

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimique

Mémoire de Master

Filière : Biologie
Option : Génétique Appliquée

Thème

*Prospection du pouvoir anti-UV des
anthocyanes :
Essais sur des microorganismes*

Proposé par :

M^{elle} REDOUANE Samiha

M^{elle} LAGGOUNE Lila

Membre du jury :

Président: M^{me} BEDJOU F. M. C. A. (UAMB)

Promoteur: M^r HARFI Ts. M. A. B. (UAMB)

Examineur I: M^r HAMOUM M. M. A. A. (UAMB)

Examineur II: M^{me} OUAHMED H. M. A. A. (UAMB)

Année : 2012/2013

Remerciements

Nos profonds remerciements s'adressent à tous ceux qui ont apporté leur contribution à la réalisation de ce mémoire.

A Mr HARFI, notre guide par excellence, qui a accepté de nous encadrer. On vous remercie pour votre gentillesse, disponibilité, patience...

Un grand merci à Mr HAMOUM pour sa totale disponibilité et la disponibilité de son laboratoire. Nous le remercions aussi d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions Mme BEDJOU comme enseignante et comme présidente du jury.

Nous remercions Mme OUAHMED comme enseignante et comme examinatrice de notre travail.

Notre gratitude et considération s'adressent également à tout le personnel du laboratoire de biophysique et de microbiologie, avec notre gratitude à Mr BOUCHENOUA et Mme MESAOUDENE.

Dédicaces

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles, à mes chers parents que dieu les protège et les garde en bonne santé.

A mon frère et sa femme

A ma très chère sœur et son mari

A mon fiancé et sa famille

A tous mes oncles et tantes

A mes adorables nièces et neveux: Lidya, Amel, Billel, Tarek et Islam

A mes amis à qui je souhaite tout le bonheur du monde, particulièrement à Lila et Noro que j'adore énormément.

A toute la promotion génétique 2013.

Samihha

Dédicaces

A la mémoire de mon grand-père Abdellah, Parti trop tôt, parti trop vite... je regrette d'être arrivée trop tard !

*A ma grand-mère Merbouha.
Elle m'a accompagnée dans mes nuits et dans mes jours,
Avec tout mon dévouement et tout mon amour.*

*A Maman
Tu m'as appris mon premier cri ;
Mon premier regard, mon premier sourire ;
Mon premier mot, mon premier rire
Mon premier pas dans la vie.
Je t'aime Maman, je t'aime et je cris ... tu es le plus grand
amour de ma vie !*

*A papa,
Pour qui j'ai toujours raison, même quand j'ai tort... surtout
quand j'ai tort, je t'adore.
A Tonton Omar et à Tata Malika, qui m'ont toujours fait sentir
que j'ai deux papas et deux mamans,.....
Oui, j'ai deux papas et deux mamans, que Dieu me les gardes !*

*A mes adorables grands-parents, Ahmed et Thaklit,
Toujours aussi jeunes que le premier jour de leur rencontre !*

Qu'ils soient bénis et qu'Allah me les gardes !

*A mes grands ... très grands... petits frères,
Hamou et Abdellah qui sont une grande
Famille à eux seuls.*

*A mes très chères sœurs que dieu ne m'a pas donné :
Lili, radia, tounes, Zaza, Mina, Narimene, Sabrina, Souad...*

A mes tantes, Naima Karima et leurs familles.

A mes Oncles Djemel, Fatseh, Kiki et leurs familles

*A mes amies : Fariza, Souad, Samira, Nawel, Sabrina, Yasmina
Meriem, Kahina, Hala, Dehia*

Et sans oublier mes voisins

A Samiha ma collègue, ma camarade, ma binome....ma sœur !

Dans ce travail de recherche, elle est certainement

Ma meilleure découverte !

A toute la promotion génétique 2013.

LILA

Liste des tableaux

Tableau I : Les actions biologiques des polyphénols.....	3
Tableau II : Résultats du dosage des anthocyanes (DO).....	26
Tableau III : évaluation du pouvoir ‘anti-radicalaire’ des anthocyanes.....	29
Tableau IV : les pics et les absorbances de chaque extrait anthocyanique.....	30

Liste des figures

Figure 1 : Structure de base d'un flavonoïde.....	4
Figure 2 : protection de l'ADN par les anthocyanes foliaires.....	5
Figure 3 : Dimérisation photochimique de deux bases de thymine.....	6
Figure 4 : Structure du cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium.....	7
Figure 5 : Structure de l'un des principales anthocyanes isolée à partir des pétales de <i>Petunia hybrida</i>	8
Figure 6 : Altérations de l'absorption sous l'effet de la copigmentation.....	10
Figure 7 : La dégradation du monoglucoside d'anthocyanes à pH 3,7 accélérée par la chaleur.....	11
Figure 8 : Principaux compartiments impliqués dans le métabolisme des anthocyanes.....	13
Figure 9 : le pouvoir antioxydant des anthocyanes.....	14
Figure 10 : schéma récapitulatif des différentes étapes de purification des anthocyanes.....	16
Figure 11 : Photos du matériel végétal utilisé.....	18
Figure 12 : protocole d'extraction des anthocyanes.....	20
Figure 13 : préparation de la gélose en bicouche.....	24
Figure 14 : teneur des extraits de différente source en anthocyanes.....	27
Figure 15 : variation de la couleur des anthocyanes en fonction du pH.....	27
Figure 16 : Représentation graphique des résultats du test de l'activité antimicrobienne des extraits anthocyaniques.....	28
Figure 17 : Spectre UV-visible de l'extrait résidu <i>H. sabdariffa</i> (filtrat).....	31
Figure 18 : Spectre UV-visible de l'extrait filtrat <i>R. damacena</i> (résidu).....	31
Figure 19 : Spectre UV-visible de l'extrait résidu <i>R. damacena</i> (filtrat).....	31
Figure 20 : croissance des souches microbiennes après exposition des microorganismes aux UV (365nm/60s).....	32
Figure 21 : croissance des souches microbiennes après exposition des microorganismes aux UV (254nm/60s).....	33
Figure 22 : croissance des souches microbiennes après exposition aux UV (254nm/90s).....	33
Figure 23 : Résultats du test de la gélose en double couche.....	34

Figure 24: Croissance des souches en présence de l'extrait filtrat <i>H. sabdariffa</i> (eau physiologique) après exposition aux UV (365 nm/90 s).....	34
Figure 25 : Croissance des souches en présence de l'extrait filtrat <i>R. damacena</i> (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/60 s).....	35
Figure 26 : Croissance des souches en présence de l'extrait résidu <i>R. damacena</i> (filtrat) (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/90s).....	36
Figure 27 : Observation microscopique des colonies de <i>S. marcescens</i> en absence et en présence des deux extraits anthocyaniques (filtrat <i>H. sabdariffa</i> et résidu <i>R. damacena</i>)...	36
Figure 28 : Observation microscopique des colonies de <i>P. aeruginosa</i> en absence et en présence des deux extraits anthocyaniques (filtrat <i>H. sabdariffa</i> et résidu <i>R.damacena</i>)...	37
Figure 29 : Graphes diffraction aux rayons X des extraits de <i>R. damacena</i>	38

Sommaire

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	ii

Introduction.....	1
-------------------	---

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Anthocyanes et UV

I-1- Généralités.....	3
I-2- Anthocyanes.....	4
I-2-1-Définition.....	4
I-2-2- Plantes, UV et anthocyanes.....	4
I-2-3- Effets des UV sur les macromolécules biologiques.....	6
I-2-4- Structure.....	7
I-2-5- Propriétés physicochimiques des anthocyanes.....	8
I-2-5-1- Impact sur la stabilité.....	8
I-2-5-2- Impact sur le pouvoir optique (pouvoir absorbant).....	9
I-2-5-3- Effet du pH	10
I-2-5-4- Effet de la température.....	10
I-2-5-5- Effet de l'oxygène.....	11
I-2-6- Biodisponibilité des anthocyanes.....	11
I-2-7- Anthocyanes et pouvoir antioxydant.....	13
I-2-8- Extraction des anthocyanes, principe et limites	15
I-2-8-1- Principe de l'extraction.....	15
I-2-8-2- Limites des techniques.....	16

Partie pratique

Chapitre II : Matériel et méthodes

II-1- Matériels	18
II-1--1- Matériel végétal	18
II-1-2- Micro-organismes utilisés.....	18

II-2- Protocole expérimentale.....	19
II-2-1- Protocoles d'extraction.....	19
II-2-1-1- Extraction des anthocyanes du jus de l'orange sanguine.....	19
II-2-1-2- Extraction des anthocyanes de la peau d'orange et de la poudre des fleurs.....	21
II-2-2- Dosage des anthocyanes	21
II-2-3- Etude du spectre optique des anthocyanes	22
II-2-4- Spectrophotométrie UV-visible des anthocyanes.....	22
II-2-5- Test de l'activité antimicrobienne des extraits anthocyaniques.....	23
II-2-6- Evaluation de l'activité "anti-radicalaire" des anthocyanes.....	23
II-2-7- Evaluation de l'activité anti-UV des anthocyanes	23
II-2-7-1- Essais-témoins	23
II-2-7-2- Administration des anthocyanes.....	24
II-2-7-2-1- Exposition aux anthocyanes en milieu solide.....	24
II-2-7-2-2- Administration des anthocyanes en milieu liquide.....	24
II-2-8- Impact physiologique des anthocyanes sur les cellules.....	25
II-2-9- Diffraction aux rayons X (DRX).....	25

Chapitre III : Résultats et discussion

III-1- Résultats	26
III-1-1- Dosage des anthocyanes	26
III-1-2- Spectre optique des anthocyanes.....	27
III-1-3- Test de l'activité antimicrobienne des extraits anthocyaniques.....	28
III-1-4- Evaluation de l'activité "anti-radicalaire" des anthocyanes.....	28
III-1-5- Spectrophotométrie UV-visible des anthocyanes.....	29
III-1-6- Evaluation de l'activité anti-UV des anthocyanes.....	32
III-1-6-1- Essais-témoins.....	32
III-1-6-2- Exposition aux UV en présence d'anthocyanes.....	34
III-1-6-2-1- Administration des anthocyanes en milieu solide.....	34
III-1-6-2-2- Administration en milieu liquide.....	34
III-1-7- Impact de l'UV-protection des anthocyanes sur l'aspect cellulaire et colonial des microorganismes testés.....	36
III-1-8- Diffraction aux rayons X (DRX).....	37
III-2- Discussion.....	38

Conclusion.....	41
Références bibliographiques.....	43
Annexe A.....	I
Annexe B.....	V
Annexe C.....	VII

Introduction

Introduction

Les effets toxiques du soleil, ou plus exactement des UV, pour l'Homme sont connus depuis très longtemps (bronzage douloureux, brûlures du premier et du deuxième degré...).

Peu de gens savent que les UV sont des oxydants cutanés très dangereux (vieillesse cutané...) par surexposition prolongée au soleil mais aussi et surtout qu'ils sont cancérogènes pour la peau. En effet les UV sont la première cause des cancers cutanés et leur incidence est en nette progression. (**Douki et al., 2007**)

Ces effets toxiques des UV s'exercent à deux niveaux:

- par oxydation directe des macromolécules biochimiques (protéines, lipides membranaires, ADN...);

- par oxydation indirecte via des réactions de photosensibilisation endogène, génératrices des espèces réactives de l'oxygène ; tout aussi néfastes pour ces macromolécules.

Moins de gens encore savent que les UV sont tout aussi dangereux pour les plantes, pour la simple et bonne raison que les plantes ont trouvé une solution à ce problème : les substances photo-protectrices et plus particulièrement les flavonoïdes, composés végétaux par essence. Ces composés, par leurs propriétés antioxydantes et photo-absorbantes permettent aux plantes une gestion efficace du stress oxydatif généré par ces radiations.

De tous les flavonoïdes, les anthocyanes représentent la catégorie la plus variable, donc la plus délicate, à étudier. Cette variabilité c'est d'abord une variabilité de structure mais aussi une variabilité de propriétés. On ne peut extraire les anthocyanes sans perturber leur structure et perturber leur structure c'est perturber leurs propriétés (**Gould et al., 2009**).

Une question se pose alors: est-il possible d'extraire les anthocyanes de leurs matrices végétales et de les transférer, en sauvegardant leurs propriétés, dans un autre type d'organisme ?

Dans cette optique, nous nous proposons dans ce travail une prospection de cette activité photo-protectrice des UV par :

- ✓ une sélection des sources d'anthocyanes disponibles à une échelle commerciale ;
- ✓ une adaptation des protocoles d'extraction des anthocyanes à partir de ces sources végétales ;
- ✓ une mise au point d'une forme adaptée d'administration de ces anthocyanes ;
- ✓ mise en évidence de cet effet photo-protecteur sur des microorganismes ; préalablement exposés à ces anthocyanes.

*Synthèse
bibliographique*

I-1- Généralités sur les polyphénols :

Les polyphénols sont des molécules du métabolisme secondaire des végétaux, regroupant une multitude de molécules comprenant au moins un noyau aromatique, et divers substituants (hydroxyles, méthoxyles, sucres, acides organiques, minéraux ...). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Dalton, comme les tannins (figure 1, annexe A). (Mompon *et al.*, 1996)

Les polyphénols exercent des rôles et des fonctions variées, certains identifiés et d'autres supposés. Les plus notoires sont représentés dans le tableau I:

Tableau I : Les actions biologiques des polyphénols au niveau des plantes. (Macheix *et al.*, 2005)

Actions biologiques des composés phénoliques	
Intervention dans les symbioses Rhizobium/Légumineuses :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Activation des gènes de nodulation en présence : <li style="padding-left: 20px;">- de <i>Rhizobium meliloti</i> <li style="padding-left: 20px;">- de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ✓ Inhibition de l'activation des gènes de nodulation en présence de <i>Rhizobium leguminosarum</i>
Intervention dans les relations hôte/parasite :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Activation des gènes de virulence d'<i>Agrobacterium</i> ✓ Barrière physique ou chimique, constitutive ou induite ✓ Synthèse de phytoalexines ✓ Chez les angiospermes parasites : Protection contre le rayonnement UV
Intervention dans les relations plantes/animaux :	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Couleur et pollinisation ✓ Protection vis-à-vis des herbivores

Ils se retrouvent dans tous les tissus et organes végétaux comme (fleurs, feuilles, tiges, racines et graines). Certains flavonoïdes sont clairement établis comme protecteurs des macromolécules cellulaires et des jeunes tissus foliaires contre le rayonnement UV. Leurs

propriétés d'antioxydants s'avèrent particulièrement utiles en milieu tropical. (Féret, 2009; Gomez, 2009; Muanda, 2010)

Les flavonoïdes font partie de la famille des polyphénols qui ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (Figure 1) (Akroum, 2011)

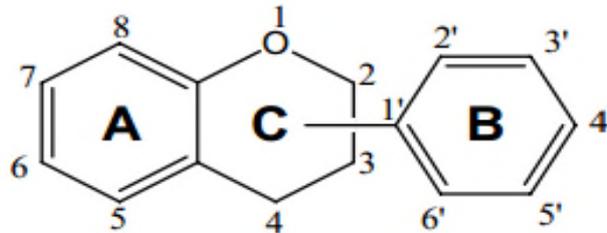


Figure 1 : Structure de base d'un flavonoïde. (Anthoni, 2007).

Les anthocyanes forment un groupe à part dans la famille des flavonoïdes.

I-2- Anthocyanes :

I-2-1-Définition :

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet), terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés, sont des molécules qui font partie de la famille des flavonoïdes et qui sont capables d'absorber la lumière du spectre UV-visible. Elles colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est détectable à l'œil nu. La coloration des fleurs et des fruits est leur propriété la plus évidente. (Ben Amor, 2008 ; Muanda, 2010)

I-2-2- Plantes, UV et anthocyanes :

L'effet UV-protecteur des flavonoïdes a été suspecté, depuis très longtemps dans l'adaptation des plantes aux altitudes élevées (radiation UV plus intenses), notamment pour les formes glycosylées (anthocyanes).

Des études menées avec des mutants végétaux déficients en anthocyanes ont mis en évidence que l'effet protecteur se manifeste :

- d'une part par un pouvoir filtrant (absorbant), limitant la pénétration des UV au niveau des cellules, foliaires notamment ;
- d'autre part par un pouvoir antioxydant limitant les altérations des macromolécules (ADN, chloroplastes, protéines, lipides membranaires...). La protection de l'ADN est d'autant

plus importante qu'elle signifie une limitation des mutations et une protection de la plante mais aussi de l'espèce. (Gould et al., 2009)

Des études réalisées sur des feuilles avec anthocyanes et d'autres mutantes sans anthocyanes à propos de la résistance de leur ADN vis-à-vis le rayonnement ultraviolet montrent que le dommage au niveau de l'ADN des feuilles déficientes en anthocyanes est incomparable avec celui des feuilles témoins (figure 2) (Macheix et al., 2005).

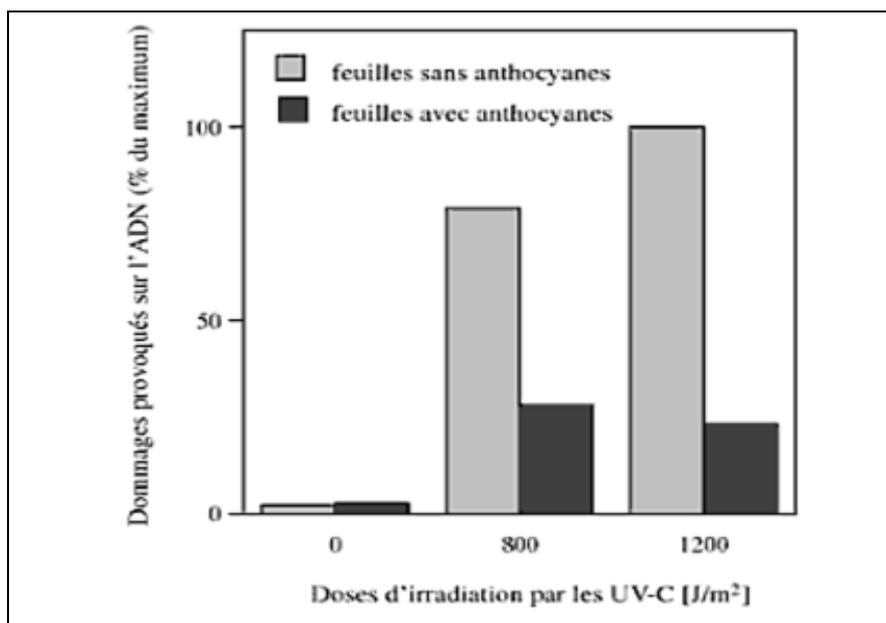


Figure 2 : protection de l'ADN par les anthocyanes foliaires. (Macheix et al., 2005)

Les UV sont connus pour stimuler la biosynthèse des flavonoïdes, en particulier celles des anthocyanes. Toutes les études menées dans cette optique soulignent un rapport de proportionnalité étroit entre l'irradiation UV et une accumulation des anthocyanes chez les plantes qui en contiennent. Mais l'interprétation de ce phénomène reste controversée :

- pour certains auteurs, l'augmentation de la teneur en composés secondaires ne peut pas être une stratégie adaptative visant à diminuer les dommages dus aux UV à forte énergie : l'expérience montre qu'en milieu UV, la croissance végétale s'accompagne d'une baisse de la biomasse malgré une forte concentration en anthocyanes ce qui suggère qu'une augmentation de la production d'anthocyanes est plus une réponse à un stress qu'une stratégie d'adaptation (Hopkins, 2003) ;

- pour d'autres, expériences à l'appui, en environnement UV, une augmentation de la biosynthèse d'anthocyanes est une stratégie d'adaptation à un milieu agressif. Du fait que les anthocyanes possèdent la propriété d'absorber les UV et de neutraliser les radicaux libres qui en découlent (les UV sont des radiations générant des radicaux libres !); ils assurent un rôle protecteur indiscutable pour les macromolécules. (Macheix *et al.*, 2005)

I-2-3- Effets des UV sur les macromolécules biologiques :

L'activité ionisante des UV s'exerce sur toutes les molécules biologiques mais leurs effets sont particulièrement manifestes au niveau des biomembranes, des protéines (enzymes et hormones) et surtout des acides nucléiques. L'énergie véhiculée par ces radiations est suffisamment intense pour déstabiliser, altérer ou carrément détruire les molécules qui les reçoivent. Cette activité est particulièrement grave au niveau de l'ADN : action mutagène, cancérigène voire létale.

La région la plus germicide du spectre UV se situe entre 240 nm et 300 nm. L'ADN absorbe fortement la lumière à 260 nm. Plusieurs effets des UV sur l'ADN sont connus (mutation ponctuelle, sites abasiques, modification des bases, pontages, cassures simple/double drain.....) mais le plus étudié est la formation de dimères de pyrimidines adjacentes dont le dimère de thymine est le plus fréquent (T-T) (figure 3). Le dimère crée une distorsion au niveau de l'ADN, rendant inefficace voire impossible la division de la cellule ; il en résulte la mort cellulaire ou l'apparition d'une génération de mutants non viables ou incapables de se reproduire. (Ben Messaoud, 2009)

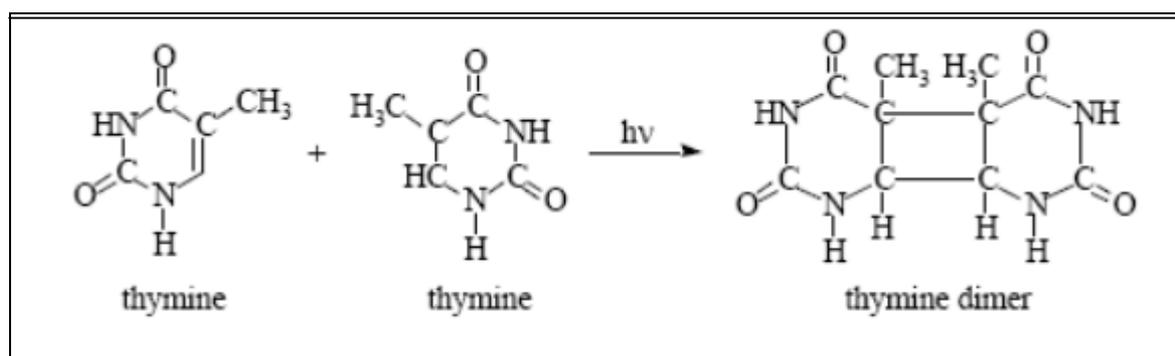


Figure 3 : Dimérisation photochimique de deux bases de thymine. (Ben Messaoud, 2009)

La courbe d'adsorption de l'ADN, pour des longueurs d'onde comprises entre 200 et 285 nm laisse voir un pic à la longueur d'onde de 253,7 nm. Le meilleur effet bactéricide est obtenu pour des longueurs d'onde entre 250 et 260 nm.

I-2-4- Structure :

Les anthocyanes présentent un squelette carboné de base analogue à celui des flavonoïdes avec la charge cationique en plus. Elles sont présentes dans la nature sous forme d'hétéroside dont l'aglycone, ou anthocyanidine, dérive du cation flavynium ou 2-phénylbenzopyrilium diversement substitué. L'anthocyanidine peut être liée à une ou plusieurs molécules de sucres, lesquelles à leur tour peuvent être ou non acylées par différents acides organiques. On parle alors d'anthocyane. La présence des groupements hydroxyyles sur les cycles, ainsi qu'un ou plusieurs sucres rendent ces composés solubles dans l'eau (mais aussi dans l'éthanol, le méthanol et dans l'acétone). (Emile, 2010)

La formule la plus fréquemment représentée est celle de la figure 4 :

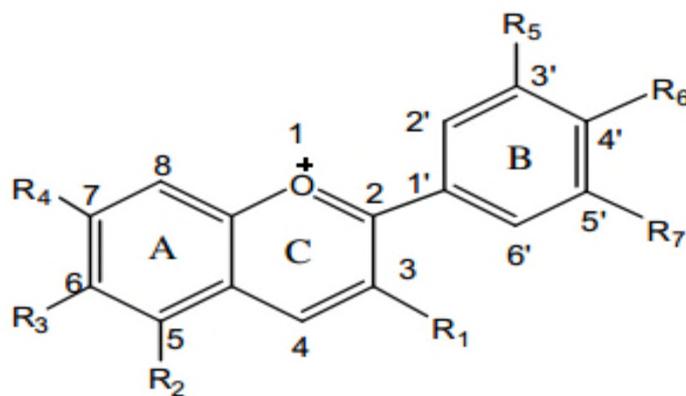


Figure 4 : Structure du cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium. (Castañeda-Ovando et al, 2009)

En raison de la très grande réactivité du noyau flavylum avec les composés nucléophiles, les anthocyanidines sont instables et rarement présentes sous cette forme dans les tissus végétaux. Généralement elles sont présentes sous forme d'hétérosides comme la plupart des flavonoïdes (figure 5). (Gomez, 2009)

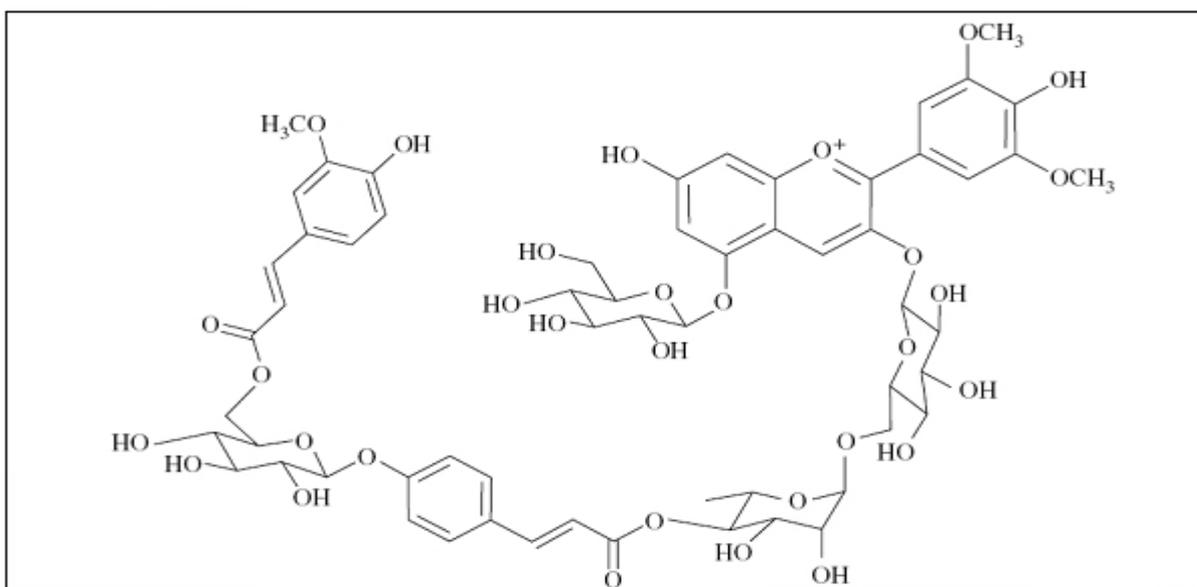


Figure 5: Structure de l'un des principales anthocyanes isolée à partir des pétales de *Petunia hybrida* (Brouillard *et al.*, 2010 ; S. Barnes, 2010).

I-2-5- Propriétés physicochimiques des anthocyanes :

Les anthocyanes sont des substances à structures complexes, et de la complexité de leur structure découle la complexité de leurs propriétés.

Les variations que peuvent subir ces propriétés, sous l'influence des paramètres physico-chimiques sont multiples : le nombre de substitutions, la nature et la position des substituants que porte le cation flavylium affectent, dans une grande mesure, d'une part les propriétés optiques (donc le dosage et l'identification) et d'autre part la stabilité chimique. Parmi les substituants les plus fréquents on note :

- les radicaux de substitutions (CH_3 , H_2O , OH^- , H^+ ...)
- les sucres : en nombre, nature et positions variables ;
- les acides et esters organiques et minéraux ;
- auto-association, ou associations avec d'autres flavonoïdes,... (Gomez, 2009 ; Macheix *et al.*, 2005).

I-2-5-1- Impact sur la stabilité :

Solubilité :

Le critère le plus déterminant de la stabilité des anthocyanes est leur hydrosolubilité. Les différences structurales au sein d'une même famille font qu'il est difficile de prédire la

solubilité d'une anthocyane dans un solvant donné. Deux éléments structuraux des anthocyanes modulent leur solubilité, étroitement combinés avec l'environnement physico-chimique :

- le pôle cationique de l'ion flavylum, réactif vis-à-vis des acides, souvent l'ion chlorure en milieu biologique;

- le taux de sucres fixés et leur position (les anthocyanes hydroxylées en position 3 sont en règle générale toujours glycosylées, permettant une meilleure solubilité et stabilité) (**EMILE, 2010 ; Ghosh et Konishi, 2007**).

a) En milieu aqueux :

A froid, les anthocyanes sont faiblement solubles dans l'eau et les anthocyanidines pas du tout, sauf à pH proche de 1. L'abaissement du pH et l'augmentation de la température, jusqu'à certaines valeurs, améliore cette solubilité.

Un gradient de pH croissant déstabilise progressivement les anthocyanes, réduisant ainsi leur hydrosolubilité.

Il en est de même pour la température et la durée d'exposition. A pH acides, ces deux paramètres agissent de manière synergique jusqu'à certaines valeurs puis leur action s'inverse (**Anthoni, 2007 ; Chebil, 2006 ; Barnes, 2010**)

b) En milieux organiques :

Les anthocyanidines présentent une bonne solubilité dans les solvants organiques y compris les solvants apolaires, notamment ceux de polarités intermédiaires comme l'alcool amylique et l'acétate d'éthyle.

Les anthocyanes par contre sont insolubles dans les solvants apolaires et solubles dans les solvants polaires comme l'acétone, le méthanol et l'éthanol, et leurs solutions aqueuses. Cette solubilité est notablement augmentée par l'acidification, organique ou minérale du solvant. Cette solubilité différentielle polaire/apolaire permet l'extraction sélective anthocyanes /anthocyanidines (**Mompon et al., 1996; Barnes, 2010**).

I-2-5-2- Impact sur le pouvoir optique (pouvoir absorbant) :

- les glycosides jouent un rôle dans l'intensité de la couleur : les 3-O-glycoside-anthocyanidines sont plus colorées que les 3,5- et 5-O-glycosides correspondants, avec 50% d'intensité en plus.

- une hydroxylation importante fait virer la coloration du rose au bleu alors que la méthylation induit le phénomène inverse. (Antal *et al.*, 2003)

- les esters phénoliques ont une tendance à maintenir stables les anthocyanes à pH neutre et à pH acide grâce à des liaisons hydrogènes. (Ghosh et Konishi, 2007 ; Macheix *et al.*, 2005).

La relation structure- propriétés optiques peut être modifiée par :

- modification du spectre d'absorption ;
- modification du maximum d'absorption (hypsochromie et bathochromie) ;
- variation de l'intensité de l'absorption (hyperchromie et hypochromie)(figure 6). (Harbone, 1967)

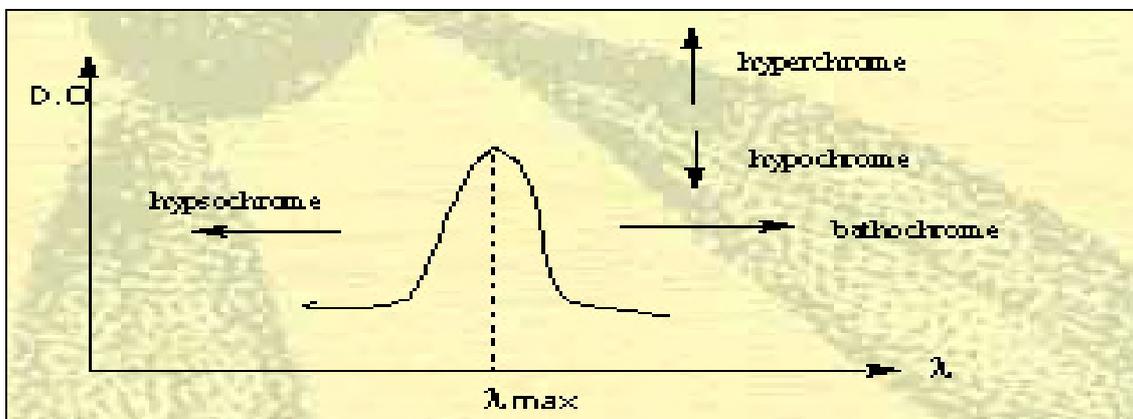


Figure 6 : Altérations de l'absorption sous l'effet de la copigmentation. (Ranarivelo, 2011).

I-2-5-3- Effet du pH :

La structure des anthocyanes évolue en milieu aqueux, des changements de couleur sont dus à plusieurs types d'équilibre chimiques entre différentes formes structurales dépendantes du pH. (Ben Amor, 2008) (figure 2, annexe A)

I-2-5-4- Effet de la température :

La température exerce un effet paradoxal sur les anthocyanes :

Chez les plantes, les anthocyanes assurent un rôle protecteur et régulateur du à des variations thermiques, en fonction du climat, des saisons et des altitudes. Elles jouent un rôle de thermostat :

- en saison chaude et à basse altitude, elles filtrent l'excès de lumière, protégeant ainsi les cellules ;

- en saison froide et à haute altitude, les anthocyanes libèrent, sous forme de chaleur, la lumière absorbée activant ainsi le métabolisme cellulaire.

A partir d'un certain seuil, la température exerce un effet altérant directe sur les anthocyanes et un effet altérant indirecte par activation des réactions d'oxydation. (**Oliver Neill, 2002**)

Le schéma (figure 7) montre les voies thermiques proposées de dégradation d'anthocyanes :

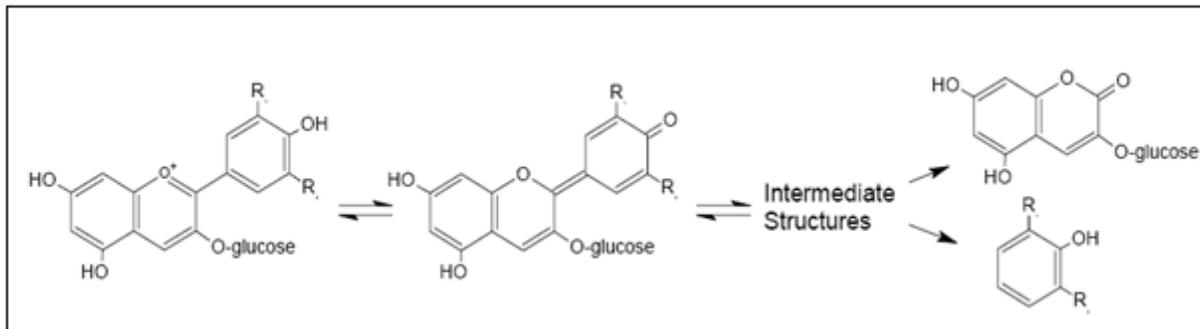


Figure 7 : La dégradation du monoglucoside d'anthocyanes à pH 3,7 accélérée par la chaleur (**Rein, 2005**).

I-2-5-5- Effet de l'oxygène :

L'oxygène, combiné à la température, est le principal facteur d'altération des anthocyanes et donc de leurs propriétés optiques et antioxydantes. (**Hopkins, 2003**)

L'activité oxydative de l'oxygène s'exerce soit :

- de manière directe sur les molécules anthocyaniques ;

- soit de manière indirecte, par action sur les molécules du milieu, qui vont libérer des intermédiaires réactionnels (radicaux libres, H₂O₂,...) qui vont oxyder les anthocyanes (**Cisse et al., 2009**).

I-2-6- Biodisponibilité des anthocyanes :

Pour exercer leurs effets physiologiques, ces anthocyanes doivent être absorbées et distribuées par le sang vers les tissus et organes et cela sans subir d'altération enzymatique ou autre (interactions moléculaires, conjugaison...). Or la biodisponibilité des polyphénols en général, leur formes de transport (natives et / ou métabolisées ou conjuguées) et leurs activités biologiques sont encore mal connues. (**Wiseman, 1999**)

Les polyphénols en général et, donc les anthocyanes, sont absorbables au niveau de *l'intestin grêle*, via le Glucose Co-transporteur Na⁺ dépendant, à faibles doses ou au pH intestinal ces molécules présentent des problèmes de stabilité et donc de solubilité.

Des tests chez le Rat ont montré que 30 minutes après administration d'extraits anthocyaniques à la dose de 400 mg/kg poids frais, la concentration plasmatique était de l'ordre de 2-3 microg/ml, avec une biodisponibilité absolue de 1,2 % de la dose administrée.

Différents travaux sur l'absorption intestinale du resvératrol *in situ* chez le rat ont montré que *moins de 10 %* du composé passent la muqueuse intestinale et que celui-ci se retrouve majoritairement (à plus de 90 %) sous la forme *glucurono-conjugée* (structure non encore identifiée).

Chez l'homme l'absorption des anthocyanes est encore plus faible : pour une administration de 2,7mg/kg de polyphénols, la concentration plasmatique n'est que de *11microg/L* (figure 8).

Et contrairement aux idées reçues, Il semblerait que l'absorption des anthocyanes (quoique toujours faible) est meilleure avec le jus de raisin qu'avec le vin rouge. Divers paramètres peuvent expliquer cette malabsorption des anthocyanes :

- leur instabilité structurale, surtout en milieu alcalin (intestinal) ;
- leurs réactivités avec leur environnement physico-chimique ;
- le métabolisme par les enzymes intracellulaires des anthérocytes et des hépatocytes ;
- la dégradation par la flore intestinale. (**Frank et al., 2003**)

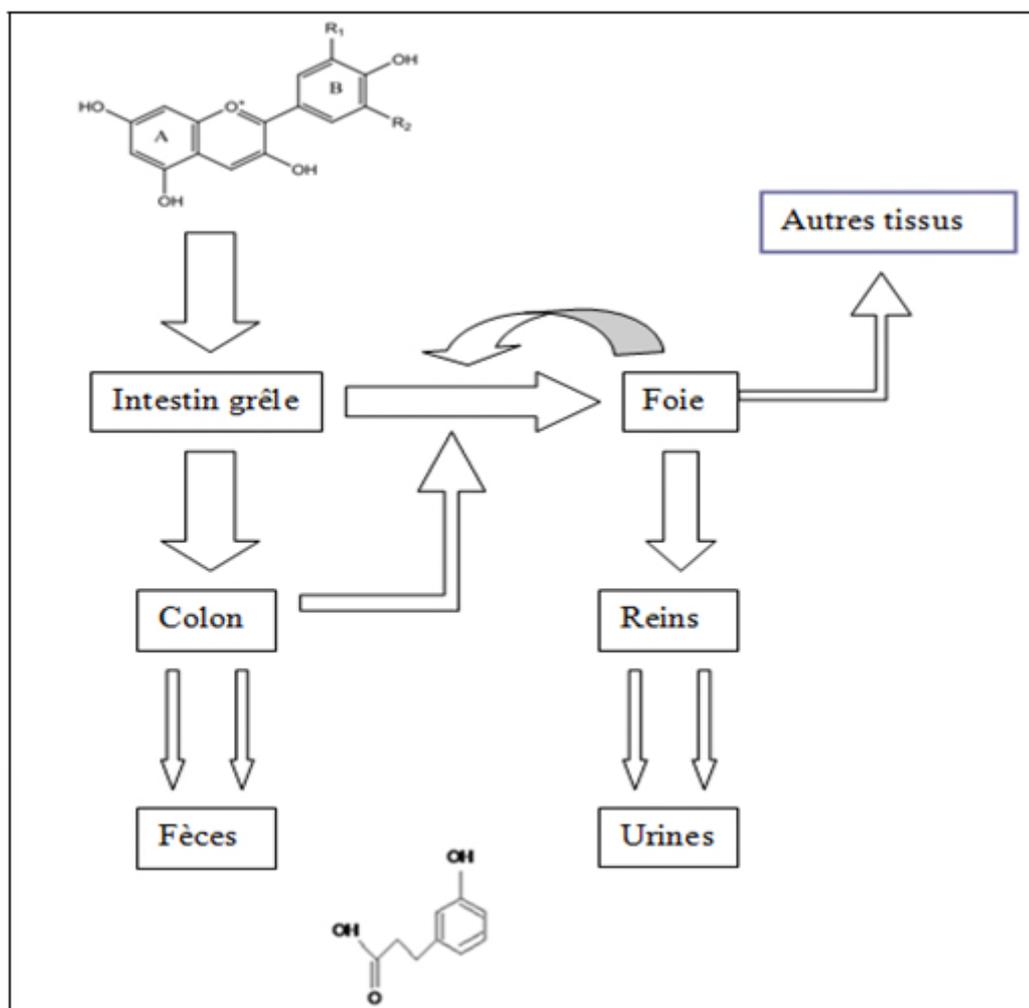


Figure 8 : Principaux compartiments impliqués dans le métabolisme des anthocyanes. (Hollman, 2001)

I-2-7- Anthocyanes et pouvoir antioxydant

Les composés phénoliques ont la particularité d'avoir un ou plusieurs groupements hydroxyles greffés sur un noyau benzénique (ou noyau flavylum pour les anthocyanes). Ceci leur donne un caractère plus acide que les autres groupements alcools, ils perdent facilement un proton H^+ pour former l'ion phénoxy. La perte d'un hydrogène engendre la formation d'un radical fortement stabilisé par mésomérie. Cette réactivité chimique confère aux composés phénoliques leur caractère antioxydant (figure 3, annexe A). En cédant un hydrogène aux radicaux libres ($ROO\bullet$), ces composés (A-H) les stabilisent sous forme d'hydroperoxydes $ROOH$, bloquant ainsi les réactions de propagation de la chaîne d'oxydation. La délocalisation de l'électron non apparié sur le cycle aromatique et l'absence de site d'attaque de l'oxygène empêche la propagation de nouvelles réactions radicalaires (Berset, 2006) selon la réaction suivante:



Les antioxydants sous la forme A• peuvent également freiner la phase de propagation en formant une addition chimiquement stable (adduit) avec les radicaux formés comme suite:



Les polyphénols peuvent aussi inhiber les oxydations de façon indirect, en désactivant l'oxygène singulet ou en chelatant les métaux de transition (Fe+2, Cu+2).

Certains enfin sont des inhibiteurs des enzymes d'oxydation en particuliers de la lipoxygénase ou de la cyclo-oxygénase. (Marfak, 2003)

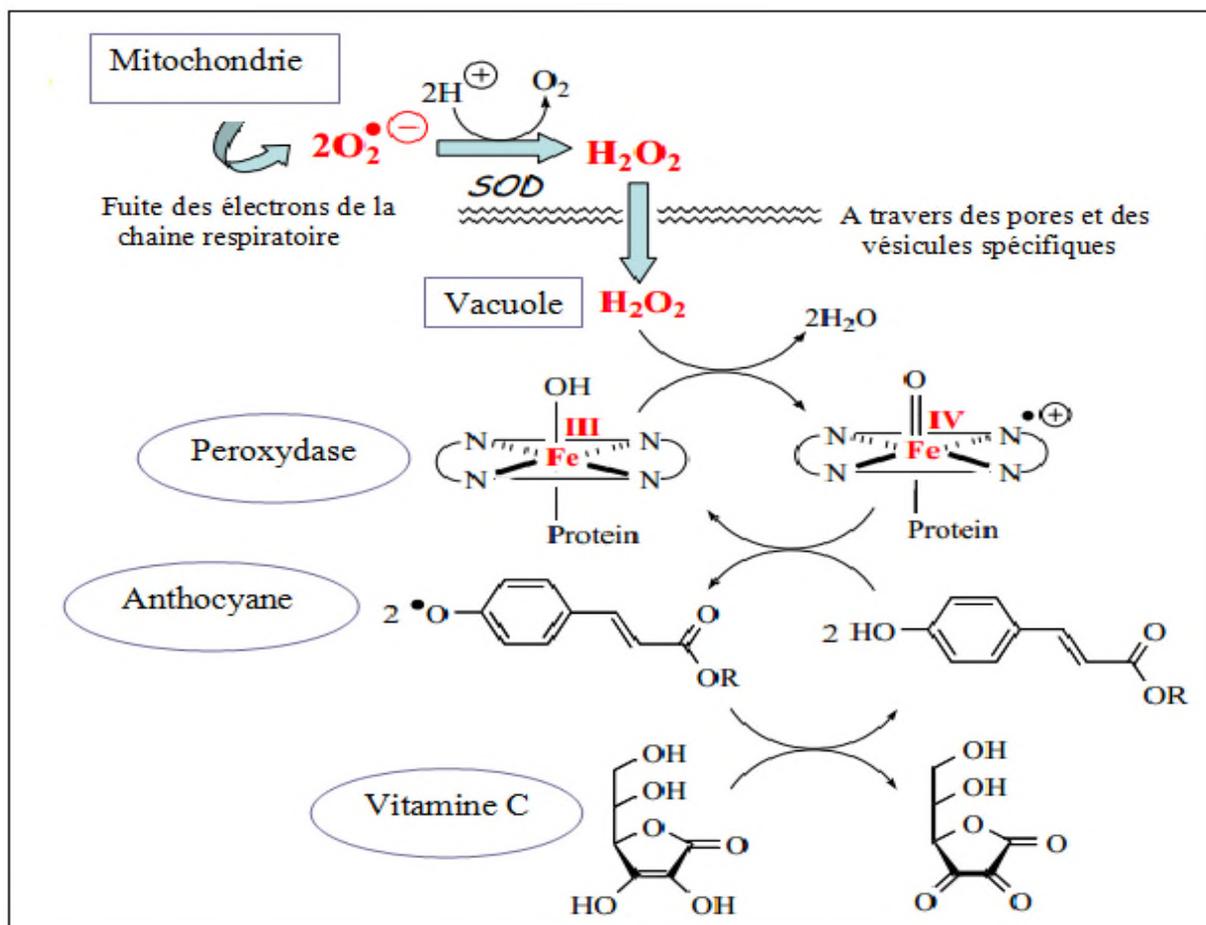


Figure 9 : le pouvoir antioxydant des anthocyanes. (Takahama et Oniki, 1998).

I-2-8- Extraction des anthocyanes, principe et limites :**I-2-8-1- Principe de l'extraction :**

Bien qu'il n'existe aucun protocole d'extraction qui peut être considéré de façon optimale pour tous les types d'échantillons, les méthodes les plus fréquemment utilisées pour extraire les composés phénoliques de leurs sources végétales pour des fins analytiques sont l'extraction par solvant et celle utilisant des fluides supercritiques.

La plupart des phénols simples présents dans la vacuole peuvent aisément être extraits avec des mélanges méthanol/eau. Mais pour extraire les anthocyanes, la procédure la plus commune utilise des solvants tels que le méthanol ou l'éthanol avec différentes proportions d'acide chlorhydrique (HCL 0.1-1%). L'utilisation d'un solvant organique a l'avantage d'inactiver les enzymes présentes dans les tissus végétaux et de faciliter le traitement subséquent de l'extrait obtenu, car il est facilement évaporé. Néanmoins, dépendant de la nature de l'échantillon, il peut s'avérer nécessaire d'ajouter de l'eau afin de réaliser une extraction complète des anthocyanes. L'éthanol est moins toxique, bien qu'il soit moins efficace dans l'extraction et plus difficile à éliminer plus tard. Des réactions d'estérification des groupements carboxyliques libres peuvent avoir lieu en présence d'éthanol, si le processus d'extraction est réalisé à haute température. **(Emile, 2010)**

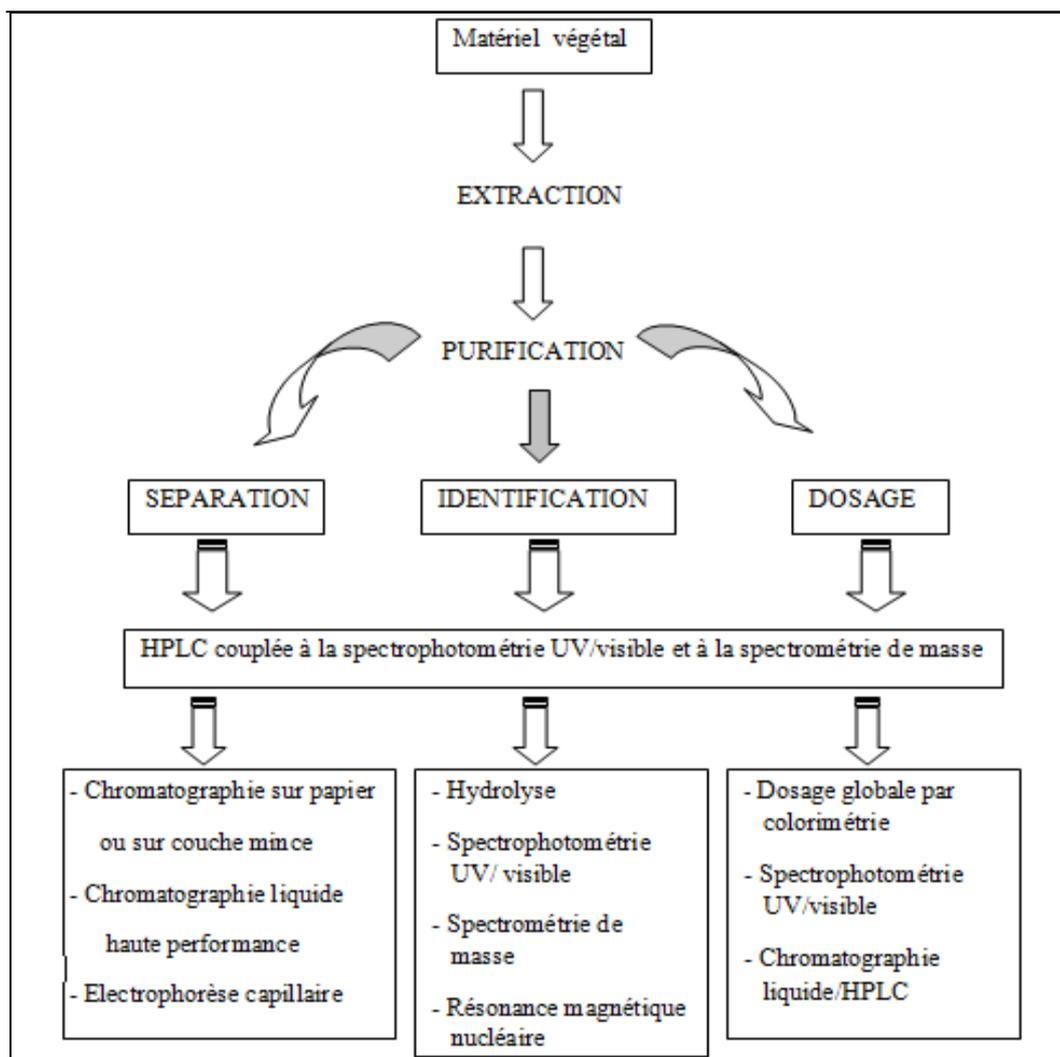


Figure 10 : schéma récapitulatif de l'extraction et de purification des anthocyanes. (Macheix et al., 2005)

I-2-8-2- Limites des techniques :

Pour être valable pour la majorité des composés phénoliques le schéma générale des différentes étapes d'extraction ; de caractérisations et de dosage devra quelque fois être modifié pour être mieux adapté à leur nature chimique ; leur solubilité et leur degré de liaisons avec d'autre constitutions chimiques :

- pendant l'extraction et la concentration subséquente, l'acide chlorhydrique peut hydrolyser les anthocyanes fortement acylés, particulièrement celles liées à des acides aliphatiques. Pour cette raison, et afin de réaliser une meilleure extraction des anthocyanes labiles, des conditions acides plus douces comme celles obtenues avec l'acide acétique, tartrique ou citrique sont recommandées.

- la forte réactivité des molécules d'anthocyanes peut les dégrader ou leur faire subir des réactions pouvant détériorer ou modifier leurs propriétés. Par exemple, une concentration élevée d'anthocyanes peut initier la formation des polymères.

- comme ils sont facilement oxydables, il est recommandé de travailler à une température de 0 à 4°C et d'assurer une protection en ajoutant un agent reducteur (acide ascorbique ou métabisulfite de sodium) au milieu d'extraction.

- l'adjonction d'un inhibiteur des glucosidases, enzymes pouvant encore fonctionner au milieu alcoolique ou acétonique, permet par ailleurs d'éviter l'hydrolyse d'hétéroside phenoliques fragiles lors de l'extractions.

Après élimination de l'alcool par évaporation sous vide, il est ensuite nécessaire de purifier l'extrait global ainsi obtenu, d'abord en éliminant les pigments chlorophylliens et caroténoïdes (extraction à l'éther de pétrole), puis en extrayant les composés phénoliques avec un solvant de polarité intermédiaire comme l'acétate d'éthyle. La plupart des phénols se retrouvent alors dans ce solvant, qu'il est en suite aisé d'éliminer sous vide afin de transférer finalement dans le méthanol la fraction phénolique correctement purifiée. Cette fraction sera ensuite utilisée pour les analyses qualitatives et quantitatives.

- les pigments anthocyaniques, après extraction par un mélange méthanol/HCL, ne pourront pas ensuite être purifiés avec l'acétate d'éthyle. L'acidification permet dans ce cas de stabiliser les anthocyanes sous la forme du cation flavylum, sans être cependant à l'abri d'une dégradation des molécules les plus fragiles. A l'opposé, certains flavonoïdes apolaires, par exemple ceux liés aux stérols ou ceux présents dans les exsudats de bourgeons ou sur les tissus externes foliaires, doivent être extraits avec des solvants plus apolaire, comme le chloroforme ou l'hexane. (**Kong et al., 2003 ; Macheix et al., 2005 ; Vernauteren et al., 1996**)

Partie pratique

Matériel
et
méthodes

II-1- Matériels :

II-1--1- Matériel végétal :

- L'orange : *citrus sanguinelli* (orange sanguine) cultivée dans la région de Bejaia
- Fleurs :
 - *Rosa damacena* : obtenu sous forme de pétales séchés originaire du Maroc (herboriste) ;
 - *Hibiscus sabdariffa* : obtenu sous forme de pétales séchés originaires d'Egypte (herboriste).



Hibiscus sabdariffa



Rosa damacena



citrus sanguinelli

Figure 11 : Photos du matériel végétal utilisé.

II-1-2- Micro-organismes utilisés :

Quatre souches de bactérie et une levure ont été utilisées dans ce travail :

- *Serratia marcescens* (S91) isolée du pus ;
- *Pseudomonas aeruginosa* (S97) isolée du pus ;
- *Enterobacter aerogenes* (S903) isolée du sang ;
- *Klebsiella pneumoniae* (S912) isolée du sang ;
- Une levure *Candida albicans* (buccale).

Les souches sont fournies par (CHU) de Sétif.

✓ Entretien des microorganismes :

Isolement : Des colonies isolées sont prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile, puisensemencées sur gélose Mueller-Hinton (MH). Une colonie isolée est repiquée sur gélose inclinée MH.

Amplification : avant chaque test un inoculum est prélevé de la gélose inclinée, homogénéisé dans 10 ml de bouillon nutritif puis porté à l'incubation pendant (18h) à 33°C.

Conservation : Les géloses inclinées sont conservées à 4°C et revivifiées avant chaque test.

II-2- Protocole expérimentale :

II-2-1- Protocoles d'extraction :

Il n'y a pas de protocole d'extraction permettant l'obtention d'anthocyanes isolés.

Tous les protocoles que nous avons utilisés résultent de modifications et d'adaptations du protocole standard. Ces modifications ont été adoptées après mise au point par des pré-tests.

- traitement de l'orange : l'extraction des anthocyanes est faite à partir du jus et de la peau.

II-2-1-1- Extraction des anthocyanes du jus de l'orange sanguine :

L'extraction des anthocyanes est effectuée selon la méthode de **Robards et Antolovich, (1997)** qui utilise un solvant d'extraction composé de l'eau, alcool et acide HCl :

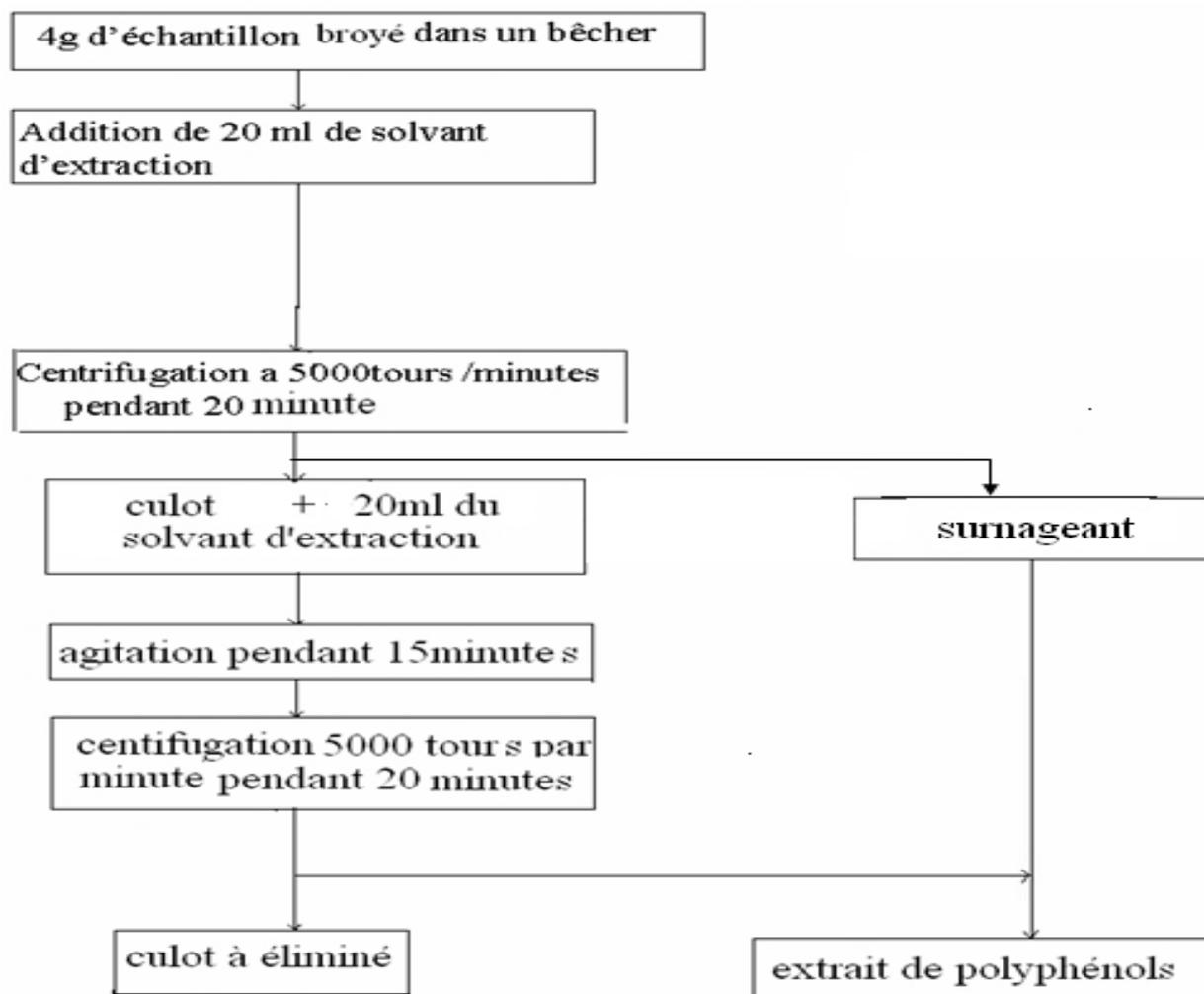


Figure 12 : protocole d'extraction des anthocyanes. (Robards et Antolovich, 1997)

Ce protocole est modifié par :

- extraction suivant le protocole standard(E 1) ;
- une deuxième extraction (E 2) effectuée sur le résidu, après acidification du solvant en accord avec le *protocole d'extraction des anthocyanes* de l'IFV (Ribéreau-Gayon et Stonestreet, 1965) ;
- séchage de l'extrait final ;
- élimination des anthocyanidines de E1 et de E2 par lavage à l'acétate d'éthyle ;
- récupération des anthocyanes de E1 et d'E2 par solubilisation aqueuse à chaud (pH final 1,5), une partie est testées telles quelles ;

- une autre partie est soumise à une précipitation alcaline (NaOH) donnant deux fractions : une fraction soluble (filtrat) et une autre insoluble (résidu). Les deux fractions sont ensuite récupérées avec de l'eau acidifiée (HCL).

II-2-1-2- Extraction des anthocyanes de la peau d'orange et de la poudre des fleurs :

Pour la peau d'orange et les fleurs, nous avons effectué une extraction solide-liquide selon **EMILE, 2010** :

- le matériel végétal est broyé, tamisé et séché jusqu'à poids constant.
- 50 g de la poudre tamisée est additionnée de 100 millilitre du méthanol. (épuisement répété trois fois)
- l'ensemble est chauffé à 50-55°C pendant 30 minutes (système bain-marie).
- après refroidissement, on récupère le filtrat et le résidu par plusieurs filtrations.
- une deuxième extraction est effectuée à partir du résidu par le méthanol acidifié.
- les deux extraits sont séchés par évaporation sous vide avec un léger chauffage, et le résidu sec est ensuite lavé par l'acétate d'éthyle. (**Macheix et al., 2005 ; Vercauteren et al., 1996**)
- les anthocyanes sont récupérées par de l'eau chaude légèrement acidifiée et testées telles quelles.

II-2-2- Dosage des anthocyanes :

Les anthocyanes sont déterminées par spectrophotométrie après décoloration par l'acide sulfureux (sous forme de bisulfite de sodium) du cation flavylium (**Ribéreau-Gayon et Stonestreet, 1965**). C'est la méthode officielle retenue par l'Institut National Français du Vin.

➤ Principe :

La technique est rétroactive : elle est basée sur le dosage de la coloration totale de la solution à analyser suivie du dosage de la décoloration de la solution d'anthocyanes après l'ajout du bisulfite de sodium. Ce phénomène est dû à la réaction entre le cation flavylium et l'hydrogénosulfite HSO₃. Cette réaction est équilibrée et conduit à la formation d'un produit incolore.

➤ **Réactifs :**

- une solution d'éthanol à 95 % acidifiée à 0,1 % avec de l'acide chlorhydrique pur (HCl) ;
- une solution d'HCl à 35 % diluée à 2 % dans de l'eau distillée ;
- une solution de bisulfite de sodium (Na₂S₂O₅) à 150 g/l.

➤ **Mode opératoire :**

- dans un tube à essai, on a mélangé 1 ml d'extrait d'anthocyanes ; 1 ml de la solution d'éthanol et 20 ml de la solution d'HCl.
- préparer des cuves pour le spectrophotomètre comme suit :
 - cuve A : 5 ml du mélange + 2 ml d'eau déminéralisée
 - cuve B : 5 ml du mélange + 2 ml de bisulfate
- traiter d'abord les cuves sans bisulfite pour éviter toute décoloration par les résidus.
- les absorbances sont mesurées à 520 nm.

➤ **Expression des résultats :**

On peut exprimer approximativement la variation d'Absorbance (DOA-DOB) par :

$$[\text{Anthocyane}] \text{ mg/l} = (\text{DOA-DOB}) \cdot 875$$

875 : pente de la droite d'étalonnage obtenue à partir de malvidine-3-glucoside.

II-2-3- Etude du spectre optique des anthocyanes :

La variation du spectre optique des anthocyanes a été testée pour l'extrait de *R. damacena* :

L'extrait aqueux acidifié (pH 1,5) est progressivement alcalinisé par une solution de NaOH 0,1 N. (Isorez, 2007)

II-2-4- Spectrophotométrie UV-visible des anthocyanes:

Les différents extraits ont été soumis à un balayage UV-visible (200-600 nm) à fin :

- d'une part de déterminer le degré de pureté de chaque extrait ;
- d'autre part de comparer les profils des anthocyanes obtenues pour chaque produit et entre les différents produits testés.

II-2-5- Test de l'activité antimicrobienne des extraits anthocyaniques :

Les anthocyanes sont réputées pour avoir une activité antiseptique (Akroum, 2011 ; Tabart, 2011). Cette dernière étant antagoniste avec tout effet protecteur, sa mise en évidence s'impose :

- les différents microorganismes ont été ensemencés dans un milieu liquide (bouillon Mueller-Hinton) en présence et en absence des extraits anthocyaniques.
- l'activité antiseptique est mise en évidence par appréciation de la croissance des cultures, effectuée par mesure de la densité optique.

II-2-6- Evaluation de l'activité "anti-radicalaire" des anthocyanes :

La capacité des anthocyanes extraits à neutraliser un générateur de radicaux libres, le peroxyde d'hydrogène (Oliver Neill, 2002 ; Takahama et Oniki, 1998), a été testée :

le bouillon de culture (MH) est additionné de peroxyde d'hydrogène et de chacun des extraits testés. Il est ensuite ensemencé par chacune des souches-test.

Après incubation (33°C/18h), la croissance est appréciée par D.O. en présence de deux témoins : culture en présence de H₂O₂ ; culture sans additifs.

II-2-7- Evaluation de l'activité anti-UV des anthocyanes :**II-2-7-1- Essais-témoins :**

Les microorganismes sont ensemencés dans un bouillon nutritif(MH) et incubés à 33°C pendant 18 à 24 heures :

- prélèvement des microorganismes et ensemencement par étalement sur gélose MH (pour les bactéries) et Sabouraud (pour la levure) ;
- exposition des boîtes aux UV à deux longueurs d'ondes 254 et 365 nm pendant 60 ; 90 et 180 secondes ;
- incubation à 33°C pendant 24 à 48 heures.

II-2-7-2- Administration des anthocyanes :

II-2-7-2-1- Exposition aux anthocyanes en milieu solide : test de la gélose en bicouche.

La préparation des boîtes contenant une gélose en bicouche :

- on verse une gélose (MH) dans une boîte de pétri en position inclinée et on laisse refroidir ;
- la même gélose contenant chacun des différents extraits anthocyaniques est coulée en biseau sur la première et on laisse refroidir (figure 13).
- les souches sont ensemencées par étalement ;
- exposition des boîtes aux UV à deux longueurs d'ondes 254/365 nm pendant 60/90 secondes ;
- incubation à 33°C/24 h.



Figure 13 : préparation de la gélose en bicouche.

II-2-7-2-2- Administration des anthocyanes en milieu liquide :

a) suspension des anthocyanes dans l'eau physiologique :

- un millilitre d'extrait anthocyanique est additionné à 3 millilitre d'eau physiologique dans chaque tube à essai. Ces derniers sont additionnés de chacune des souches et laissés en contact 3 heures ;
- cette suspension est ensemencée par stries dans une moitié d'une boîte (gélose MH), l'autre moitié étant réservée à l'ensemencement du témoin négatif (pas d'anthocyanes ni d'irradiation UV).
- exposition des boîtes aux UV à la longueur d'onde 365 nm pendant 90 secondes.

- incubation à 33°C/24 à 48 h.

b) incorporation des anthocyanes au milieu de croissance (bouillon) :

- le bouillon nutritif (MH) est additionné d'un millilitre de chaque extrait d'anthocyane,ensemencé de chacune des souches et incubé à 33°C pendant 24 à 48 heures.

- les tubes à essai contenant les extraits anthocyaniques sont ensemencés par étalement sur gélose MH et Sabouraud ;

-exposition des géloses aux UV à la longueur d'onde 254 nm pendant 60 ; 90 secondes ;

- incubation à 33°C/24 à 48 h.

II-2-8- Impact physiologique des anthocyanes sur les cellules :

L'état morphologique des cellules et des colonies, avant et après administration des anthocyanes et exposition UV, est apprécié par microscopie.

II-2-9- Diffraction aux rayons X (DRX) :

Les extraits anthocyaniques de la fleur *R. damacena* ont été analysés par DRX :

- d'une part pour une appréciation de l'aspect structural, cristallin ou amorphe ;
- d'autre part pour une comparaison structurale des différentes anthocyanes de l'extrait testé.

Résultats
et
discussion

III-1- Résultats :**III-1-1- Dosage des anthocyanes :**

L'extraction des anthocyanes par le protocole adopté dans cette étude a permis d'obtenir une teneur en anthocyanes (suivant la formule : [anthocyanes] mg/l = (DOA-DOB) x 875). Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau II : Résultats du dosage des anthocyanes.

Les extraits	En absence de Bisulfite (DO)	En présence de Bisulfite (DO)	Teneur (mg/l)
Filtrat <i>R. damacena</i>	7,68	3,58	3587,5
Résidu <i>R. damacena</i>	3,40	2,08	1155
Filtrat <i>H. sabdariffa</i>	3,36	2,00	1190
Résidu <i>H. sabdariffa</i>	4,24	1,98	2075,5
Filtrat peau d'Orange	4,72	4,50	192,5
Résidu peau d'Orange	3,28	2,18	962,5

La teneur en anthocyanes est significativement élevée pour l'extrait filtrat *R. damacena* et très faible pour l'extrait filtrat de la peau d'orange (figure 14).

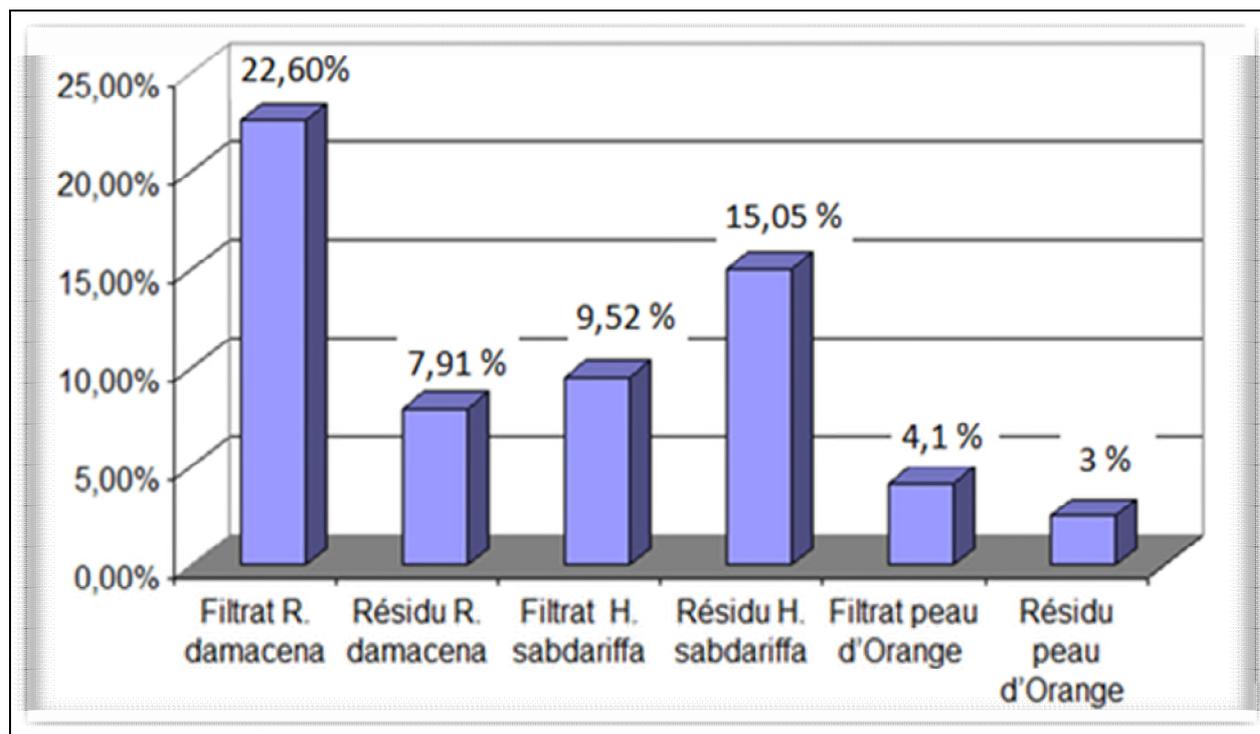


Figure 14 : teneur des extraits en anthocyanes extractibles par rapport à l'extrait total.

Remarque : Le jus et la peau d'orange ont été abandonnés du fait qu'ils ont présenté des teneurs faibles en anthocyanes.

III-1-2- Spectre optique des anthocyanes :

L'exposition d'une solution d'anthocyanes acidifiée (ici l'extrait filtrat *R. damacena*) à un gradient croissant de pH induit l'apparition d'une succession de nuances, allant du rose au jaune, passant par le rouge, le mauve, le vert et le marron (figure 15).

Cette succession de nuances traduit le passage de la molécule par divers stades d'instabilité progressifs. (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009 ; DELUC 2004 ; Isorez, 2007)

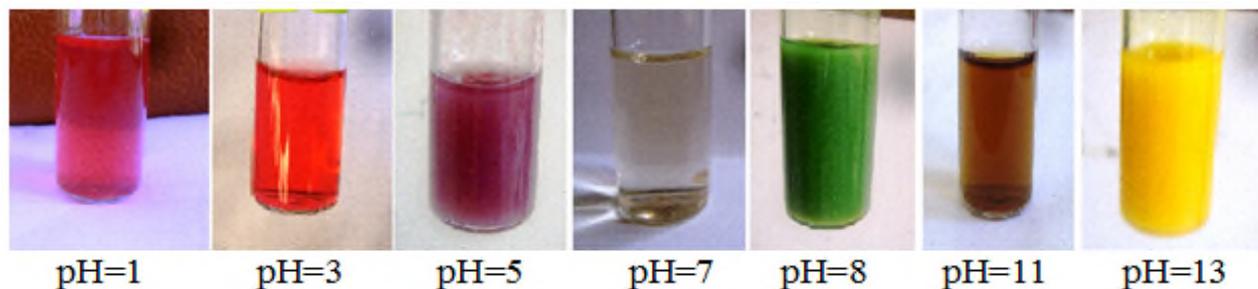


Figure 15 : variation de la couleur des anthocyanes en fonction du pH.

III-1-3- Test de l'activité antimicrobienne des extraits anthocyaniques :

Diverses publications reconnaissent aux anthocyanes des propriétés antiseptiques (AKROUM, 2011 ; TABART, 2011)

Les résultats suivants ne montrent aucun effet antiseptique notable des anthocyanes sur toutes les souches testées, bactéries et levure.

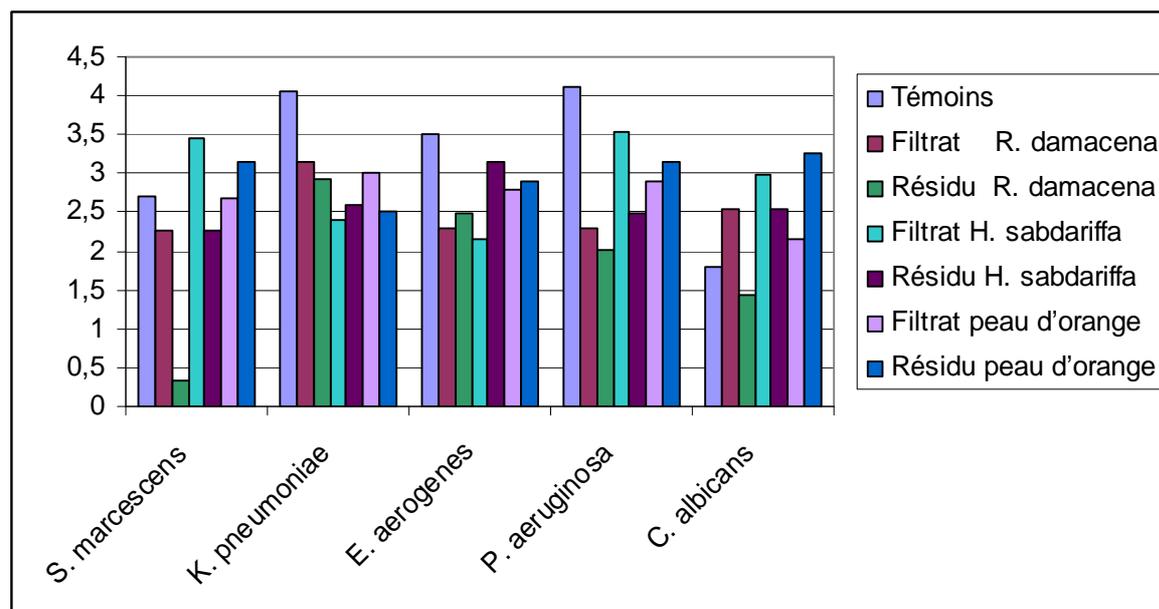


Figure 16 : Représentation graphique des résultats du test de l'activité antimicrobienne des extraits anthocyaniques (en ordonnées les DO)

III-1-4- Evaluation de l'activité "anti-radicalaire" des anthocyanes :

Le test, effectué dans le but d'évaluer l'aptitude des anthocyanes extraits à neutraliser le peroxyde d'hydrogène préalablement à l'ensemencement microbien (DELUC, 2004 ; MARFAK, 2003), a donné les résultats suivants :

Tableau III : évaluation du pouvoir "anti-radicalaire" des anthocyanes.

Souches	Témoin 1	Témoin 1 + H ₂ O ₂	Test 1 (+H ₂ O ₂)			
			Extrait 1	Extrait 2	Extrait 3	Extrait 4
<i>S. marcescens</i>	1,77	0,72	2,42	1,34	1,32	2,43
<i>K. pneumoniae</i>	1,55	0,73	2,30	1,59	1,60	2,08
<i>C. albicans</i>	1,47	0,49	2,28	1,43	1,05	3,33

Extrait 1 : filtrat *R. damacena*

Extrait 3 : filtrat *H. sabdariffa*

Extrait 2 : résidu *R. damacena*

Extrait 4 : résidu *H. sabdariffa*

Les valeurs reportées sur le tableau sont la moyenne de deux essais.

D'un coté, entre la croissance des souches témoins et celle des souches exposées au générateur des radicaux H₂O₂ (témoin 1+ H₂O₂) :

on constate une diminution manifeste des DO, donc de la croissance, en présence de H₂O₂ pour les trois souches testées, ce qui prouve l'effet oxydant de H₂O₂.

De l'autre coté, entre la croissance des souches exposées au H₂O₂ en absence (témoin 1 +H₂O₂) et en présence des anthocyanes, le même constat s'impose :

les écarts de DO sont nettement en faveur de l'effet protecteur des anthocyanes.

III-1-5- Spectrophotométrie UV-visible des anthocyanes:

La spectrophotométrie montre que :

- tous les anthocyanes obtenus absorbent dans l'UV à des intensités et à des longueurs d'ondes différentes ;
- les deux plantes se caractérisent par la présence de plusieurs molécules d'anthocyanes. La proximité des pics laisse penser qu'elles sont toutes de la même famille ;
- la plupart des molécules extraites ne montre aucun pouvoir absorbant dans le visible, excepté l'extrait "filtrat *R. damacena* (culot) (figure 18) ;

- toutes montrent des spectres d'absorption caractéristiques dans l'UV avec une importante absorbance ;
- la plupart des extraits présentent des molécules majeures caractérisées par des absorbances élevées à des longueurs d'ondes très définies, ce qui souligne une composition mono-moléculaire ;
- pour trois extraits, filtrat *H. sabdariffa* et les deux résidus *R. damacena*, les spectres montrent plusieurs molécules qui absorbent à des plages de longueurs d'ondes très proches, caractéristiques de molécules voisines ou d'une même famille ;
- enfin la diversité des maximums d'absorption exprime la grande diversité des anthocyanes, au sein d'une même plante et d'une plante à une autre.

Tableau IV : les pics et les absorbances de chaque extrait anthocyanique.

Extrait	Pic	absorbance
Filtrat <i>R. damacena</i> (filtrat)	299 nm	1,5230
	240 nm	0,5164
	258 nm	0,8786
	274 nm	1,0732
Filtrat <i>R. damacena</i> (résidu)	286 nm	0,7208
	515 nm	0,1699
Résidu <i>R. damacena</i> (filtrat)	251 nm	0,4448
	260 nm	0,4311
	265 nm	0,3950
	285 nm	0,4145
Résidu <i>R. damacena</i> (résidu)	285 nm	0,4680
Filtrat <i>H. sabdariffa</i> (filtrat)	265 nm	0,5578
Filtrat <i>H. sabdariffa</i> (résidu)	290 nm	1,0864
Résidu <i>H. sabdariffa</i> (filtrat)	292 nm	1,1700
Résidu <i>H. sabdariffa</i> (résidu)	266 nm	0,7912
	298 nm	1,2503

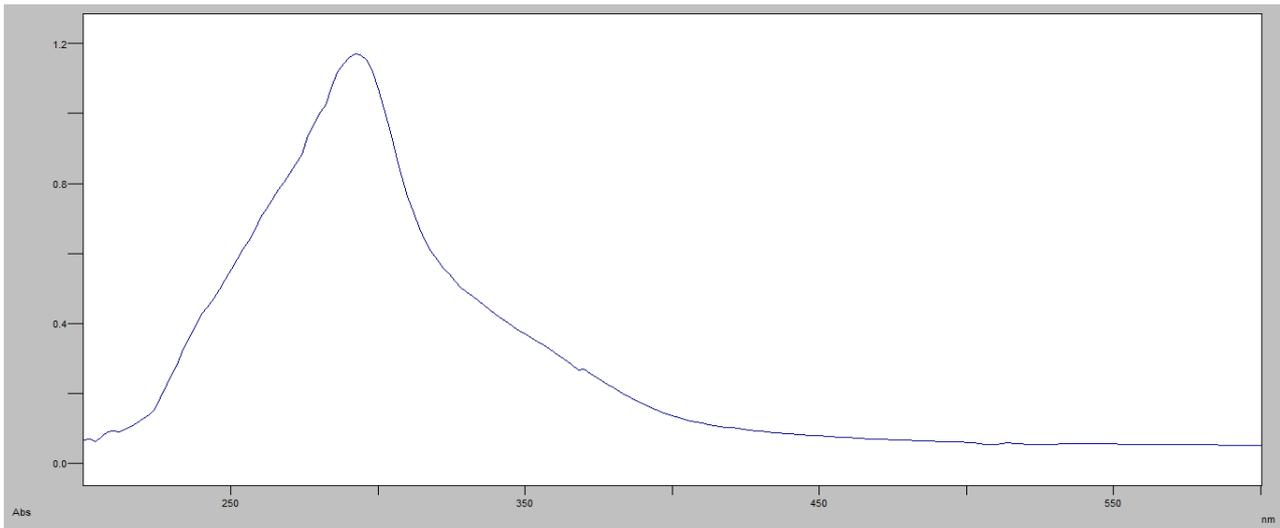


Figure 17 : Spectre UV-visible de l'extrait résidu *H. sabdariffa* (filtrat).

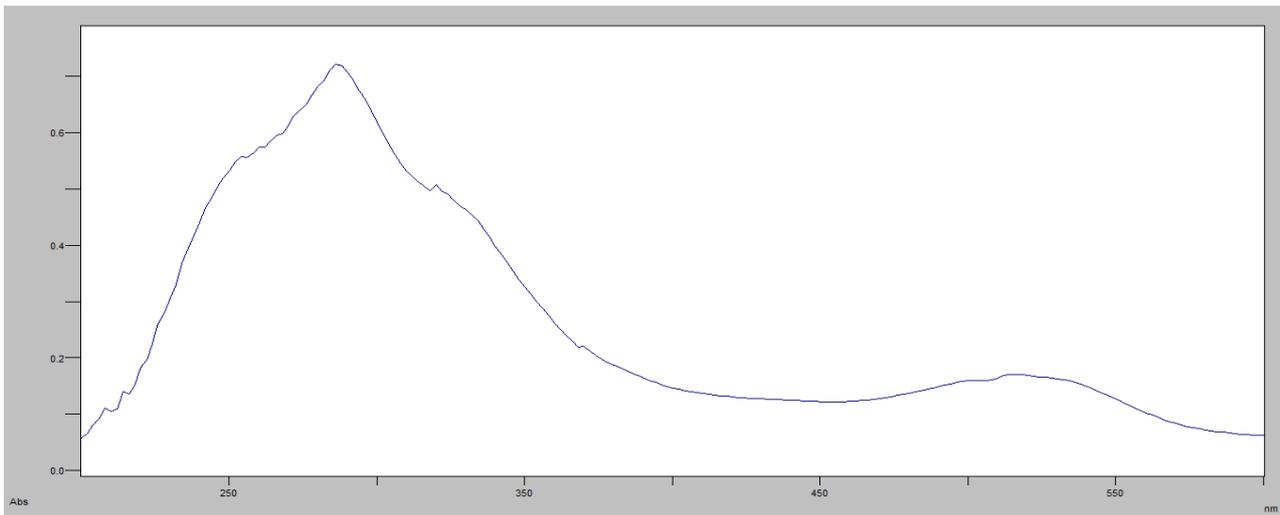


Figure 18 : Spectre UV-visible de l'extrait filtrat *R. damacena* (résidu).

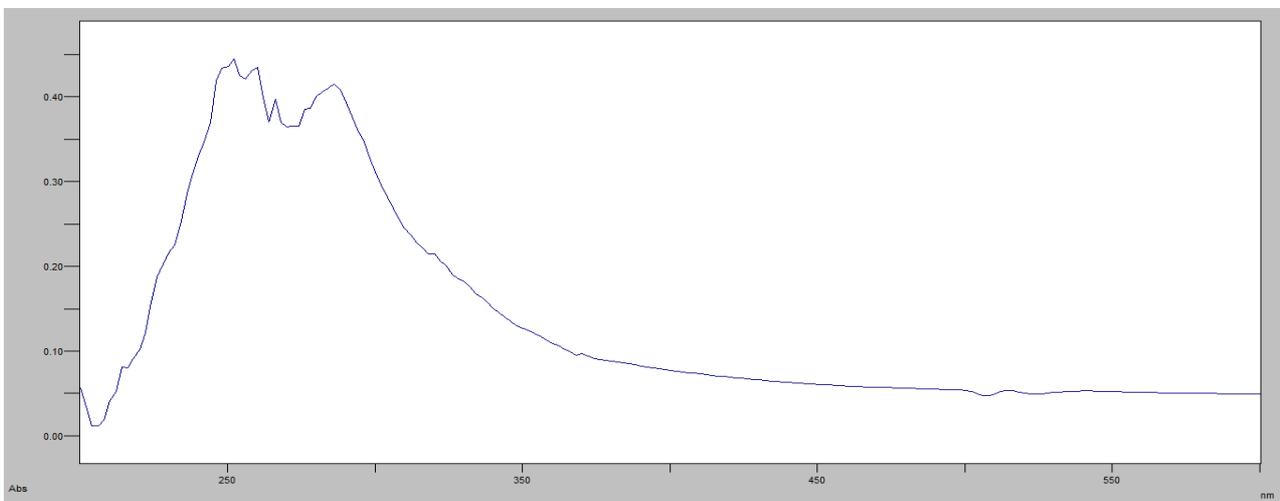


Figure 19 : Spectre UV-visible de l'extrait résidu *R. damacena* (filtrat).

Les résultats mineurs sont représentés dans l'annexe B (figure 5-9).

III-1-6- Evaluation de l'activité anti-UV des anthocyanes :

III-1-6-1- Essais-témoins :

L'exposition des souches-tests aux deux longueurs d'ondes UV et à différentes durées d'exposition montre leurs sensibilités variables. La croissance obtenue paraît négligeable quoi que variant avec la variation des paramètres. La levure (*C. albicans*) se montre la plus sensible des germes testés.

A 365nm, les radiations UV n'exercent aucun effet inhibiteur notable notamment sur les bactéries, même après 90 secondes d'exposition (figure 20).

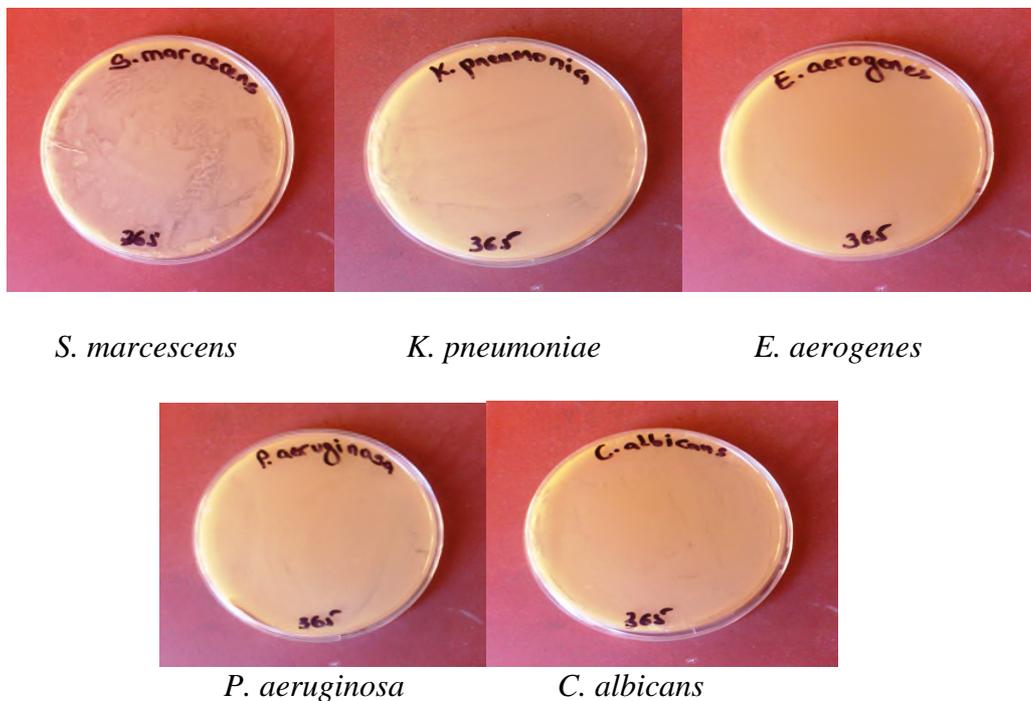


Figure 20 : croissance des souches microbiennes après exposition des microorganismes aux UV (365nm/90s).

Avec la réduction de la longueur d'onde l'effet inhibiteur paraît plus évident avec une croissance négligeable. La sensibilité de *C. albicans* est là aussi évidente (figure 21) :

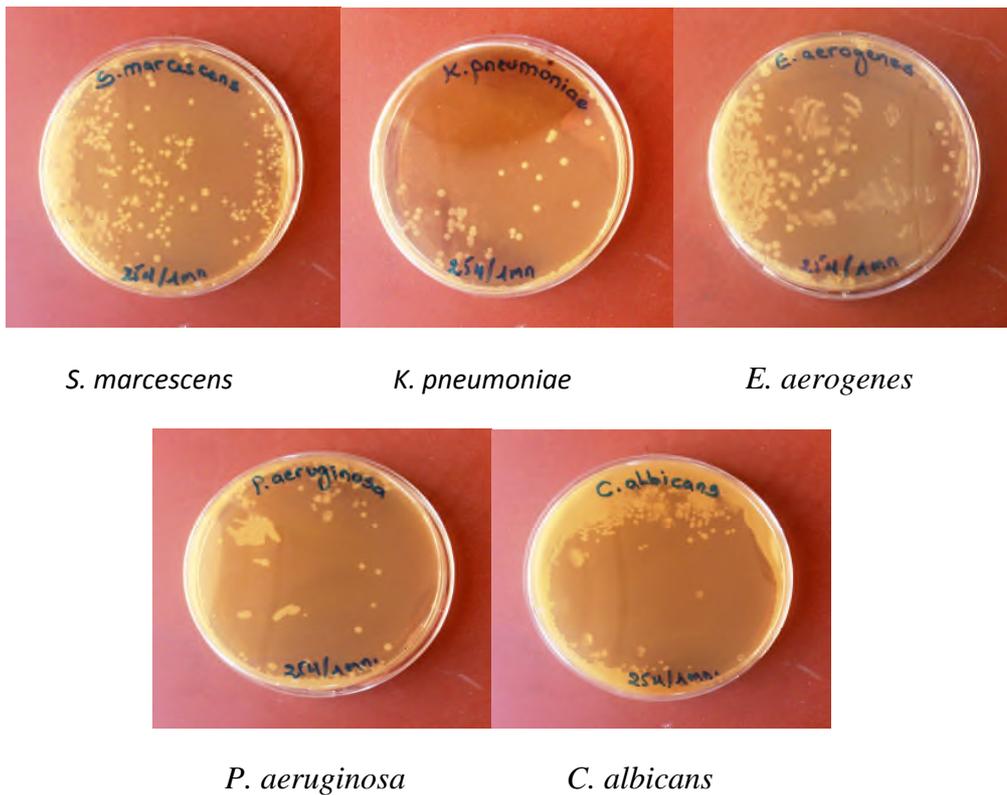


Figure 21 : croissance des souches microbiennes après exposition des microorganismes aux UV (254nm/60s).

Il est à noter que la croissance périphérique remarquée est due à la non exposition aux radiations sur la périphérie de la boîte.

La figure 22 montre l'inhibition de la croissance après exposition 90 secondes à 254 nm. On constate une inhibition totale de *C. albicans*, quelques rares colonies pour *E. aerogenes* et *K. pneumoniae* une croissance à peine plus importante pour *S. marcescens* et *P. aeruginosa*.

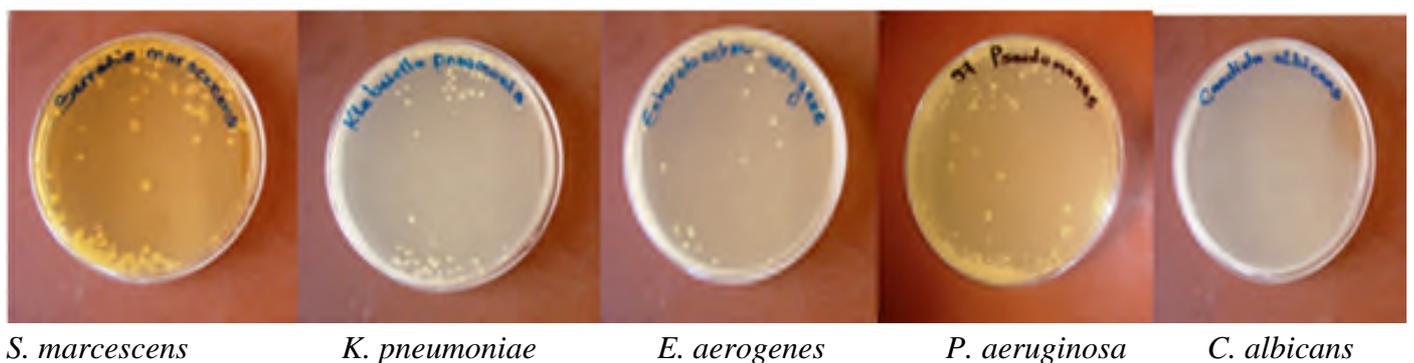


Figure 22 : croissance des souches microbiennes après exposition aux UV (254nm/90s)

III-1-6-2- Exposition aux UV en présence d'anthocyanes :

III-1-6-2-1- Administration des anthocyanes en milieu solide : test de la gélose en bicouche.

L'exposition aux UV des souchesensemencées sur une gélose en bicouche n'a pas montré de résistance particulière à l'irradiation. La croissance obtenue reste comparable à celle du témoin négatif et négligeable devant celle du témoin positif.



Figure 23 : Résultats du test de la gélose en double couche.

III-1-6-2-2- Administration en milieu liquide :

Suspension des anthocyanes dans l'eau physiologique :



S. marcescens

K. pneumoniae

E. aerogenes

P. aeruginosa

C. albicans

Figure 24: Croissance des souches en présence de l'extrait filtrat *H. sabdariffa* (eau physiologique) après exposition aux UV (365 nm/90 s).

Par comparaison au témoin négatif non irradié (partie gauche de la boîte), la croissance en présence des anthocyanes paraît satisfaisante.

En réalité ce résultat souligne davantage l'absence d'activité bactéricide des UV à la longueur d'onde utilisée, 365nm, ce test ayant été effectué préalablement à la détermination de la sensibilité aux UV des différentes souches (figure 20).

Les résultats mineurs sont représentés dans l'annexe C (figure 10).

Incorporation des anthocyanes au milieu de croissance :

L'assimilation des anthocyanes par les microorganismes pourrait nécessiter des cellules en métabolisme actif. L'addition de ces anthocyanes au milieu de culture favoriserait "leur utilisation " par les cellules et leur permettrait d'exprimer leur potentiel UV-protecteur. De plus cette activité nécessiterait peut être un environnement physico-chimique "bio", analogue à celui de leur matrice végétale.

Il faut prendre en considération les interactions possibles entre les anthocyanes et les constituants du milieu de culture. Ces interactions peuvent s'exercer dans le sens d'une meilleure stabilité des anthocyanes, mais aussi dans le sens d'une meilleure expression de leur photo-activité (hyperchromie et hypsochromie notamment). De plus, des interactions avec l'ADN (activation/inhibition de gènes) ne sont pas à écarter (Gradinaru, 2003 ; MACHEIX *et al.*, 2005 ; Thao Xuan, 2007 ;)

L'exposition des souches à 254 nm/60 secondes a donné des croissances très importantes, parfois comparables à celles des boîtes témoins (figure 25).

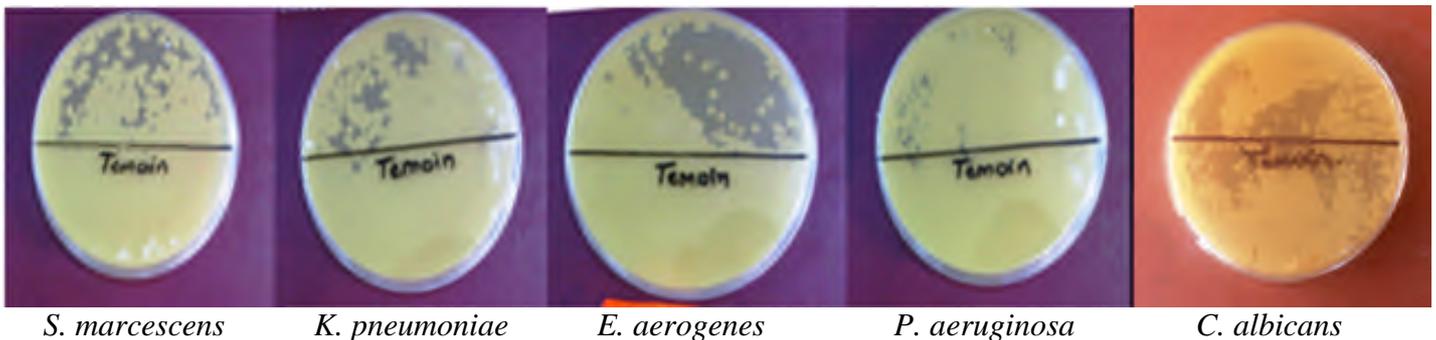


Figure 25 : Croissance des souches en présence de l'extrait filtrat *R. damacena* (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/60 s).

Les résultats mineurs sont représentés dans l'annexe C (figure11).

La levure bien que très sensible aux UV, montre une croissance notable en présence des anthocyanes.

Pour une meilleure mise en évidence de la part des anthocyanes dans la croissance des cellules, des paramètres plus stricts ont été utilisés, obtenus par une exposition plus prolongée aux radiations UV (figure 26).

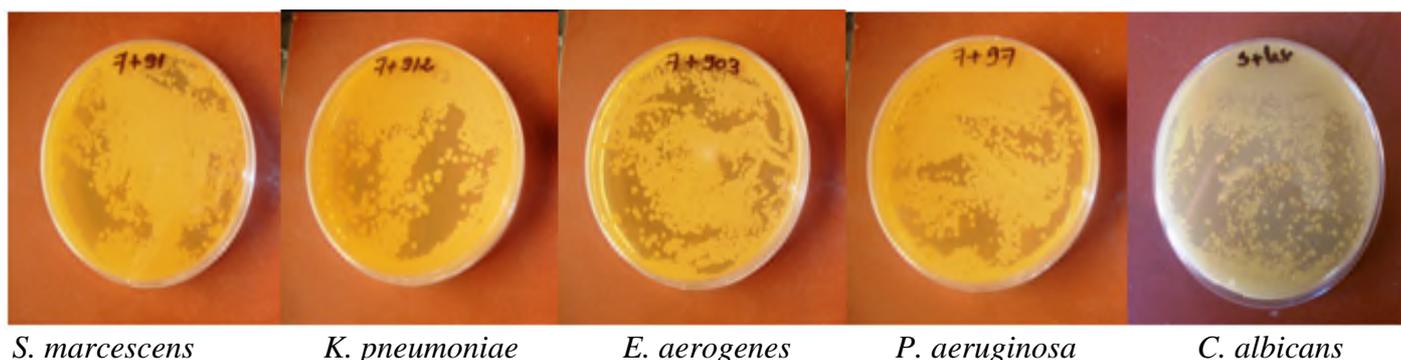


Figure 26 : Croissance des souches en présence de l'extrait résidu *R. damacena* (filtrat) (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/90 s).

Les résultats mineurs sont représentés dans l'annexe C (figure 12-18).

Dans le cas des cultures-témoins on note pour l'ensemble des souches une croissance plus que négligeable voire nulle pour *C. albicans* alors que pour les cultures-tests la croissance est bien manifeste quoi que plus faible que celles obtenues avec 254nm/60s.

On note ainsi une activité létale des UV plus importante mais ceci ne fait que mettre en évidence davantage le rôle UV-protecteur des anthocyanes testés.

III-1-7- Impact de l'UV-protection des anthocyanes sur l'aspect cellulaire et colonial des microorganismes testés :

L'observation microscopique des cellules bactériennes et des colonies obtenues (figure 27-28) sans traitement UV et après traitement UV et croissance en présence des anthocyanes n'a laissé voir aucune différence notable, ce qui peut laisser penser que les anthocyanes exerceraient une protection'' totale'' contre les UV.



Figure 27 : Observation microscopique des colonies de *S. marcescens* en absence et en présence des deux extraits anthocyaniques (filtrat *H. sabdariffa* et résidu *R. damacena*).



Figure 28 : Observation microscopique des colonies de *P. aeruginosa* en absence et en présence des deux extraits anthocyaniques (filtrat *H. sabdariffa* et résidu *R. damacena*).

III-1-8- Diffraction aux rayons X (DRX) :

Les graphes des signaux DRX (figure 29) montrent que :

- les anthocyanes obtenus sont en structure amorphe : les pics caractéristiques des structures cristallines sont totalement absents ;
- l'allure des graphes met en évidence des structures présentant une très grande similitude, sans être toutefois identique.

Ce dernier point, en conformité avec les résultats de la spectrophotométrie, souligne chez les plantes étudiées :

- une composition hétérogène en molécules anthocyaniques ;
- la difficulté d'extraction des anthocyanes ;
- les limites du protocole standard d'extraction et la nécessité de mettre au point des protocoles plus adaptés.

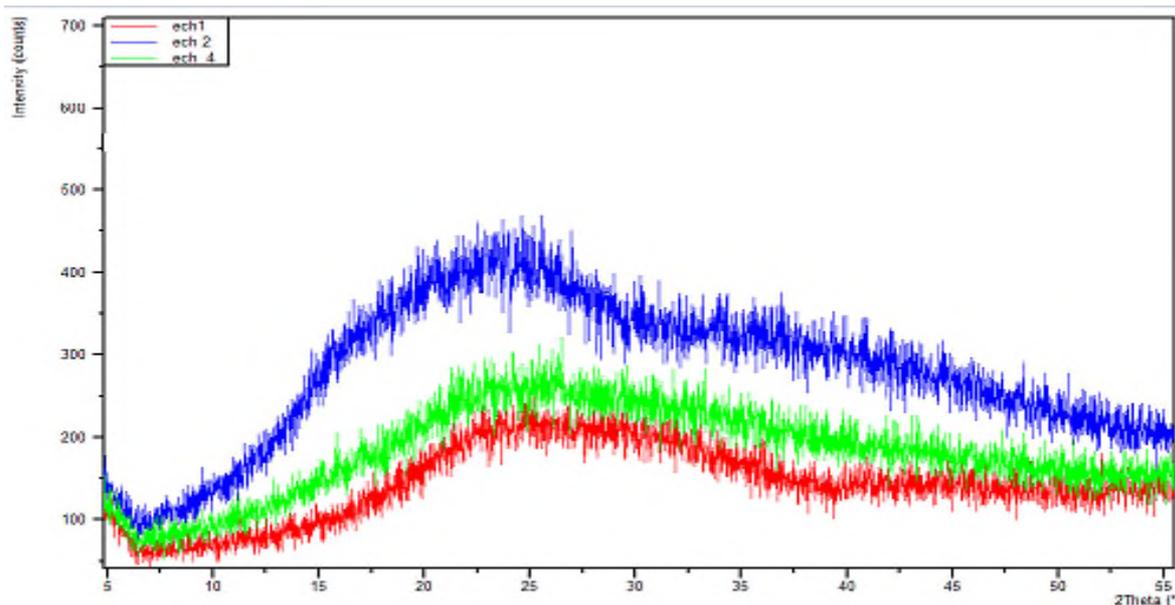


Figure 29 : Graphes diffraction aux rayons X des extraits de *R. damacena*.

Ech 1 : Extrait acétonique / Ech2 : Filtrat *R. damacena* (extrait éthanolique)/ Ech 4 : Résidu *R.damacena* (extrait éthanolique acidifié)

III-2- Discussion :

La grande difficulté de l'étude des anthocyanes réside dans leur fragilité structurale qui conditionne la variabilité des propriétés et il est très difficile d'extraire des anthocyanes sans perturber leurs structures (hydrolyse, température, oxygène, interactions...).

Deux "potentiels" caractérisent les anthocyanes : le potentiel photo-protecteur et le potentiel antioxydant. Si ce dernier est dépendant de certains sites de la molécule, le potentiel photo-protecteur dépend de l'intégralité de la structure (conjugaisons électroniques du noyau et de l'ensemble de ses substituants).

Il ne suffit pas d'extraire les anthocyanes, encore faut-il "protéger" leurs propriétés : explorer l'activité UV-protectrice des anthocyanes nécessite un protocole d'extraction le moins altérant possible. C'est ce que nous avons essayé de réaliser dans ce travail.

Anthocyanes et UV :

Les modifications que nous avons testé sur le protocole d'extraction standard, visaient à éviter le plus possible le recours à la phase aqueuse pendant l'extraction parce qu'elle consomme de l'énergie à l'évaporation et favorise l'hydrolyse et les oxydations. Les résultats obtenus (figure 26) montrent que ce protocole, pas du tout optimisé, s'est montré quand même efficace et cela avec les UV les plus énergétiques (UV C):

- la levure *C. albicans*, qui s'est montrée très sensible aux radiations UV (culture stérile à 254nm/90s) donne une bonne croissance, dans les mêmes conditions, en présence des anthocyanes ;

- il en est de même pour les bactéries, qui paraissent plus résistantes aux UV, et dont les croissances sont toujours plus abondantes en présence d'anthocyanes.

La spectrophotométrie fait ressortir deux détails très importants :

- d'une part les anthocyanes telles qu'extraites par le protocole modifié ne présente aucune absorbance dans le spectre visible, chose anormale pour des anthocyanes (**Harbone, 1967**) ;

- d'autre part le fractionnement des extraits par le protocole modifié a donné des spectres UV caractéristiques de molécules pures, ou du moins contenant une anthocyane comme composant majeur.

Ainsi, après extraction par le protocole modifié, les molécules d'anthocyanes gardent leur photo-activité et filtrent la lumière par absorption du rayonnement UV.

Anthocyanes et radicaux libres :

Le peroxyde d'hydrogène est générateur de radicaux libres (**MARFAK, 2003**). Le test effectué n'est pas une référence mais il a le mérite de mettre en évidence la capacité des anthocyanes testées à neutraliser la formation de radicaux libres connus pour être très toxiques (action désinfectante de l'eau oxygénée). Ceci tend à prouver que le protocole d'extraction modifié préserve pour les anthocyanes, en plus de leur effet photo-protecteur, leur potentiel antioxydant.

Limites du protocole standard d'extraction :

Le protocole standard d'extraction des anthocyanes (extraction hydro-alcoolique acidifiée) (**Robards et Antolovich, 1997**) présente l'inconvénient :

- d'une part de ne pas extraire que les anthocyanes (polyphénols, Vit C, sucres, minéraux...). Le dosage des anthocyanes montre que ces derniers représentent seulement une fraction (3 à 22,60%) de l'extrait total obtenu ;

- d'autre part de surestimer la concentration des anthocyanes extraits. Le dosage des extraits standards, non pas directement, mais après séchage et reprise en solution alcoolique et hydro-alcoolique donnent des teneurs de loin inférieures à celles obtenues par dosage directe ;

-de plus l'administration aux microorganismes des extraits d'anthocyanes nécessite des formes neutres non-toxiques (pas d'acides et pas de solvants organiques), ce qui nécessite le séchage de l'extrait standard et donc des phénomènes d'hydrolyse inévitables. (**Kong, 2003**)

La forme d'administration des anthocyanes

Extraire les anthocyanes sans trop les altérer ne suffit pas. Il faut, de plus, trouver la forme d'administration la plus adaptée à l'expression de leur activité.

Les conditions matérielles sous lesquelles sont présentés les anthocyanes aux microorganismes, influent sans le moindre doute sur leur "biodisponibilité" pour ces cellules. Et vu les caractéristiques physico-chimiques des anthocyanes, ce paramètre nécessite une exploration approfondie. Dans le test effectué on a obtenu la meilleure photo-protection avec des anthocyanes ajoutés en milieu de culture à des cellules en métabolisme actif.

Conclusion

Conclusion

Des germes pathogènes exposés aux UVC montrent une réduction drastique de leur croissance. Ces mêmes germes préalablement ensemencés dans des bouillons anthocyanés font preuve d'un métabolisme presque normale (croissance appréciable).

Les anthocyanes des fleurs testées sont présente sous forme diversifiée. Malgré une parenté chimique évidente, confirmée par spectrophotométrie, toutes n'ont pas le même potentiel. Ainsi, l'aptitude à filtrer le rayonnement UV, d'une manière efficace, ne caractérise pas toutes les anthocyanes même si l'absorption dans ce spectre reste une constante.

La grande réactivité de ces molécules, surtout les interactions anthocyanes-anthocyanes, impose un protocole de purification ou d'extraction séparée pour une meilleure expression du potentiel photo-protecteur. Les tests effectués montrent que le traitement alcalin peut être une bonne piste.

Il est à souligner qu'après ce traitement la capacité des anthocyanes à absorber dans le visible a totalement disparu pour l'essentiel des extraits, mais n'a pas affecté l'absorption dans l'UV.

Il semblerait que l'administration des anthocyanes aux cellules nécessite que ces dernières soient en métabolisme actif, le milieu liquide étant plus efficace qu'une gélose.

L'activité antiseptique des anthocyanes, pourtant réputée, n'a pu être détectée. Tous les microorganismes testés ont très bien toléré les anthocyanes.

Les anthocyanes se caractérisent aussi par un très bon potentiel antioxydant. Ce potentiel n'est pas affecté par le protocole d'extraction suivi. Le test de neutralisation de l'eau oxygéné par les extraits anthocyaniques s'est avéré efficace.

Ce constat confirme que :

- les anthocyanes, du moins certaines anthocyanes, présentent bien un potentiel UV-protecteur ;
- ce potentiel peut être transféré de leur matrice végétale vers d'autres organismes, du moins les microorganismes ;
- des protocoles d'extraction et d'administration adaptés peuvent favoriser ce transfert avec une bonne efficacité.

Enfin le protocole standard d'extraction reste efficace s'il est utilisé à des fins de dosages mais il se montre inadapté pour la récupération des anthocyanes en tant que molécules natives, les phénomènes d'altérations étant inévitables.

De plus l'extractible obtenu par ce protocole est très hétérogène. Nous avons calculé que presque 80% des matières extraites n'étaient pas des anthocyanes.

L'étude poussée des anthocyanes nécessite des techniques fines et un appareillage lourd (HPLC, RMN, GC-MS...) mais leurs perspectives d'application futures sont très prometteuses et justifient de tels investissements:

- exploitation dans les thérapies géniques notamment dans la stabilisation de l'ADN triple hélice utilisé comme vecteur ;
- exploitation comme agents filtrants dans la génération de l'énergie photovoltaïque ;
- consommation comme alicaments et comme suppléments nutraceutiques ;
- substitution aux colorants synthétiques dans l'industrie agroalimentaire ;
- 'bio thermostats' par conversion des UV en chaleur...

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

- ✓ **Antal, D-S., et Garban, G., et Garban, Z., (2003).** The anthocyanins: biologically-active substances of food and pharmaceutic interest. Food Technology. P.106-115.
- ✓ **Anthoni, J., (2007).** Synthèse enzymatique, modélisation moléculaire et caractérisation d'oligomère de flavonoïdes. institut nationale polytechnique de LORRAINE. P.9-10
- ✓ **Akroum, S., (2011).** Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Biologie Animale, Université Mentouri de Constantine. p.6-19

B

- ✓ **Barlier-Salsi, A., Salsi, S., Klingler A., (1998).** Lampes à rayonnement ultraviolet, Quantification des risques associés à leur utilisation. Centre de recherche de l'INRS, Nancy. P.49-56
- ✓ **Ben Amor, B., (2008).** Maitrise l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée DIC.Th. Doc. : Génie des Procédés Industriels. Université de la Rochelle.
- ✓ **Ben Messaoud, A., (2009).** Etude expérimentale et modélisation d'un procédé de désinfection par rayonnement UV. Ecole nationale d'ingénieur de Tunis. P.13-20
- ✓ **Berset, C., (2006).** Antioxydant phénolique-structure propriété et source végétale. In : polyphenols en agroalimentaire. ED paris. P. 265-290.
- ✓ **Brouillard, R., Chassaing, S., Isorez, G., Kueny-Stotz, M., et Figueiredo, P., (2010).** The visible flavonoids or anthocynins : From Research to Application. In « Celestinon S-B. ». Recent advances polyphenols research. Chap I : 18 p.

C

- ✓ **Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal C. A., (2009).** Chemical studies of anthocyanins, *Food Chemistry*.113: 859–871
- ✓ **Castañeda-Ovando, A., Sedo, O., Havel, J., Pacheco, L., Galán-Vidal, C. A., and Contreras López, E., (2012).** Identification of Anthocyanins in Red Grape, Plum and Capulin by MALDI-ToF M. 56(4) : 378-383
- ✓ **Chebil, L., (2006).** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. *Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE*. p.9-10
- ✓ **Cisse, M., Vaillant, F., Acosta, O., Dhuique-Mayer, C., et Dornier, M., (2009).** Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 6285–6291.
- ✓ **Claus, G. W., (1989).** Effect of ultraviolet radiation on DNA, cell viability, and mutation frequency. Exercise 39 in *Understanding Microbes: A Laboratory Textbook for Microbiology*. New York: W. H. Freeman and Co., pp. 333–346.
- ✓ **Cottaz, A., Oulahal, N., et Sebti, I., Interreg III 2006-2008.** Effet des ultra-violets sur les microorganismes de contamination de la tomate. Université Claude Bernard Lyon 1, Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire.

D

- ✓ **Deluc, L., (2004).** Identification et caractérisation fonctionnelle de deux gènes régulateurs du métabolisme des composés phénoliques de la baie de raisin. Sciences des Aliments, Université Bordeaux I. p.11
- ✓ **Douki, T., Leccia, M-T., Béani, J-C., Mouret, S., Cadet J., Favier A., (2007).** Effets néfastes du rayonnement UVA solaire De nouveaux indices dans l'ADN. 23(2). P.124-126

E

- ✓ **Emile, N. E., (2010).** Identification des anthocyanes de deux espèces de bleuets sauvages de QUÉBEC "Vaccinium angustifolium" et "Vaccinium myrtilloïdes" et évaluation de leur potentiel antioxydant. Université Laval.
- ✓ **Féret, M. J. B., (2009).** Apport de la modélisation pour l'estimation de la teneur en pigments foliaires par télédétection. UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE, Paris. p.11-12

F

- ✓ **Frank, T., Netzel, M., Strass, G., Bitsch, R., Bitsch I., (2003).** Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, ISSN 0008-4212
CODEN CJPPA3.

G

- ✓ **Gervaise, M. Y., (2004).** Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. Méthodes globales (type spectrophotomètre) contre les méthodes fines (type HPLC) : pour quelles applications les choisir ? progrès analytiques récents. Paris. P. 10
- ✓ **Ghosh, D., et Konishi, T., (2007).** Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16 (2): 200-208.

- ✓ **Gomez, C., (2009).** Etude des mecanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisin caracterisation fonctionnelle des genes impliqués dans ces mecanismes. Th.doc.: Sciences des Procédés – Sciences des Aliments. Centre international d'etudes superieures en sciences agronomiques montpellier supagro : 194 p.
- ✓ **Gould, K., Davies, K., Winefield, C., (2009).** Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications. Springer. 978-0-387-77334-6.
- ✓ **Gradinaru, G., Biliaderis, C.G., Kallithraka, S., Kefalas, P., Garcia-Viguera, C., (2003).** Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition, *Food Chemistry*. 83: 423–436

H

- ✓ **Harbone, J. B., (1967).** Comparative biochimtry of the flavonoides. Academic press. New York, 1-130 p.
- ✓ **Henri, M. J., (1969).** Recherches sur les onthocyones foliaires de trois arbres tropicaux (*Mangifera indica* L., *Theobroma cacao* L., *Lophira a/ata* Banks. ex Gaertn. f.).
- ✓ **Hollman, P. C. H., (2001).** Evidence for health benefits of plant phenols : local or systemic effects. *Journal of the science of food and agriculture.*, 81 :842-852.
- ✓ **Hopkins, W., (2003).** Physiologie végétale. De Boek and Larcier s.a. Bruxelle. 2-7445-0089-5

I

- ✓ **Isorez, G., (2007).** Contribution à la chimie des flavonoïdes : Accès à des analogues de pigments du vin rouges. Th.doc.: Chimie Organique. Université Louis Pasteur – Strasbourg I. 218 p.

K

- ✓ **Kong, J. M., Chia, L. S., Goha, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R., (2003).** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. p.923–933

M

- ✓ **Macheix, J-J., Fleuruer, A., JAY-Allemand, C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolite secondaire économique. CH- 1015 Lausanne. 2-88074-625-6
- ✓ **Marfak A., (2003).** Radiolyse gamma des flavonoides . Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation de dépsides. Université de LIMOGES. p.30
- ✓ **Mompon, B., Lemaire, P., Mengal, M., et Surbled, M., (1996).** Extraction des polyphénols : du laboratoire a la production industrielle. In « Vercauteren J. ». Ed. INRA, Paris. 2-7380-0796-1.
- ✓ **Muanda, F. N., (2010).** Identification de polyphénols, evaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Chimie organique, Ecole doctorale SESAMES. P.71-77

N

- ✓ **Nijveldt R.J., Nood E.V., Van Horn D.E., Boelens P.G., Klaske. (2001).** A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Journal of Clinical Nutrition*. 47: 418-425.

O

- ✓ **Oliver Neill, S., (2002).** THE FUNCTIONAL ROLE OF ANTHOCYANINS IN LEAVES, Anthocyanic and acyanic leaves of *Elatostema rugosum* (Urticaceae) photographed in the Waitakere Ranges, New Zealand.

P

- ✓ **Palé E., Kouda-Bonafos M., Nacro M., (2003).** Caractérisation et mesure des activités anti-radicalaires d'anthocyanes de plantes du Burkina Faso. p.973–980.

R

- ✓ **Ranarivelo, Y., (2011).** Les Grandes Familles Chimiques de Produits Naturels. Faculté des Sciences Université d'Antananarivo Madagascar (<http://www.refer.mg/cours/yr/>).
- ✓ **Rein M., (2005).** Copigmentation reaction and color stability of berry anthocyanins. Food Chemistry Division. 0355-1180: 1-38.
- ✓ **Ribéreau-Gayon, P., et Stonestreet, E., (1965).** Dosage des anthocyanes dans le vin rouge. Bull.Soc.Chim., 9, 2649-2652
- ✓ **Robards, K., et Antolovich, M., (1997).** Analytical Chemistry of fruit bioflavonoides. *Analyst.* 122(2): 11-34.

S

- ✓ **S. Barnes, J., (2010).** Analytical characterization of anthocyanins from natural products by reverse-phase liquid chromatography-photodiode array-electrospray ionization-ion trap-time of flight mass spectrometry. University of Texas. p.86

T

- ✓ **Tabart, J., (2011).** Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire et étude de ses effets sur la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. Académie Universitaire Wallonie-Europe. P. 36

- ✓ **Takahama, U., et Oniki, T., (1998).** 3,4-Dihydroxy-phénylalanine is oxidized by phenoxyl radicals of hydroxycinnamic acid esters in leaves of *vicia faba* L. *journal of plant research*, 3, 487-494.
- ✓ **Thao Xuan, N., (2007).** Understanding the Principles and Procedures to Retain Green and Red Pigments in Thermally Processed Peels-On Pears (*Pyrus communis*L.), Oregon State University. P.18

V

- ✓ **Valls, J., Millán, S., Martí, M-P., Borràs, E., et Arola, L., (2009).** Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 1216: 7143–7172.
- ✓ **Vernauteren, J., Cheze, C., Triaud, J., (1996).** Polyphenols 96, 18th International Conference on polyphénols. INRA, Paris. 2-7380-0796-1. p. 37

W

- ✓ **Wisseman H., (1999).** The bioavailability of non–nutrient plant factors : dietary flavonoids and phyto-oestrogens. *Proceeding and Nutrition Society*. 58 :139-146.

Annexes

Annexe A

Polyphénols et anthocyanes :

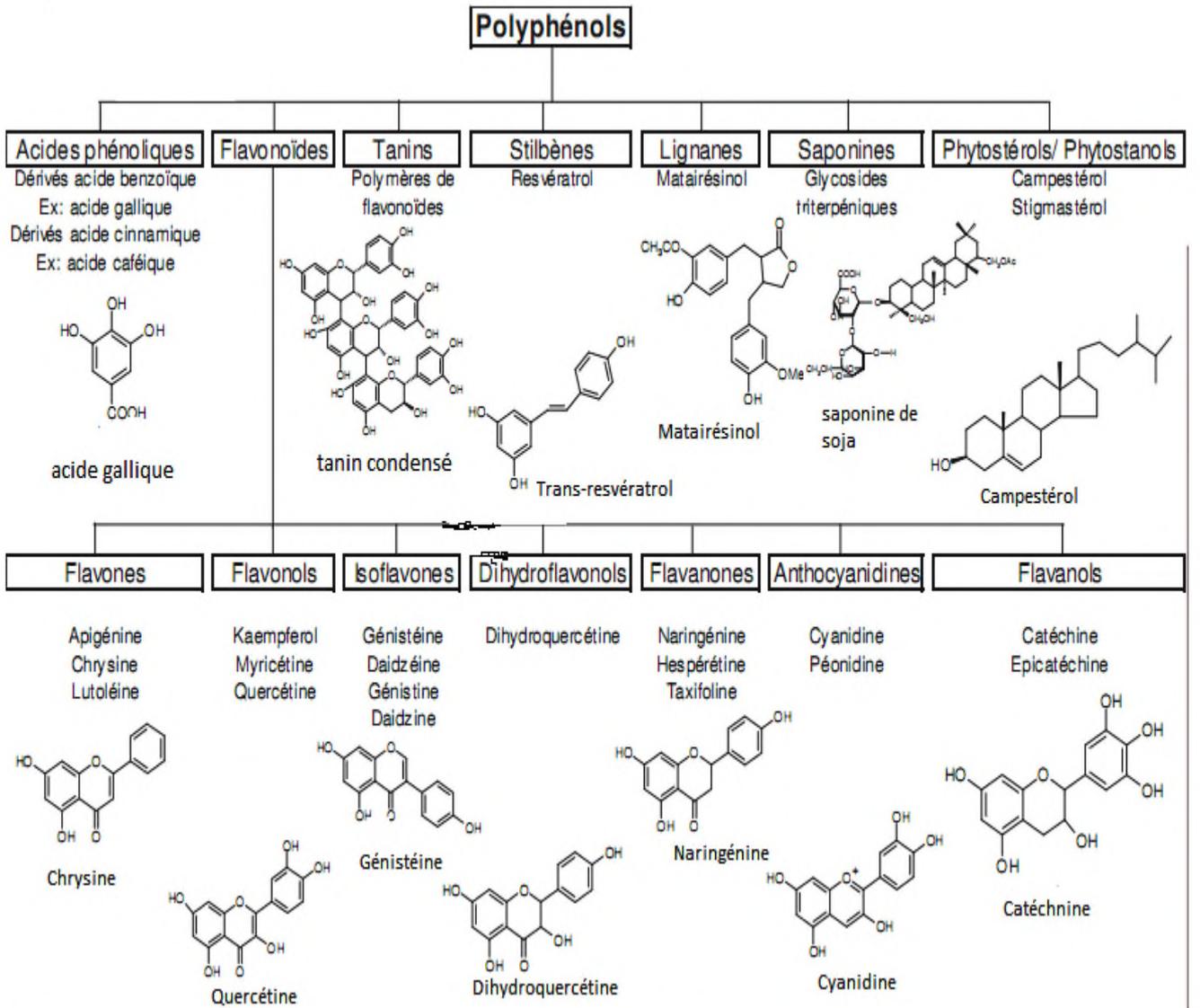


Figure 1 : les différentes classes des composés phénoliques. (Gervaise, 2004)

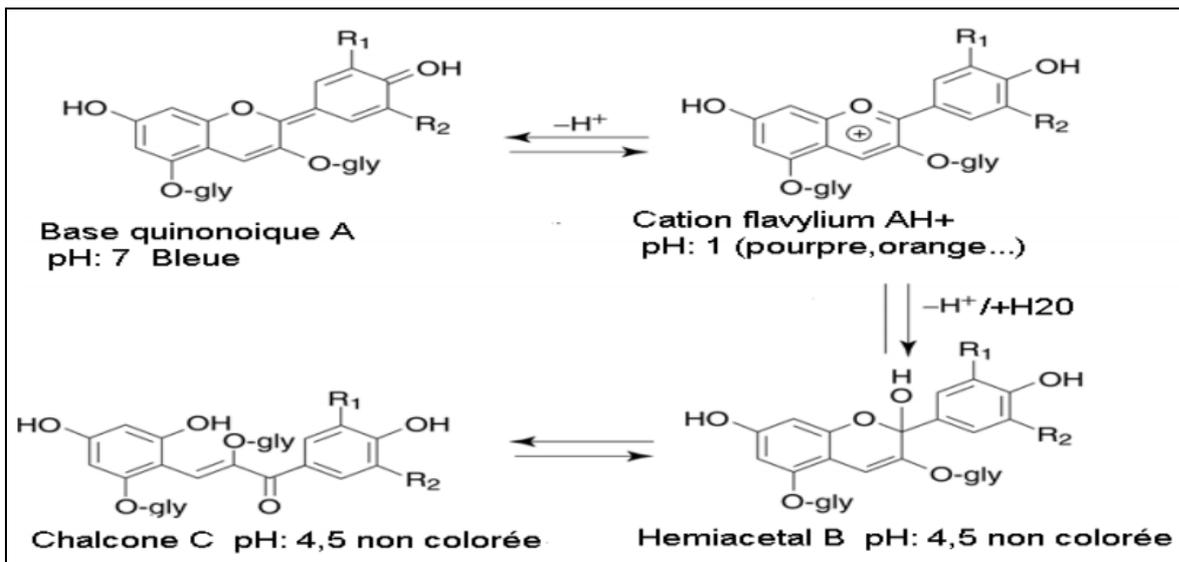


Figure 2 : Transformations structurales des anthocyanes en solution aqueuse acide (Ph 1 à 7) (**BEN AMOR, 2008**)

En milieu acide fort, les anthocyanes sont stables et prédominent sous leur forme cationique AH⁺ colorée en rouge, violet, orange ou pourpre. Cette forme est caractérisée par deux bandes d'absorption spécifique pour chaque anthocyane, une dans l'ultraviolet (280-300nm) et une intense dans le domaine du visible (510-530nm).

En milieu acide faible (pH 5 à 7) le cation perd très rapidement un proton ce qui conduit à la formation d'une base quinononique A faiblement colorée en bleu.

Les solutions d'anthocyanes en milieu légèrement acide perdent assez rapidement leur coloration par hydratation de la molécule (sur la position 2 du cation). L'hydratation conduit à un hémiacétal incolore B en équilibre par tautomérie cycle – chaîne avec le chalcone C associé. Si le pH augmente, le chalcone est ionisée, la structure anthocyanique est alors détruite. Les bases A et l'hémiacétal B sont respectivement les produits cinétiques et thermodynamiques des transformations structurales du cation flavylum. (**BEN AMOR, 2008 ; EMILE, 2010**)

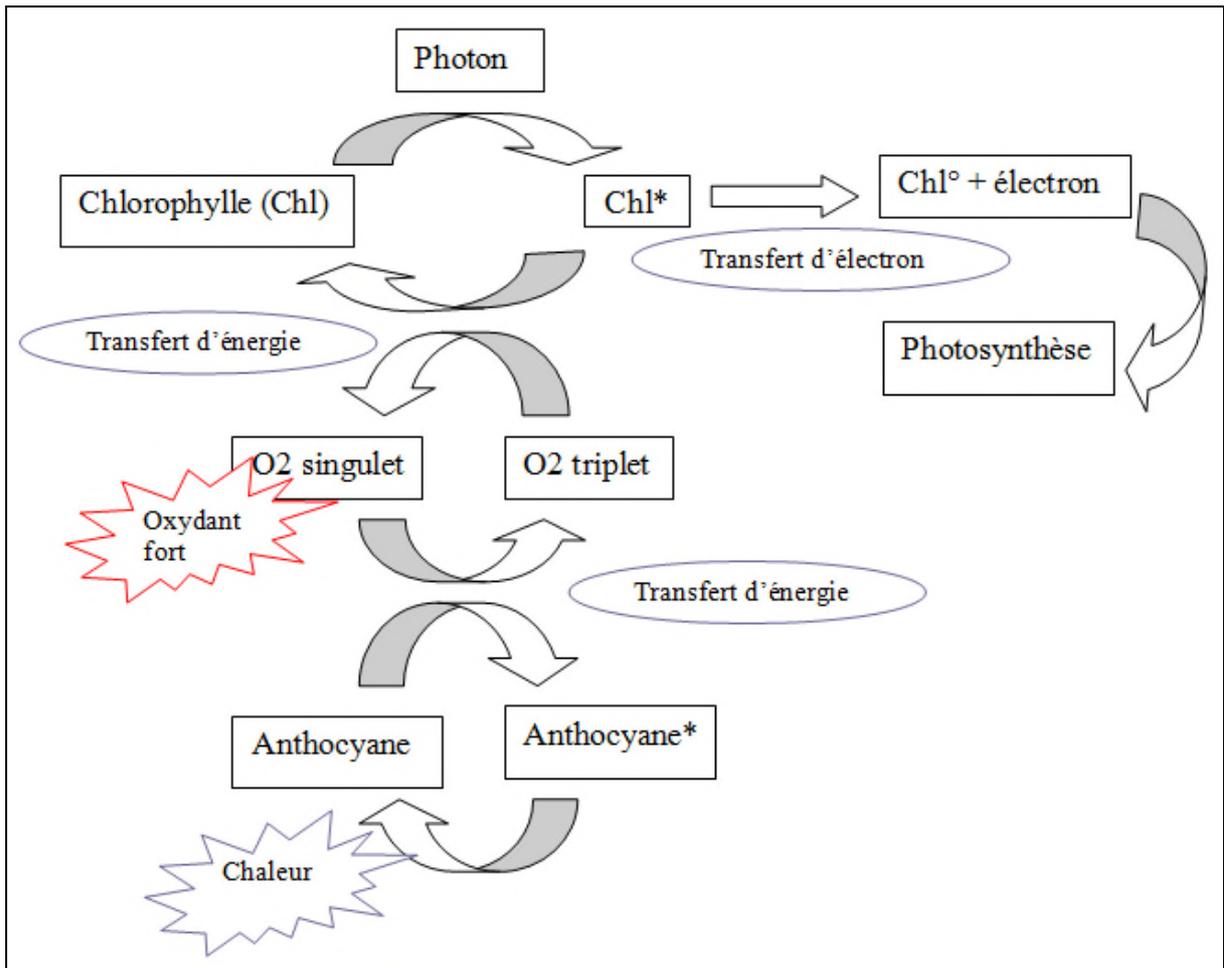


Figure 3 : Le pouvoir antioxydant des anthocyanes. (Takahama, et Oniki, 1998).

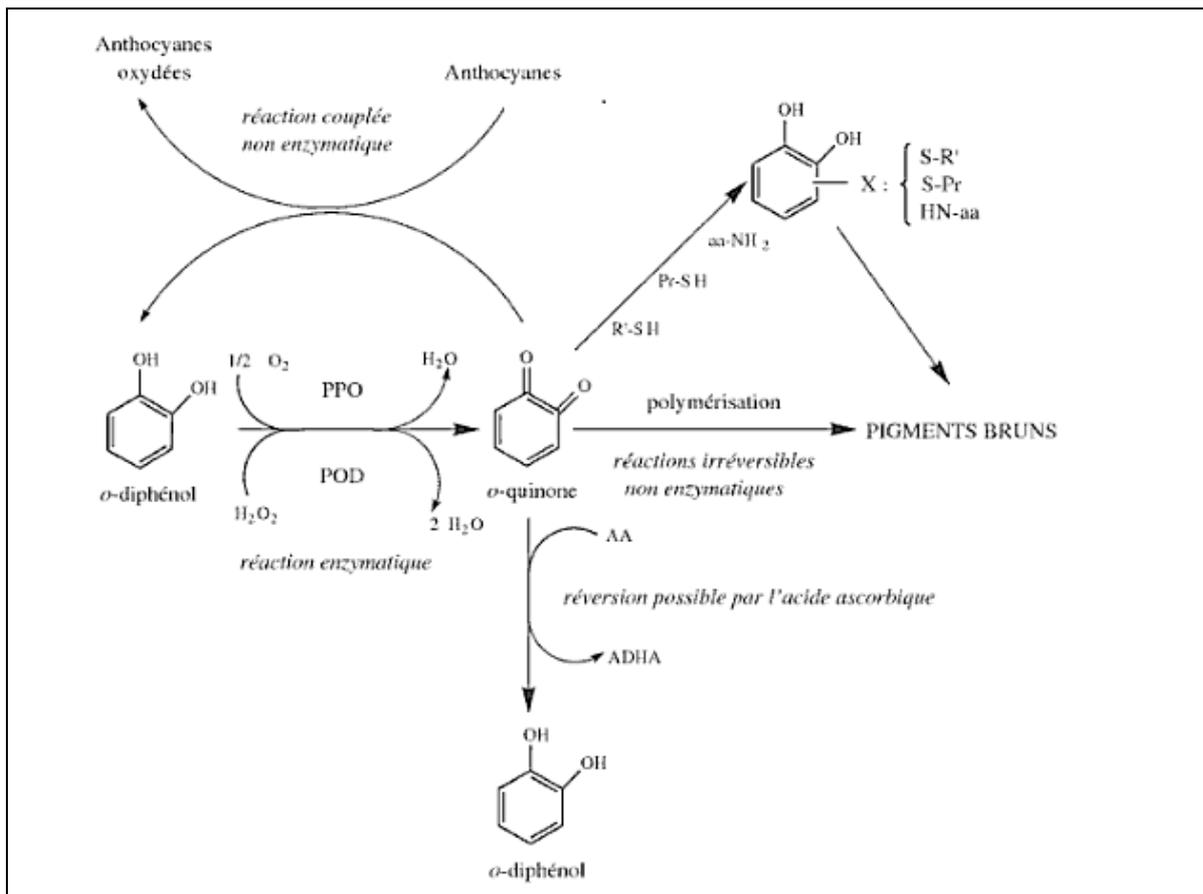


Figure 4: Les principales étapes du brunissement depuis l'oxydation enzymatique initiale des composés phénoliques jusqu'à la formation des pigments bruns. PPO : polyphénol oxydases ; POD : peroxydases ; aa-NH₂ : acides aminés ; Pr-SH : protéines ; R'-SH : thiols (Macheix *et al.*, 2005).

Equipement :

- pH mètre (marque : HANNA 213) ;
- spectrophotomètre Visible (UNICO[®] 1100) ;
- spectrophotomètre UV/visible (Analytik/jena, specord 50) ; (SpectroScan 50V)
- lampe UV (VILBER LOURMAT) : Le générateur UV est équipé d'un filtre sélectif UVA-UVB/UVC (365 /254 nm). Le fonctionnement est totalement manuel ;
- rotavapeur (Heidolph) ;
- centrifugeuse (Hettich universal 2s) ;
- étuve (Venticell et BINDER) ;
- balances (RADWAG et BRAINWEIGHT[™] B 1500 D) ;

- broyeur (INKA[®] basic) ;
- microscope optique (ZEISS, West Germany);

Milieu de croissance : gélose nutritive (Mueller-Hinton et Sabouraud) et bouillon (Mueller-Hinton).

Annexe B

Spectres UV-visible des anthocyanes :

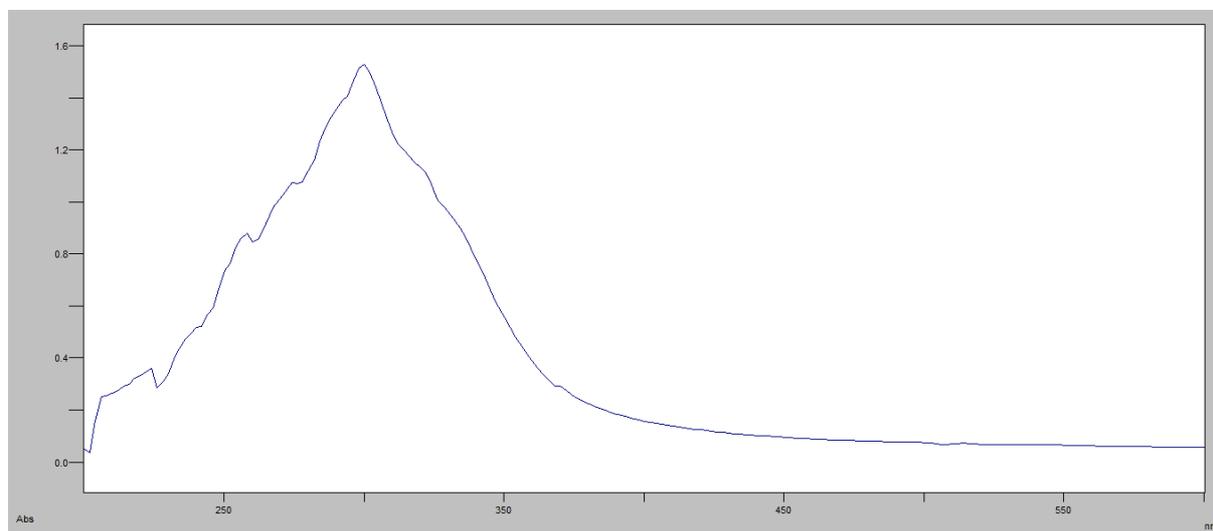


Figure 5 : Spectre UV-visible de l'extrait filtrat *R. damacena* (filtrat)

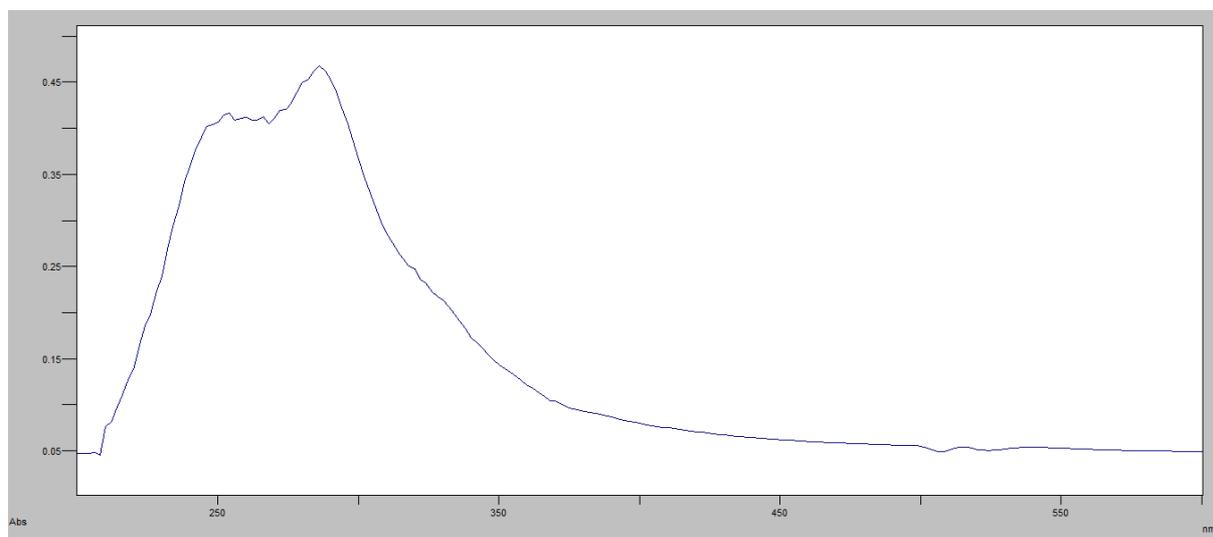


Figure 6 : Spectre UV-visible de l'extrait résidu *R. damacena* (résidu)

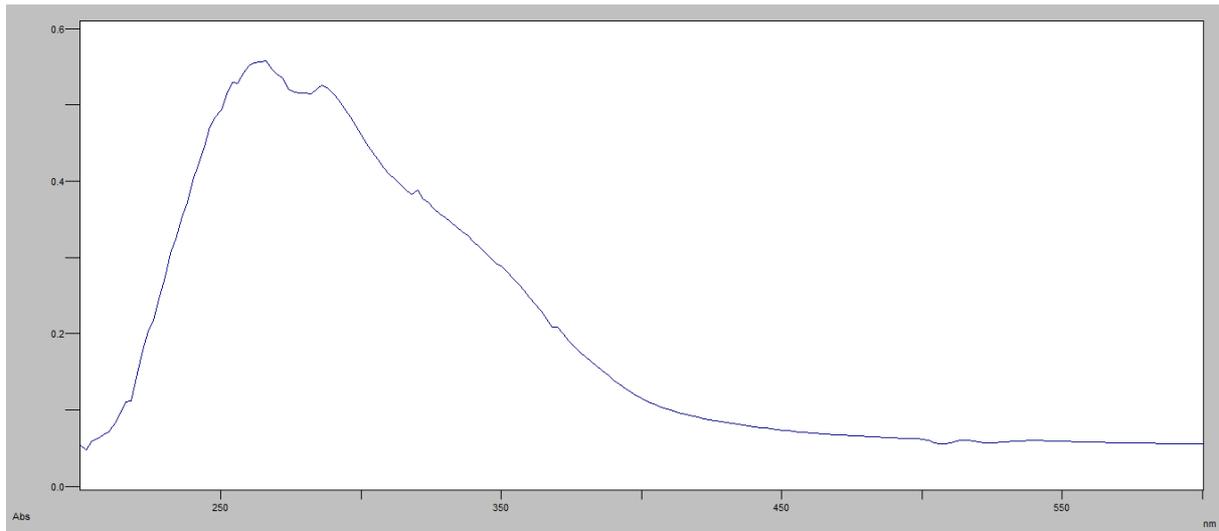


Figure 7 : Spectre UV-visible de l'extrait filtrat *H. sabdariffa* (filtrat)

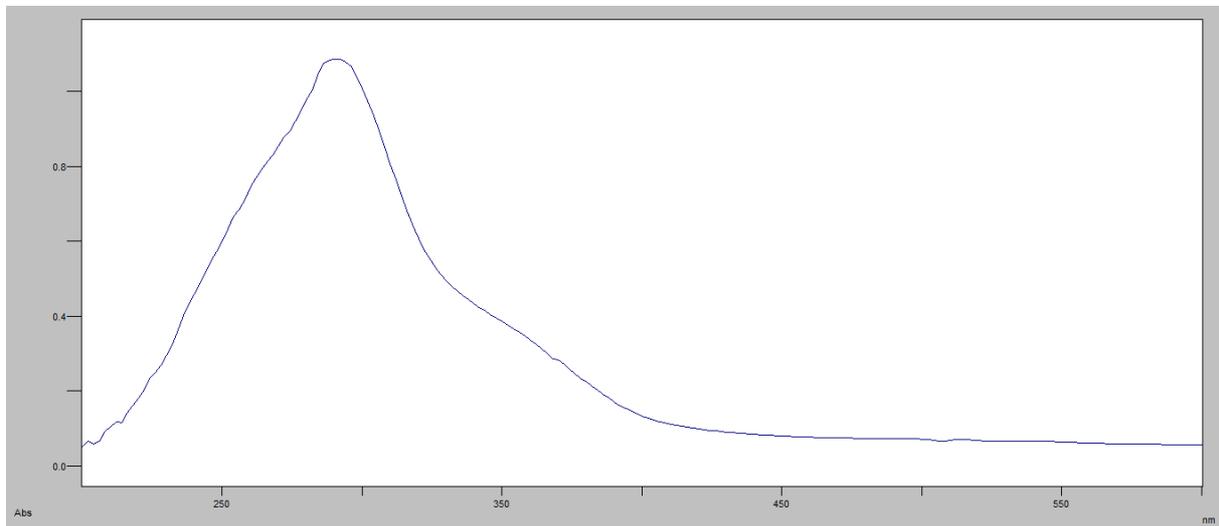


Figure 8 : Spectre UV-visible de l'extrait filtrat *H. sabdariffa* (résidu)

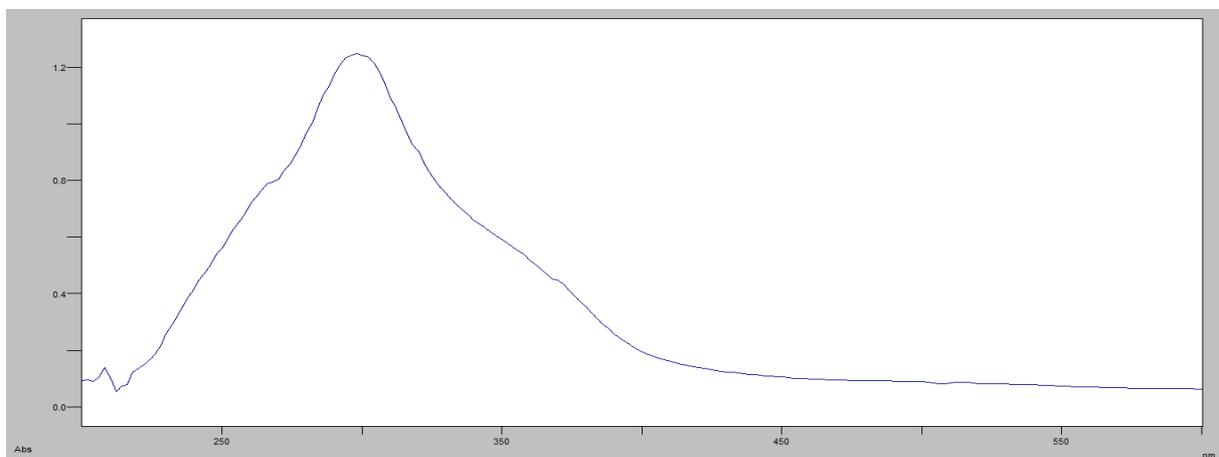


Figure 9 : Spectre UV-visible de l'extrait résidu *H. sabdariffa* (résidu)

Annexe C

Exposition des microorganismes aux UV :



Figure 10 : Croissance des souches en présence de l'extrait résidu *H. sabdariffa* (eau physiologique) après exposition aux UV (365 nm/90 s).

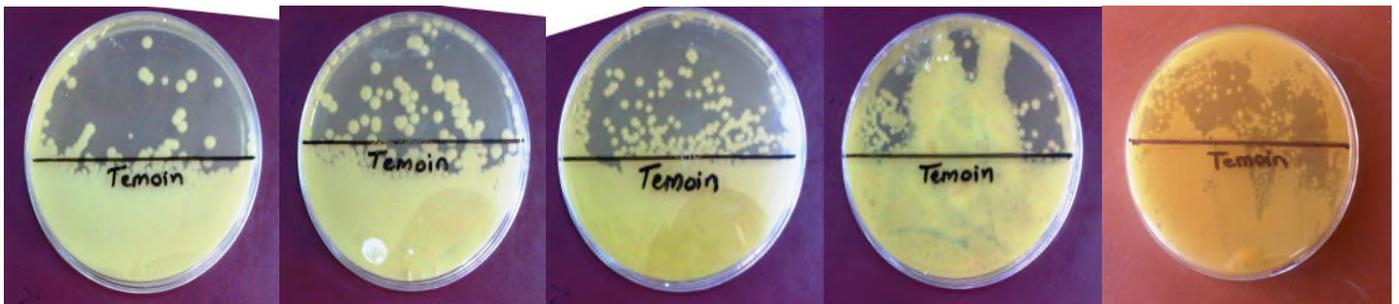


Figure 11 : Croissance des souches en présence de l'extrait résidu *R. damacena* (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/60 s).

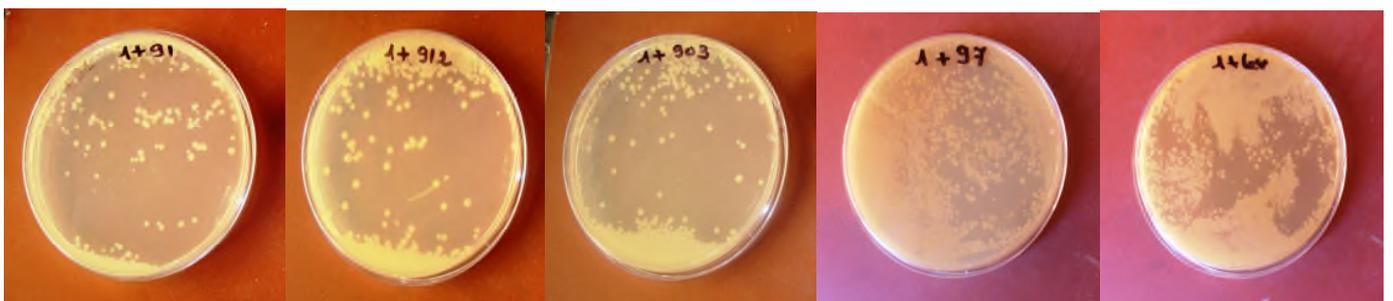


Figure 12 : Croissance des souches en présence de l'extrait résidu *H. sabdariffa* (filtrat) (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/90 s).

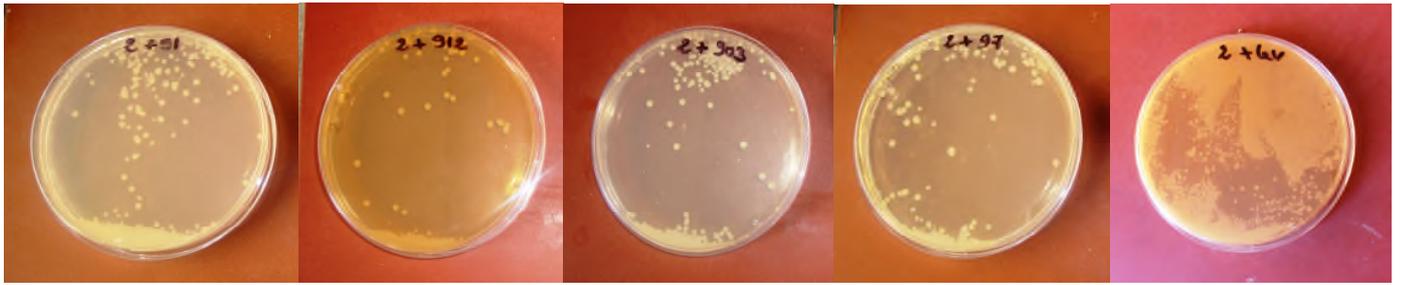


Figure 13 : Croissance des souches en présence de l'extrait résidu *R. damacena* (résidu) (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/90 s).

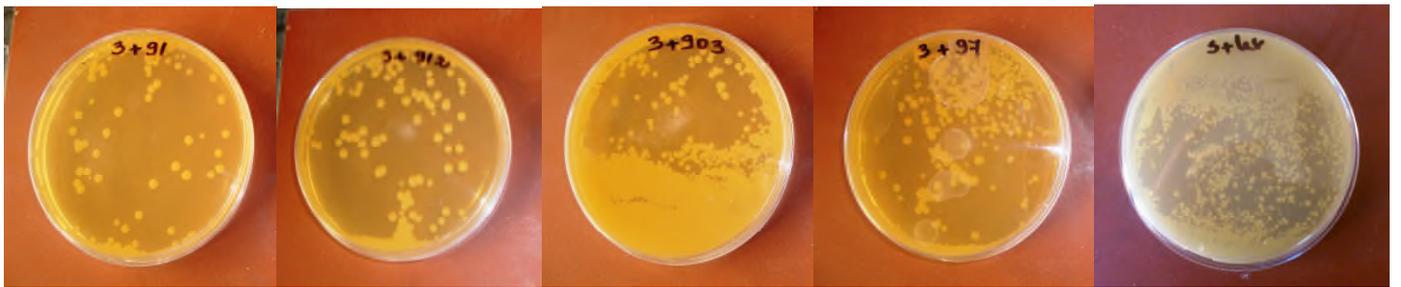


Figure 14 : Croissance des souches en présence de l'extrait filtrat *H. sabdariffa* (filtrat) (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/90 s).



Figure 15 : Croissance des souches en présence de l'extrait filtrat *H. sabdariffa* (résidu) (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/90 s).

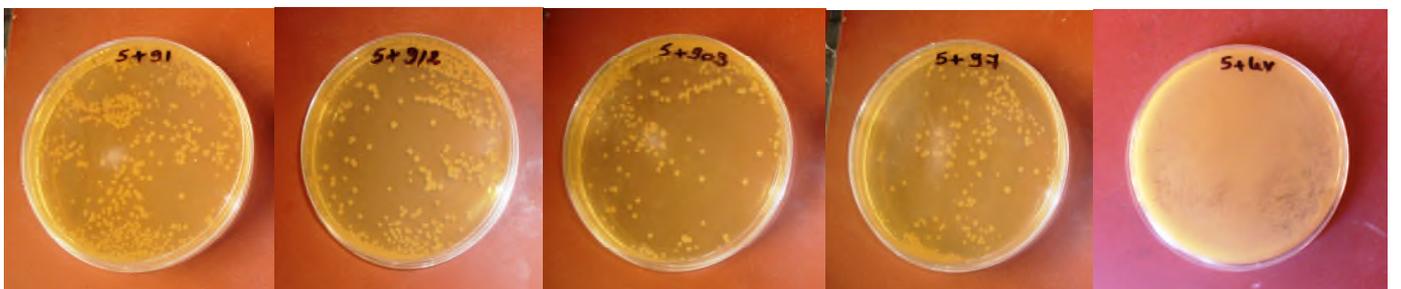


Figure 16 : Croissance des souches en présence de l'extrait filtrat *R. damacena* (résidu) (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/90 s).

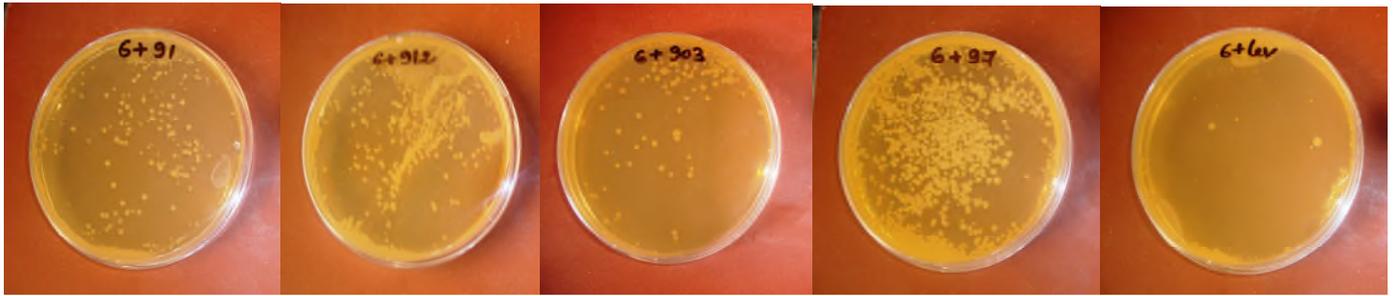


Figure 17 : Croissance des souches en présence de l'extrait filtrat *R. damacena* (filtrat) (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/90 s).



Figure 18 : Croissance des souches en présence de l'extrait résidu *H. sabdariffa* (résidu) (bouillon nutritif) après exposition aux UV (254 nm/90 s).

Résumé

La prospection de l'activité UV-protectrice des anthocyanes a été effectuée sur les extraits de deux fleurs : *Rosa damacena* et *Hibiscus sabdariffa*. Les extraits ont été testés sur quatre souches de bactéries et une souche de levure.

L'extraction des anthocyanes à partir de leur matrice nécessite un protocole adapté, pour garder leur rapport structure/propriétés fonctionnel. L'activité antiseptique des anthocyanes extraites a été testée préalablement aux tests de leur activité UV-protectrice. Cette dernière est appréciée par exposition des microorganismes aux UV dans des conditions de longueurs d'ondes et de durées d'exposition, sub-létales, déterminées expérimentalement. Les résultats confirment le rôle UV-protecteur des anthocyanes, leurs propriétés antioxydantes et des effets réduits du protocole utilisé sur leur activité.

Mots clés : anthocyanes, activité anti-UV, extraction, antioxydants.

Abstract

Prospecting for UV-protective activity of anthocyanins was performed on extracts of two flowers, *Rosa damacena* and *Hibiscus sabdariffa*. The extracts were tested on four strains of bacteria and yeast strain.

The extraction of anthocyanins from their matrix requires a suitable protocol keeping their structure / functional properties. The antiseptic activity of anthocyanins extracts was evaluated before testing their UV-protective power. This was appreciated by UV exposure of microorganisms in terms of wavelengths and sub-lethal exposure times. The results confirm the UV-protective role of anthocyanins and their antioxidant properties.

Keywords: anthocyanins, anti-UV activity, extraction, antioxidants.