmed their rich variety of compounds with a strong anti-radical activity. These observations lead us toward more studies in this field, so that we get more benefits from our local medicinal plants.

Key words: *Camellia sinensis*, *Laurus nobilis*, free radicals, antioxidants, phenolic compounds, TLC.