

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abderrahmane Mira-BEJAIA
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de biologie physico-chimique
Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Ethnobotanique

Mémoire

Présenté par: MEZAHM Tassadit

En vue de l'obtention d'un diplôme de Magister

Filière: Biologie

Option: Ingénierie biochimique et biotechnologique

Thème:

*L'étude de l'activité antioxydants et antityrosinase
par les extraits de plantes*

Soutenu le 11 Mars 2015

Membre de jury :

Présidente : M^{me} BENABDESSELAM Fadila Pr, Université de Béjaïa.

Examinatrice : M^{me} BEDJOU Fatiha Pr, Université de Béjaïa.

Examineur : Mr OUCHEMOUKH Salim M.C.A, Université de Béjaïa.

Promotrice : M^{me} KHETTAL Bachra M.C.A, Université de Béjaïa.

Année universitaire 2014/2015

Remerciements

Je remercie en premier lieu, le bon Dieu, tout puissant, pour m'avoir donné la santé, la force et le courage nécessaires pour réaliser ce modeste travail.

Le présent travail fait partie d'axes de recherches respectifs du Dr KHETTAL Bachra de l'université A/Mira Béjaia.

Ma profonde gratitude va à ma promotrice Dr KHETTAL B., pour l'honneur qu'elle m'a fait de m'encadrer, pour ses précieux conseils, ses orientations, sa disponibilité, son encouragement et la confiance qu'elle a mis à moi, dont je garderai ses qualités profondément humaines comme exemple.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Pr BENABDESSELAM F. qui m'a honoré en acceptant d'être présidente du jury de soutenance.

Mes gratitudes se dirigent également vers les examinateurs Pr Bedjou F. et Dr OUCHEMOUKH S qui ont bien voulu donné de leur temps pour examiner ce travail.

Je ne manque surtout pas de remercier chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail, M^{me} Ben Abedrahim, M^{me} Amir, M^{me} Kadji, M^{me} Saiche, M^{elle} Benobeidallah, M^{elle} Bourbaba.

Mes vifs remerciements vont également aux ingénieurs et techniciens de laboratoire pédagogique d'enzymologie pour leur aide lors de la réalisation de ce travail.

Que toutes les personnes qui, un jour ou l'autre, m'ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de mon cursus universitaire, en soient ici vivement remercié.

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ceux que j'ai tant aimé avec beaucoup d'affection et je suis très fière de les avoir et tous les mots du monde ne peuvent exprimer l'amour et le respect que je leur porte, mes très chers parents, que Dieu me les protège, et mes grands-parents ; L'hadj Mohand et Fatima.

A la mémoire de ma grand-mère Fatma, qu'elle repose en paix.

A ma unique sœur : Kahina.

A mes frères : Djaafar, Idris, Saadi, Abdelkader.

A toute ma famille petite et grande.

A tous mes chers amis depuis mon enfance.

A toute ma promo PG et les Master 2 2014 du département Biochimie.

Aux techniciens et ingénieurs du laboratoire : Saïda, Habiba, Samia, Taous, Fouzia et Mr Bouchnoi.

A mes collègues de travail.

A Tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation de ce travail ; Djalal, Kahina, Naziha, Safia, Zakia.

A tous les résidents d'Aamriw.

MEZAHM Tassadit

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Tyrosinase

I.1) Historique.....3
I.2) Nomenclature et classification3
I.3) Distribution et localisation subcellulaire.....4
I.4) Rôles de la tyrosinase.....4
I.5) Désordres associés à l'activité de la tyrosinase.....6
I.6) Structure moléculaire et site actif de la tyrosinase.....7
I.7) Activités et mécanisme réactionnelle.....9
I.8) spécificité, affinité et Propriétés cinétiques des Tyrosinases.....10
I.9) Effecteurs de la tyrosinase.....16

ChapitreII : Les radicaux libres (RL) et les antioxydants

II.1) Les radicaux libre.....24
 II .1.1) Définition.....24
 II .1.2) Production des radicaux libres.....24
 II .1.3) Le stress oxydant.....25
 II. 1.4) Conséquences du stress oxydant.....25
II.2) Les Antioxydants.....26
 II.2.1) Antioxydants endogènes.....27
 II.2.2) Antioxydants exogènes.....28

Chapitre III :Présentation des plantes étudiées

III.1) Le genre <i>Citrus</i>	30
III.1.1) Définition et classification.....	30
III.1.2) Description botanique.....	30
III.1.3) Propriétés thérapeutiques des <i>Citrus</i>	32
III.2) Le genre <i>Pistacia</i>	32
III.2.1) Nomenclature et classification.....	32
III.2.2) Description botanique.....	33
III.2.3) Propriétés thérapeutiques.....	33
III.3) Le genre <i>Ceratonia</i>	34
III.3.1) Définition et classification.....	34
III.3.2) Description botanique du caroubier.....	35
III.3.3) Propriétés thérapeutiques.....	35
III.4) Le genre <i>Crataegus</i>	36
III.4.1) Nomenclature et classification.....	36
III.4.2) La description botanique.....	36
III.4.3) Propriétés thérapeutiques.....	37
III.5) Le genre <i>Olea</i>	37
III.5.1) Nomenclature et Classification.....	37
III.5.2) Description botanique.....	38
III.5.3) Propriétés thérapeutiques.....	38
III.6) Le genre <i>Quercus</i>	39
III.6.1) Nomenclature et Classification botanique.....	39
III.6.2) La description botanique.....	39
III.6.3) Propriétés thérapeutiques.....	40
III.7) Le genre <i>Arbutus</i>	40
III.7.1) Nomenclature et Classification botanique.....	40
III.7.2) La description botanique.....	41

III.7.3) Propriétés thérapeutique.....	41
--	----

Etude expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

I) Matériel et Méthodes.....	43
I.1) Récolte et préparation du matériel végétal.....	43
I.2) Extraction et dosage des composés phénoliques.....	44
I.2.1) Préparation de l'extrait brut éthanolique.....	44
I.2.2) Dosage des composés phénoliques totaux.....	45
I.2.3) Dosage des flavonoïdes.....	46
I.2.4) Dosage des tannins totaux.....	46
I.3) Evaluation des activités des extraits végétaux.....	47
I.3.1) Evaluation de l'activité antioxydant.....	47
I.3.2) Evaluation de l'activité anti-tyrosinase des extraits de plantes.....	49
I.3.3) Traitement statistique.....	51

Chapitre II : Résultats et discussions

II) Résultats et discussions.....	52
II.1) Rendement d'extraction.....	52
II.2) Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins	53
II.2.1) Résultats.....	53
II.2.2) Discussion générale.....	56
II.3) Activité anti-oxydant des extraits éthanoliques	60
II.3.1) Activité anti-radicalaire.....	60
II.3.2) Pouvoir chélateur de fer.....	65
II.3.3) Analyse de corrélations entre les polyphénols et les activités antioxydants.....	66
II.3.4) Discussion générale de l'activité antioxydants.....	68
II.4) Activité antityrosinase	73
II.4.1) Activité tyrosinase du champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>).....	73
II.4.2) Effet des extraits éthanoliques sur l'activité de la tyrosinase.....	74

II.4.3) Efficacité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits éthanolique.....	76
II.4.4) Analyse de Corrélation entre les teneurs en polyphénols et l'activité antityrosinase.....	78
II.4.5) Analyse de corrélation entre les activités antityrosinase et les activités antioxydantes.....	79
Conclusion.....	82

Références bibliographiques

Annexes

Glossaire

Liste des Abréviations

Liste des Abréviations

ABTS : Acide 2,2- azino-bis-3-éthyl-Benzo Thiazoline Sulfonique

AlCl₃ : Chlorure d'Aluminium

APG : Angiosperme Phylogénie Groupe

BHA : Hydroxyanisole Butylé

BHT : Butyl-hydroxytoluène

EAG : Equivalent en acide Gallique

EQ : Equivalent en Querciténe

MS : Matière Sèche

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène

Hcl : Acide Chlorhydrique

IC50 : Concentration Inhibitrice à 50%

Na₂ CO₃ : Carbonate de Sodium

O₂: Oxygène

O₂⁻ : Ion Superoxyde

RL : Radicaux Libres

RLO : Radicaux Libres Oxygénés

TEAC : Trolox Equivalent Antioxydant Capacity

UV : Ultraviolet

V_{max} : Vitesse maximale

K_m : Constante de Michaelis

TBHQ : Tert-butyldroquinone

rpm : Rotation par minute

Liste des Figures

Figure 01: Le schéma réactionnelle de l'activité de la tyrosinase.....	4
Figure 02: Le processus réactionnel de la synthèse de la mélanine.....	5
Figure 03: Présentation de quelques structures de tyrosinase.....	9
Figure 04: Schéma du mécanisme réactionnel de la tyrosinase.....	10
Figure 05: Structure de quelques composés phénoliques substrats de la tyrosinase.....	12
Figure 06: La structure de quelques substances phénolique inhibitrices de tyrosinase.....	19
Figure 07: Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène.....	25
Figure 08: Principales cibles des ERO.....	26
Figure 09: Sites d'action des nutriments antioxydants et des enzymes.....	27
Figure 10: Réaction entre l'acide ascorbique et un radicale (R [•]).....	28
Figure 11: Réaction entre un composé phénolique et un radical (R [•]).....	29
Figure 12: Photographies des différentes espèces de <i>Citrus</i>	31
Figure 13: Photos de quelques espèces de pistachier.....	33
Figure 14: Photo des espèces de <i>Ceratonia</i>	34
Figure 15: photographies de deux espèces d'Aubépine.....	36
Figure 16: Photos des deux espèces d'olivier.....	38
Figure 17: Quelque photo de <i>Quercus</i> algériennes.....	40
Figure 18: La photo des feuilles et des fruits d' <i>Arbutus unedo</i>	41
Figure 19: Localisation géographique des stations de récolte des feuilles de différentes espèces d'arbres.....	43
Figure 20: Mécanisme de l'interaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.....	46
Figure 21: Champignon de paris <i>Agaricus bisporus</i>	50

Figure 22: Représentation graphique des Taux de flavonoïdes (F), tannins (T) et flavonoïdes-tannin (F+T) par rapport aux polyphénols totaux (PT) des feuilles de différentes plantes étudiées.....	56
Figure 23: Les concentrations efficaces à piégé 50% (EC50) du radical DPPH par les extraits de plantes étudiés et les antioxydants de référence.....	62
Figure 24: Effet scavenger vis-à-vis le radical ABTS des extraits éthanolique des feuilles des différentes plantes exprimé en μmol de trolox /g MS.....	64
Figure 25: Pourcentages de chélation du fer par les extraits de feuilles de différentes plantes étudiées.....	65
Figure 26: Relation entre la capacité antioxydant anti- radical DPPH et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B).....	67
Figure 27: Relation entre la capacité antioxydant contre le radical ABTS et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B).....	67
Figure 28: la corrélation entre la chélation de fer et les teneurs en phénols totaux (A) flavonoïdes et les tannins (B).....	68
Figure 29: Variation de l'absorbance à 475 nm en fonction du temps. Activité durant la réaction d'oxydation de L- tyrosine (3 mM) par 100 μl /ml d'extrait brut de champignon de Paris à pH 7 en absence (A) et en présence de 1% DMSO (B).....	73
Figure 30: Représentation des IC50 de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits éthanoliques des feuilles des espèces de <i>Citrus</i> , <i>Pistachier</i> , <i>Ceratonia</i> , et <i>Arbutus</i>	76
Figure 31: Les corrélations entre les composées phénoliques et les IC50 de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits de plantes.....	78
Figure 32: Corrélation entre l'activité inhibitrice de la tyrosinase (AIT) et l'activité antioxydant.....	79
Figure 33: Principaux éléments de l'activité antioxydant et antityrosinase des flavonoïdes...81	

Liste des Tableaux

Tableau I : Caractéristiques cinétiques de quelques tyrosinases végétales, bactériennes et fongiques.....	14
Tableau II: Type d'inhibition et efficacité de quelques polyphénols a activité antityrosinase.....	21
Tableau III: Périodes et coordonnées géographiques des différents stations de récolte du matériel végétale.....	44
Tableau IV: Rendement en extraits bruts éthanoliques de feuilles de quelques plantes.....	52
Tableau V: Teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes des feuilles de quelques genres et espèces de plantes.....	54
Tableau VI: Résultats du pouvoir antioxydant des extraits éthanoliques des feuilles de différentes espèces étudiées.....	61
Tableau VII: Effet des extraits éthanoliques de feuilles de quelques espèces végétale sur l'activité tyrosinase de champignon de Paris.....	75

Introduction

Introduction

La pigmentation est un processus naturelle d'accumulation de pigments comme la mélanine, dans certaines zones des tissus animaux ou végétaux. Chez l'homme, la mélanine est formée lors de la mélanogènèse qui se déroule au niveau de ces cellules de peau, donnant à celle-ci une coloration plus ou moins sombre. Chez les végétaux, ce pigment est produit au cours du processus appelé le brunissement enzymatique. Ce dernier résulte de la transformation de certains composés phénoliques en quinones, les quinones formés se condensent entre eux-mêmes ou avec des composés nucléophiles présents dans leur environnement, comme des amines, des thiols, des phénols ...etc, formant ainsi les mélanines et les benzoquinones dont la couleur va du jaune au bleu noir [CHERIOT, 2007.]

L'étape clé de synthèse des mélanines par mélanogènèse ou par réaction de brunissement enzymatique met en jeu une réaction catalysée par la tyrosinase, une polyphénoloxydase, qui en présence d'oxygène, catalyse l'oxydation de la tyrosine, un mono phénol, en quinone. L'hyperactivité de la tyrosinase conduit chez l'homme à une hyperpigmentation qui cause des problèmes esthétiques, telles que l'éphélide ou taches de rousseur, les lentigos, les taches café-au-lait, mélasma, le chloasma, le naevus [Breime, 2005, Oualid, 2011] dont les conséquences sont essentiellement d'ordres esthétiques. Chez les végétaux, l'activité tyrosinase associée à un brunissement enzymatique indésirable conduit à des conséquences préjudiciables à la qualité organoleptique de l'aliment en entraînant des modifications de l'apparence, de la flaveur et de la qualité nutritionnelle. Par exemple dans le cas des fruits et légumes réfrigérés ou déshydratés, le brunissement est indésirable puisqu'il cause une dégradation du goût et de l'aspect de l'aliment.

Le contrôle de l'activité de cette enzyme est donc important ; chez L'homme, pour le traitement des hyperpigmentations. Alors que chez les végétaux, il est important pour éviter le brunissement enzymatique indésirable des légumes et des fruits. Pour cela, des inhibiteurs de synthèse de cette enzyme, ont été employés dans ce sens, soit comme agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation [Oualid, 20011] ou bien comme agents conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale, [Issa, 2009].

Les inhibiteurs de la tyrosinase sont donc une préoccupation majeure aussi dans les industries alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques. Le fait que les inhibiteurs de

synthèse présentent des effets néfastes aussi bien sur la qualité nutritionnelle des produits alimentaires que sur la santé humaine, des travaux scientifiques se sont tournés vers la recherche de nouvelles molécules inhibitrices de l'activité tyrosinase, n'ayant pas d'effets indésirables et de préférence d'origine naturelle. C'est dans cet axe que s'insère l'objectif de la thématique de recherche développée au sein du laboratoire qui consiste à rechercher à partir des plantes connues comme source importante de molécules bioactives souvent exemptes d'effets secondaires [Akombi, 2005], de nouvelles molécules à effet inhibiteurs de l'activité tyrosinase. Le travail ici présenté est l'aspect préliminaire de cette thématique. Il consiste à tester l'activité antityrosinase et antioxydant des feuilles de quelques espèces d'arbres et d'arbustes cultivées dans la région de Bejaia.

Pour répondre à l'objectif du travail ci-présent, la méthodologie suivie et réalisée a consisté en :

- ✓ Une extraction éthanolique à partir des feuilles des espèces végétales sélectionnées suivie par une quantification des polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes et tannins) dans ces extraits ;
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydant et antityrosinase de ces extraits ;
- ✓ Une analyse corrélative entre activité antioxydant, antityrosinase avec les taux en polyphénols, d'une part, et entre les activités antityrosinase et antioxydant, d'autre part.

Synthèse
bibliographique

Les Tyrosinases

I) Les tyrosinases

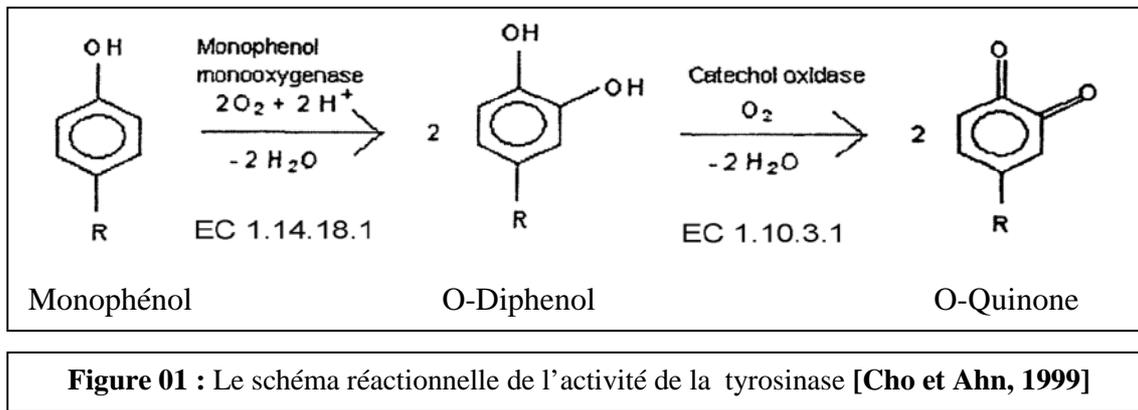
I.1) Historique

La découverte de la tyrosinase pour la première fois revient aux travaux de Bertrand en 1871 qui lui donna le nom de tyrosinase en 1896 [Schweizer, 1916]. En 1938, Les premières tyrosinases extraites d'organisme du règne végétal sont la tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus* par Keilin et Mann et celle de pomme de terre par Kubowitz. En 1966, Nakamura et ses collaborateurs sont arrivés à extraire la première tyrosinase bactérienne à partir du *Streptomyces glaucescens* [Breimer, 2005]. La tyrosinase fut la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité [Lerch, 1981; Jolivet et al., 1998] et ce n'est qu'en 1998 que la première structure cristallographique de cette enzyme extraite d'*Impomea batatas* a été rapportée [Klabund et al., 1998]. Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux tyrosinases de diverses sources comme : les champignons [Frieden et Ottesen, 1959; Papa et al., 1994; Gouzi et Benmansour, 2007], la banane [Palmer, 1963; Ôba et al., 1992 ; Sojo et al., 1998], les tubercules de pomme de terre [Patil et Zucker, 1965; Cho et Ahn, 1999a,b; Marri et al., 2003], l'artichaut, la pomme, la poire, la nèfle, la fraise [Espin et al., 1997 ; Ziyani et Pekiardimc, 2003], le coing [Yagar et Sairolu, 2002] et la tyrosinase humaine [Okombi, 2005 ; Eve, 2011 ; Migan 2013].

I.2) Nomenclature et classification

La tyrosinase (EC 1.14.18.1), une monophenol oxygénase oxydoréductase appartenant à la famille des polyphénols oxydase (PPO) [Papa et al., 1994]. [Mayer, 1987 ; Zawistowski et al., 1991]. Cette enzyme habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale et humaine, qui se rapporte au substrat 'typique', tyrosine est également appelée Crésolase en raison de sa capacité d'utiliser le crésol comme substrat [Issa, 2009]. En présence d'oxygène moléculaire, Cette enzyme présente deux activités catalytiques ; Une activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase ou les monophénols sont hydroxylés en o-diphénols et une activité diphénolase, catécholase ou oxydase ou les o-diphénols sont oxydés en o-quinones (Figure 01) [Cho et Ahn, 1999].

Tyrosinase



I.3) Distribution et localisation subcellulaire

Les tyrosinases sont largement distribuées dans la nature, elles peuvent être extraites à partir de diverses sources d'organismes vivants y compris, les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi se retrouver dans les mycètes [Burton, 1994; Whitaker, 1995; Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006]. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire [Zawistowski et al., 1991 ; Mayer et Harel, 1979]. Chez les mammifères, la tyrosinase est localisée principalement dans les mélanocytes de la rétine et de la peau sous une forme transmembranaire [Claus et Decker, 2006]. Chez les plantes saines, la tyrosinase est majoritairement présente dans les plastides, alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés [Anderson, 1968; Vaughn et Duke, 1984; Zawistowski et al., 1991; Whitaker et Lee, 1995]. Le niveau de son activité dépend de l'espèce, de la maturité, de l'âge et du stockage. Dans certains cas, cette activité peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables. Cette activité est très basse dans les jeunes plantes, souvent même indétectable [Mayer et Harel, 1991].

I.4) Rôles de la tyrosinase

La large distribution des tyrosinases dans la nature a été expliquée par leur importance dans les différents organismes [Breime, 2005].

Chez les mammifères, la tyrosinase est l'enzyme limitante dans l'initiation à la mélanogénèse, elle catalyse trois réactions dans la voie de biosynthèse des mélanines (Figure 02), utilisant l'oxygène moléculaire et la tyrosine comme substrat [Breime, 2005]. Les o-quinones formés sont impliqués dans des réactions qui conduisent à la formation des eumélanines de type noir (responsables de la pigmentation noire de la peau) et des phaeomélanines de type jaune ou rouge (responsables de la couleur des cheveux et des yeux)

Tyrosinase

[Okombi ; 2005]. En plus de son rôle de pigmentation, la mélanine joue un rôle important dans la protection de la peau par l'absorption des rayonnements UV qui causent des dommages de l'ADN et la formation des espèces oxygénées réactives (ROS), qui accentuent le processus du vieillissement et les risques de cancer de la peau [Breime, 2005]. Chez les invertébrés et les insectes, la mélanine est impliquée dans trois processus physiologiques importants, qui sont les réactions immunitaires, le durcissement curatif et la cuticule des blessures (sclérotisation), comme elle participe dans d'autres mécanismes biologiques importants tels que la thermorégulation, le camouflage, l'attraction sexuelle [Breime, 2005]. Pour les champignons, la mélanine participe à la maturation des cellules, et résiste même aux enzymes hydrolytiques en évitant la lyse des cellules par la formation des spores. [Breime, 2005]. La tyrosinase sécrétée par les bactéries du sol est probablement impliquée dans la formation de l'humus via un couplage aléatoire de différents composés aromatiques. Ce qui ouvre un nouveau potentiel d'application dans la détoxification des xénobiotiques à structures phénoliques [Marino et al, 2011].

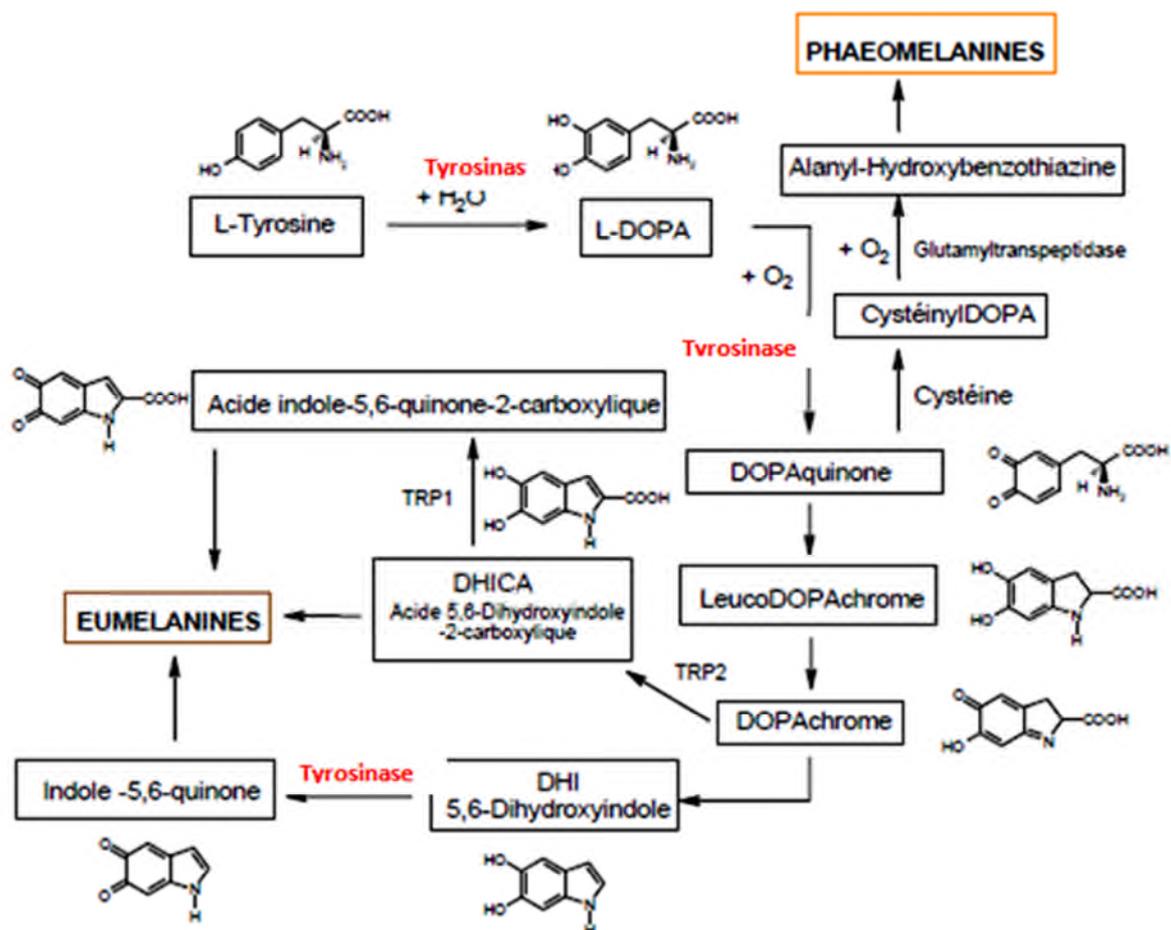


Figure 02 : Le processus réactionnel de la synthèse de la mélanine [Okombi ; 2005]

Tyrosinase

Dans les plantes, la localisation spécifique des formes actives des tyrosinases a laissé supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes [Kuwabara et Katoh., 1999]. Il a été montré que la tyrosinase était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*) [LaxetVaughn., 1991]. D'autres travaux ont attribué à la tyrosinase, un rôle de protection contre les infections microbiennes, virales et les mauvaises conditions climatiques [Martinez &Whitaker., 1995]. La tyrosinase catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones qui présentent des propriétés bactéricides et fongicides [Zinkernagel., 1986]. En plus, ces quinones en se polymérisant forment des polymères bruns insolubles qui constituent une barrière limitant la prolifération de l'infection et l'altération microbienne des tissus de la plante [Chiara, 2012].

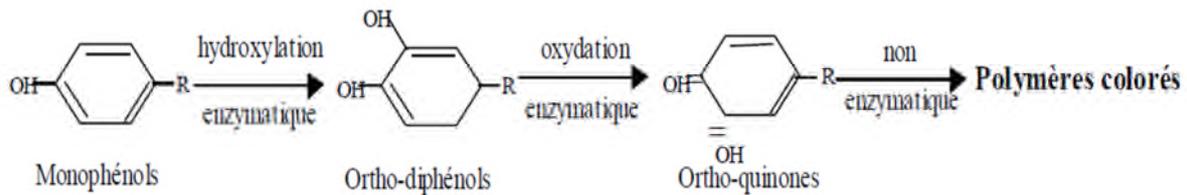
En technologie alimentaire, L'activité de la tyrosinase joue un rôle important dans la qualité des produits alimentaires [Mayer etHarel, 1991], d'une part par sa participation dans la coloration bénéfique de certains aliments, telles que les prunes, les raisins noires, les dattes et le thé, et d'autre part, elle induit une modification de façon désirables ou indésirable des qualités organoleptiques par le processus de brunissement enzymatique des légumes et des fruits [Whitaker et Lee., 1995 ; Mesquita et Queiroz., 2013].

I.5) Désordres associés à l'activité de la tyrosinase

Chez l'homme, L'hyperactivité de la tyrosinase conduit à des hyperpigmentations, telles que l'éphélide ou taches de rousseur, les lentigos, les tâches café-au-lait, mélasma, le chloasma, le naevus (grain de beauté)...etc [Breime,2005, Oualid, 2011]. Ces problèmes dermatologiques sont essentiellement à conséquences esthétiques importantes. Inversement l'inactivation de cette enzyme conduit à la maladie d'albinisme [Manyatja, 2012]. Au niveau du système nerveux, l'hypperréactivité de cette enzyme conduit à une neurotoxicité par la dopamine qui promouvait le développement de la maladie de Parkinson [Breime, 2005].

Chez les végétaux, l'hyperactivité de la tyrosinase est associée au processus du brunissement enzymatique, dans le quelles les composés phénoliques existants dans la matière biologique sont transformés en polymères colorés, le plus souvent noir ou bruns, par le biais des polyphénols oxydases comptant la tyrosinase (réactions ci-dessous).

Tyrosinase



Les enzymes (Polyphenol oxydases, tyrosinase,...etc) et les substrats (polyphenols) de cette réaction, qui sont localisés normalement dans les compartiments cellulaires séparés par des membranes diverses dans des tissus sains et intacts [Toivonen et Brummell, 2008] seront mis en contact dans les tissus vieillissants et/ou endommagés par des blessures lors de diverses manipulations du produit végétale (chocs, épluchage, parage...) ce qui conduit à la production de pigments bruns-noirs. Le brunissement enzymatique est favorisé par l'oxygène, un pH entre 5 et 7. Il est limité par une très faible activité d'eau ($A_w < 0.1$), des pH bas et les traitements thermiques à des températures supérieures à 65°C [Macheix *et al.*, 2005].

I.6) Structure moléculaire et site actif de la tyrosinase

A l'inverse de la tyrosinase des champignons, les tyrosinases sont le plus souvent monomériques, c'est le cas des tyrosinases des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux. La structure primaire de la sous unité principale des tyrosinases, dites catalytiques, présente un PM de 30 et 50k Da quelque soit leurs sources [Van Gelder *et al.*, 1997; Fan et Flurkey, 2004] est typiquement organisée en trois domaines (Figure 03 (a)) : Le domaine N-terminal responsable de la maturation de la protéine enzymatique et de son adressage et sa maturation ; Le domaine C-terminal qui couvre le site enzymatique et permet de garder l'enzyme sous forme inactive sur chemin sécrétoire ; Le domaine central catalytique qui est le plus conservé chez toutes les espèces. Les tyrosinases d'origine animale et végétale contiennent les trois domaines, alors que les tyrosinases fongiques sont dépourvues du domaine N-terminal et la tyrosinase bactérienne ne contient que le domaine central catalytique associé à la protéine de caddie. L'activation de la tyrosinase est effectuée par élimination des deux domaines N et C-terminal chez les végétaux et les animaux, ou par la libération de la protéine de caddie pour les bactéries [Chiara, 2012].

Les tyrosinases sont des métalloprotéines à cuivre de type III, généralement sous forme tétramérique, composées de deux sous-unités H et deux sous-unités L [Wangsaet *al.*, 2011], elles contiennent une paire d'ions de cuivre par sous unité, étroitement espacés dans la structure protéique. Les deux régions occupées par les ions du cuivre sont appelées CuA et

Tyrosinase

CuB et interviennent dans la constitution de site actif. Chacune de ces régions contient trois résidus d'histidine conservée. Cette paire de cuivre est le site d'interaction de la tyrosinase avec l'oxygène moléculaire et ces substrats. [Wangsaet *al.*, 2011]. Le site actif semble être caractérisé par la formation d'une poche hydrophobe avec un nombre de résidus aromatiques conservés à côté des résidus d'histidine dont les noyaux imidazoles forment une sphère hydrophile interne, souvent à l'état de repos, la forme majoritaire est la forme *met*, où un ion hydroxyle forme un pont entre les deux atomes de cuivre [Okombi ; 2005]. La configuration du site actif des tyrosinases, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif [Lerch, 1982] (**Figure 03 (b)**). Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomea batatas*) [Klabunde *et al.*, 1998].

La tyrosinase du champignon de couche *Agaricus bisporus*, est la première structure décrite pour une tyrosinase d'origine fongique [Ismaya *etal.*, 2011] est une protéine globulaire tétramérique (**Figure 03 (C)**) constitués de 569 acides aminés ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. Elle est composée par l'association de deux sous-unités identiques lourdes H de 43-48 kDa et de deux sous unités identiques légères L de 13.4-14 kDa. Les deux sous unités H et L présentent une forte homologie de structure [Robb, 1984 ; Jolivet *et al.*, 1998]. La sous unité H contient le site catalytique alors que la sous unité L pourrait contribuer à la stabilité et/ou à l'activation de l'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante est la forme active H₂L₂. L'enzyme peut aussi se trouver sous la forme L₂H qui présente une activité crésolase et catécholase. Par contre, les sous unité H et L isolées ne posséderaient aucune activité enzymatique. Wichers *et al.* (1996).

Tyrosinase

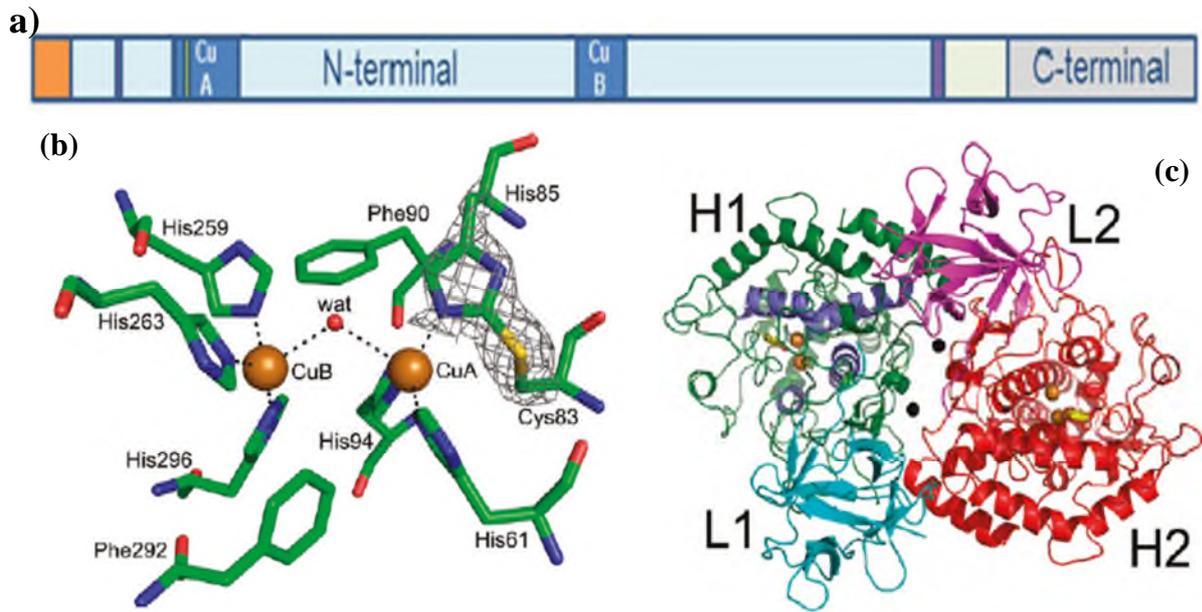


Figure 03 : Présentation de quelques structures de tyrosinase : **a)** organisation en domaine de la chaîne polypeptidique de la tyrosinase [Chiara, 2012]. **b)** La géométrie du site actif de la protéine à cuivre de type III de la tyrosinase [Wangsa *et al.*, 2011]. **c)** la structure tétramérique de la tyrosinase de champignon *A. bisporus* [Wangsa *et al.*, 2011].

I.7) Activités et mécanisme réactionnelle

La tyrosinase peut catalyser à la fois l'oxydation d'un phénol en catéchol (activité monophénolase) et d'un catéchol en *ortho*-quinone (activité diphénolase) [Okombi, 2005]. C'est l'activité monophénolase qui permet d'obtenir la DOPA quinone à partir de la L-tyrosine, ce qui distingue au niveau mécanistique la tyrosinase des autres PPO comme les catéchol oxydases, qui possèdent uniquement l'activité diphénolasique [Haudecoeur, 2011].

Le mécanisme réactionnel de la tyrosinase peut se présenter sous trois états fonctionnels différents : les formes *met*, *oxy* et *desoxy* de la tyrosine [Chiara, 2012]. L'enzyme (forme *desoxy*) activé par la liaison d'une molécule d'oxygène (forme *oxy*) peut présenter deux cycles catalytiques ; le cycle à activité monophénolase et le cycle à activité diphénolase (Figure 04) [Issa, 2009]. Durant le cycle monophénolase, un des deux atomes d'oxygène liés sur l'oxy-tyrosine est transféré vers le substrat monophénol (tel que la L-tyrosine) produisant ainsi un intermédiaire réactionnel *Ortho*-diphénol. Ce dernier sera par la suite oxydé en *Ortho*-quinone puis libéré avec une molécule d'eau [Issa ; 2009].

L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et

Tyrosinase

initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps chez les champignons [Varoquaux, 1978].

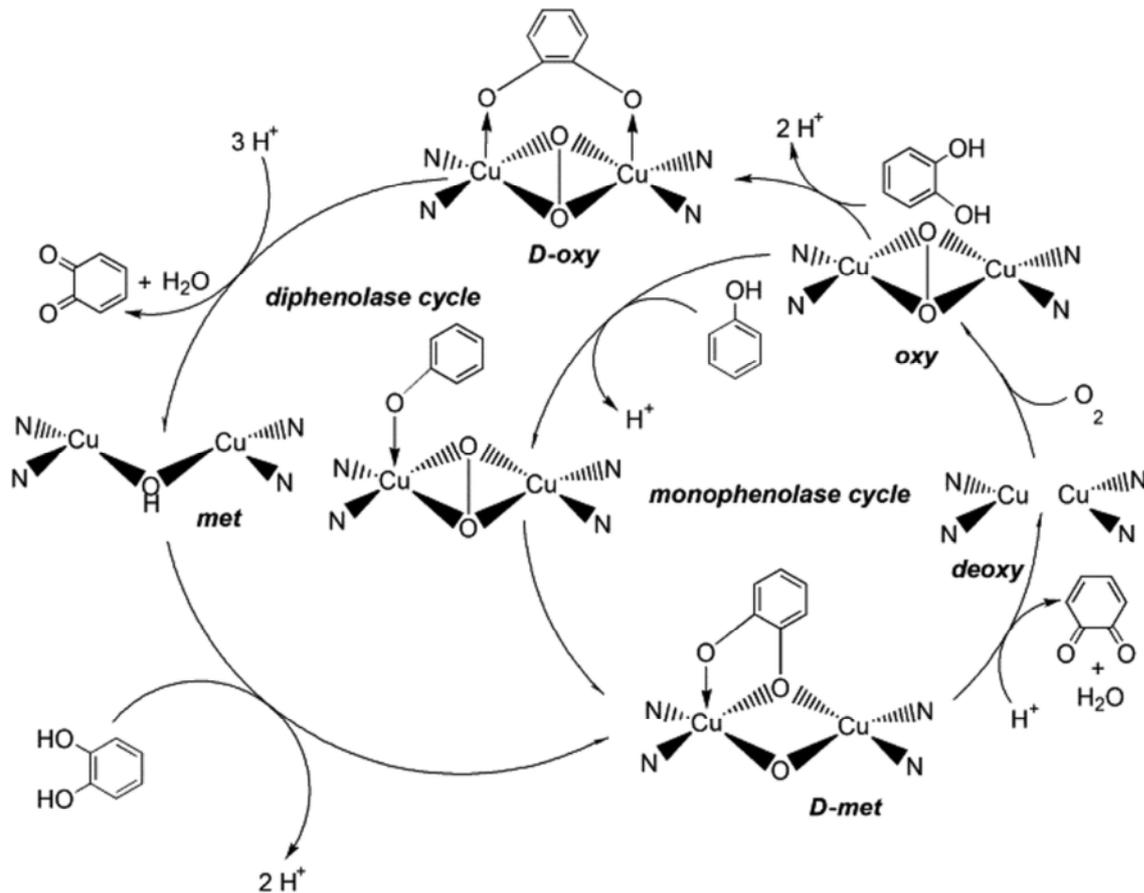


Figure 04: Schéma du mécanisme réactionnel de la tyrosinase [Hamann et al., 2015]

I.8) Spécificité, Affinité et Propriétés cinétiques des Tyrosinases

I.8.1) Spécificité et Affinité

Les tyrosinases à activité monophénol oxydase (crésolase) et diphenol oxydase (catécholase) peuvent catalyser une grande variété de substrats phénoliques (Figure 05) [Whitaker, 1995]. Comme, elles peuvent présenter des affinités différentes vis-à-vis du même substrat selon la source de leurs obtentions tel que, l'espèce, le genre, le cultivar, ou également le type de tissu [Zawistowski et al., 1991].

La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels des tyrosinases trouvées dans les fruits et légumes [Zawistowski et al., 1991 ; Trebst et Depka, 1995]. La spécificité

Tyrosinase

des enzymes, évaluée par le K_m (constante d'affinité) et le V_{max} (vitesse maximale de catalyse), dépend de la structure de l'enzyme et des substrats, mais également des conditions expérimentales [Issa, 2009].

La nature et la position des substituants sur les mono ou les o-diphénols sont déterminants pour la réactivité du substrat vis-à-vis de l'enzyme. **Janovitz-Kllap *et al* en 1989** ont montré que l'affinité de la tyrosinase de pomme pour son substrat augmente avec la présence d'une substitution de l'acide carboxylique conjugué (acide caféique) ou non conjugué (acide o-dihydroxybenzoïque) sur le cycle aromatique. Cependant, la diminution de la valeur de K_m s'accompagne dans ces deux cas d'une forte baisse de la valeur de V_{max} . Lorsque la fonction acide carboxylique est estérifiée (cas de l'acide chlorogénique) ou éloignée du cycle par l'interposition d'une chaîne carbonée (cas de l'acide o-dihydroxyphényl acétique et o-dihydroxyphényl propionique), les valeurs de K_m et V_{max} augmentent [Cheriot, 2007]. L'affinité des tyrosinases pour leurs substrats varie également selon la source enzymatique. Ainsi, les valeurs de K_m apparentes (obtenues lorsque les cinétiques sont réalisées à concentration constante en oxygène) vis-à-vis du 4-méthylcatéchol varient de 0.5 à 20 mM selon qu'il s'agit de catécoloxydase de pomme [Janovitz-klapp *et al.*, 1989], de salade [Goupy *et al.*, 1994], d'abricot [Chevalie *et al.*, 1999] ou de champignon de paris [Fayed-Eldahouk, 1998].

En ce qui concerne la spécificité des tyrosinases vis-à-vis de l'oxygène, elle varie selon la source de l'enzyme et les valeurs de K_m sont comprises entre 0.025 mM pour la catécoloxydase d'abricot [De Rigalet *et al.*, 2000], 0.054 mM pour tyrosinase de la pomme [Janovitz-klapp *et al.*, 1990] et 0.1 mM pour la tyrosinase de champignon de paris [Espinet *et al.*, 1995]. Ceci implique que pour les solutions aqueuses saturées en oxygène dissout ≈ 0.25 mM et à 25°C, seule la catéchole oxydase d'abricot est saturée en oxygène puisque la teneur en oxygène est 10 fois supérieure à la valeur du K_m [wise et Naylor, 1985].

Tyrosinase

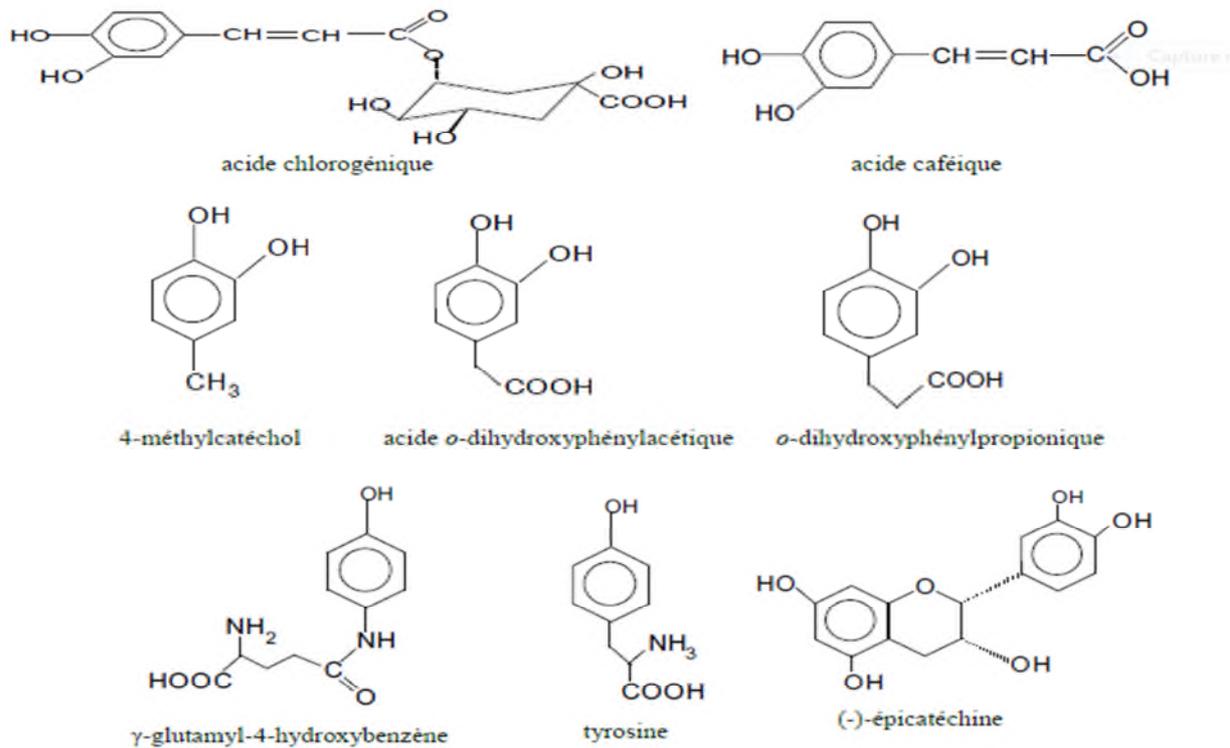


Figure 05 : Structure de quelques composés phénoliques substrats de la tyrosinase [Issa ; 2009].

I.8.2) Propriétés cinétiques

Les propriétés cinétiques, l'efficacité, le pH optimal et la température optimale des tyrosinases varient selon la source de ce dernier et la nature du substrat (**TableauxI**).

pH optimal des tyrosinases

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la tyrosinase varie avec la source de l'enzyme et aussi en grande partie avec le substrat [Issa ; 2009]. En général, l'activité optimale des tyrosinases est située dans une gamme de pH neutre ou acide. Seulement quelques tyrosinases ont été rapportées avec un pH optimum alcalin [Chiara, 2012]. C'est le cas des tyrosinases de *Thermomicro biumroseum* et de *Pinusdensi floradont* les pH optimum sont 9-9,5 pour le substrat L-DOPA [Kong *et al.*, 1998 ; Kong *et al.*, 2000] et celui de la tyrosinase extracellulaire de *T. reesei* est pour le substrat L-tyrosine [Selinheim *et al*, 2006].

Le pH du milieu réactionnel a un effet non négligeable sur la spécificité des tyrosinases. Ainsi, Janovitz-Kllap *et al* 1989 ont montré que les protons agissaient comme inhibiteurs vis-à-vis de l'oxydation d'o-diphénols par la tyrosinase de pomme [ISSA ,2009]. Le

Tyrosinase

changement du pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la tyrosinase par : l'inactivation de l'enzyme à cause du changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la réaction catalytique, le changement de l'état d'ionisation du substrat, et/ou la modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons H ou les hydroxyles OH sont impliqués [Gouzi, 2011].

Température optimale des tyrosinases

La température optimale de l'activité des tyrosinases varie selon la source enzymatique. En général, elle se situe dans la gamme 25-35°C [Daryoush et Nilüfer., 2013]. La stabilité thermique des tyrosinases dépend également de la spécificité du substrat, du pH optimal, de la température, et surtout de la source d'enzyme et du cultivar [Vémos-Vigyâzô, 1981; Yemenicioglu et Cemeroglu, 2003]. En général, Les tyrosinases ne sont pas des enzymes thermostables et les thermostables les plus connues sont les tyrosinases de *T. roseum*, de *P. sanguineus* et de *T. roseum* qui maintiennent leur activité à 100% pendant dix minutes d'incubation à 70 °C, mais elles sont rapidement inactivées aux températures supérieures à 75 °C [Daryoush et Nilüfer., 2013]. Les traitements thermiques de courtes durées en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C, suffisent dans la plupart des cas à la destruction irréversible, partielle ou totale, de la protéine enzymatique [Vémos-Vigyâzô, 1981; Zawistowski et al.,1991; Yemeniciolu et Cemeroglu, 2003].

Tyrosinase

Tableau I : Caractéristiques cinétiques de quelques tyrosinases végétales, bactériennes et fongiques

Règne	Espèce	Substrat	Activité enzymatique	Km	Vmax	pHopt	Tempopt(°C)	Références
Végétal	Avocat (<i>Persea americana</i> Mill)	L- tyrosine	1.15µ mol/h/mg	2.0mM	7.3µmol/h/mg	6.8	25	[Kahn et Pomerantz, 1980]
	Pommes	PHPPA		2.8mM	1.7µM/min	4.6	25	[Espin et al 1995]
	Variétés	4HA	3.0ng/mg	3.4Mm	6.8µM/min	4.6	25	[Espin et al 1997a]
	Verdedoncella	Tiron		3.3mM	1.8µM/min	4	30	[Dutta et al 2001]
	Artichaut (<i>Cynarascolymus L</i>)	4HA		2.7mM	20.10µM/l/min	4.3	25	[Espin et al., 1997a]
	Poire	PHPPA	30.8 pkat	0.5 mM	46.67Pkat	4.3	25	[Espin et al., 1997b]
	Variétés Blanquilla	4HA	12.2 ng/ml	2.61mM	4.10 µM/min		25	
Fraise (<i>Fragaria-ananassa</i> Duchesne)	4HA 4HA	44.3ng/ ml	2.11mM	0.61 µM/min	4.3 4.3	25 25	[Espin et al., 1997c]	
Nefle	4HA	21.1ng / ml	1.42 mM	3.90µM/ min	4.4	25	[Espin et al., 1997]	

Tyrosinase

Bactérie	<i>Streptomyces antibioticus</i>	4-MC	N M	1.3 mM	35.3 μ M /min	6.5	25	[Pinero et al 2006]
	<i>Bacillus megaterium</i>	L-Tyrosine	N M	0.05 mM	6.8 μ M/min/mg	7.5	25	[Mcmahon et al 2006]
	<i>Pseudomonas Putida</i> F6	L- Tyrosine L-DOPA	N M	0.23mM 0.33mM	386U/ml 902 U/ml	7 7	30 30	[Mcmahon et al 2006]
Champignon	<i>Agaricusbisporus</i>	L- DOPA	N M	0.66 mM	22.3 n mol/min	6.5	30	[Schurink et al 2007]
	<i>Macrolipiota gracilenta</i>	PHPPA DHPPA	N M	0.8mM 1 mM	2000U/mg 2000U/mg	7 5	30	[Yakup2012]
	<i>Macrolepiota Mastoidea</i>	PHPPA 4-methyl- catechol	N M	2.7 mM 5.3mM	41 μ M/min/mg 384.6 μ M/min/mg	4 6	25 35	[Kolcuog'lu et al., 2007]

I.9) Effecteurs de la tyrosinase

I.9.1) Les inhibiteurs de la tyrosinase

Le contrôle de l'activité de la tyrosinase, est important pour la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux [Jolivet *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 2009]. Les inhibiteurs de la tyrosinase, sont donc employés en tant qu'agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation. Par conséquent, les inhibiteurs de la tyrosinase sont censés avoir de larges applications dans les industries médicales [Mosher *et al.*, 1983] et cosmétiques [Maeda et Fukuda, 1991]. Dans l'industrie alimentaire, les inhibiteurs de la tyrosinase peuvent être employés comme des conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale. L'inhibition de la tyrosinase responsable du brunissement des produits alimentaires est une préoccupation majeure des industries alimentaire [McEvily *et al.*, 1992].

En théorie, le brunissement des légumes et des fruits par la tyrosinase peut être empêché par l'inactivation thermique de l'enzyme, par l'élimination de l'un des deux substrats nécessaires pour la réaction (et/ou les composés phénoliques), par l'abaissement du pH de 2 unités ou plus au-dessous du pH optimum, par des réactions d'inactivation de l'enzyme ou par l'addition des composés qui inhibent la tyrosinase ou qui empêchent la formation de la mélanine [Vémos-Vigyâzô, 1981 ; Whitaker et Lee, 1995].

Des centaines de composés ont été testé comme d'éventuels inhibiteurs du brunissement enzymatique [Whitaker et Lee, 1995]. Ils ne doivent pas être toxiques, et ne doivent pas modifier le goût, la saveur ou la texture du produit [Vémos-Vigyâzô, 1981]. Selon leur mode d'action, Les inhibiteurs de la tyrosinase sont soit :

- Des inactivateurs de types inhibiteurs suicides qui se lient à l'enzyme par liaisons covalentes. C'est le cas des chélateurs comme les azotures, les cyanures et les halogénures [Rescigno *et al.*, 2002].
- ✓ Des inhibiteurs qui se lient à l'enzyme par un mécanisme réversible réduisant ainsi sa capacité catalytique [Chiara *et al.*, 2012]. C'est le cas des analogues des substrats monophénols et diphénols comme les acides carboxyliques aromatique, les acides benzoïque et cinnamique) [Chiara *et al.*, 2012].

I.9.1.1) Les inhibiteurs synthétiques

Plusieurs classes de composés purement synthétiques ont été développées comme inhibiteurs de la tyrosinase sur la base de relations structure-activités et, souvent, de leur possible affinité avec le centre binucléaire cuivrique de l'enzyme [**Chiara, 2012**], tels que les acides aromatiques et leurs dérivés, Phénylthiourées, Oxadiazoles et les petites molécules synthétiques.

L'acide cinnamique, acide 4-hydroxycinnamique, l'acide 4-méthoxycinnamique, et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique sont des inhibiteurs de l'activité diphenolasique de la tyrosinase de champignon avec des efficacités des IC₅₀ de l'ordre de 2.10, 0.50, 0.42 mM et 2.17 Mm respectivement. L'acide cinnamique et l'acide 4-méthoxycinnamique sont des inhibiteurs non compétitifs avec des KI de 1.994mM et 0.458 mM respectivement, alors que l'acide 4-hydroxycinnamique est un inhibiteur compétitif (KI= 0.244 mM) [**Shi et al, 2005 ; Khan, 2007**]. L'oxadiazole et letriazolothiadiazole et leurs dérivés inhibent fortement la tyrosinase de champignon (KI varie de 0,19 à 1.49 μ M) [[**Khan, 2007, Loizzo et al., 2012**].

Les azotures, le cyanures, le monoxyde de carbone, l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA), les halogénures sont constatés comme des chélateurs du cuivre [**Janovitz-Klappet et al., 1990**]. Les composés halogènes agissent comme inhibiteurs non compétitifs ou compétitifs sur la tyrosinase de pomme de terre [**Cheriot, 2007**]. Les substances soufrées sont de bons ligands du cuivre. Ainsi, la *N*-phénylthiourée inhibe la tyrosinase avec une efficacité correspondant à IC₅₀ = 1,8 mM [**Critonet et al., 2008**].

L'hydroquinone, l'arbutine, l'acide ascorbique, l'acide kojique, les acides rétinoïques, les dermocorticoïdes et de nombreuses molécules trouvent une large utilisation en dermatologie essentiellement pour des raisons esthétiques en raison de leurs pouvoirs inhibiteurs de la tyrosinase [**Migan, 2013**]. Mais des études plus poussées et surtout cliniques et agroalimentaires, ont montré que ces molécules ont de nombreux effets secondaires : irritation, dermatite allergique de contact, hyperpigmentation post-inflammatoire et même toxique qui s'accompagnerait par des effets cancérigènes, même des modifications de la qualité nutritionnelle des produits alimentaires. De ce fait, la recherche de molécules naturelles inhibitrices de tyrosinase, s'est considérablement développée, car une source importante de molécules bioactives d'origine végétale et animale, constituent un ensemble d'inhibiteurs de tyrosinases souvent exempts d'effets secondaires [**Oualid, 2011**].

I.9.1.2) Les inhibiteurs naturels de la tyrosinase

De nombreuses molécules d'origine naturelle inhibent les tyrosinases. Parmi ces substances, on cite ; les lipides et les stéroïdes, les acides aminés, peptides et protéines, les polyphénols [Chiara et al., 2012]. La trilinoléine, un triacyl glycérol, des composés naturels à une chaîne grasse inhibent la tyrosinase de champignon avec une efficacité proche à celle de l'acide kojique [Jeonet et al., 2006]. Un ester à longue chaîne carbonée extrait de fleurs *Amberboa ramosa*, est un puissant inhibiteur de l'activité diphénolase de la tyrosinase, (IC50 = 1,36 µM) [Khan et al., 2005]. Un triterpénoïde et un 17α-éthylstéroïde, stéroïdes isolés de fleurs d'*Amberboa ramosa* et du champignon *Cunninghamella elegans* respectivement, présentent une efficacité inhibitrice de l'activité diphénolase de la tyrosinase du champignon meilleure que celle rapportée pour l'acide kojique (IC50 = 1,32 µM et 1,53 µM, respectivement) [Haudecoeur, 2006].

Les acides aminés, peptides et protéines sont aussi des inhibiteurs potentiels de la tyrosinase peuvent inhiber l'activité tyrosinase, soit en chélatent le Cu²⁺ du site actif de l'enzyme [O'Sullivan, 1969, Kahn 1985] , ou en réagissant avec les quinones [McEvily et al., 1992]. Le brunissement des tranches de pomme est largement inhibé par une solution à 10 % de miel. D'après les expériences de purification du composé du miel responsable de cette inhibition, il s'agit d'un peptide de 600 Da dont le mode d'action de ce peptide résiderait dans la formation de complexe stable avec le Cu²⁺ du site actif de la tyrosinase. [Chen et al., 1998]. La L-cystéine est l'acide aminé qui montre le plus fort pouvoir inhibiteur du brunissement enzymatique de ses légumes [Cheriot, 2007]. Son efficacité rivalise avec celle du métabisulfite de sodium [Kahn, 1985].

Les polyphénols et en particulier les flavonols sont considérés parmi les inhibiteurs les plus actifs de la tyrosinase. [Haudecoeur, 2011] en raison de la présence d'un motif α-hydroxycétone (Figure 05, Tableau II) qui est capable de chélater les centres à cuivre du site actif de la tyrosinase. Ainsi, la quercétine ou le kaempferol ont été identifiés comme bons chélateurs d'ions Cu²⁺ et inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase [Kubo et al., 2000]. Les flavones, les flavanones et les flavanols et compris nobiletin, naringin et neohesperidin montrent une activité antityrosinase semblable à celle de l'acide kojique [Hung et al., 2012]. Les études sur l'espèce de *Morus*, montrées qu'elle est très riche en polyphénols qui exercent une forte inhibition sur la tyrosinase. La mulberroside F (moracin M-6,3'-di-O-β-glucopyranoside) est purifiée à partir des feuilles de cette espèce, présente une importante

Tyrosinase

inhibition de l'activité diphénolase de la tyrosinase du champignon par un rapport de cinq fois plus fort que l'acide kojique. Norartocarpétin (5, 7, 2', 4'-tetrahydroxyflavone) extrait de la tige de la même espèce inhibe l'activité monophénolase de la tyrosinase 10,4 fois plus fort que l'acide kojique par un mécanisme compétitif avec une constante d'inhibition $k_i = 1.35 \mu\text{M}$ [Kang *et al.*, 2013].

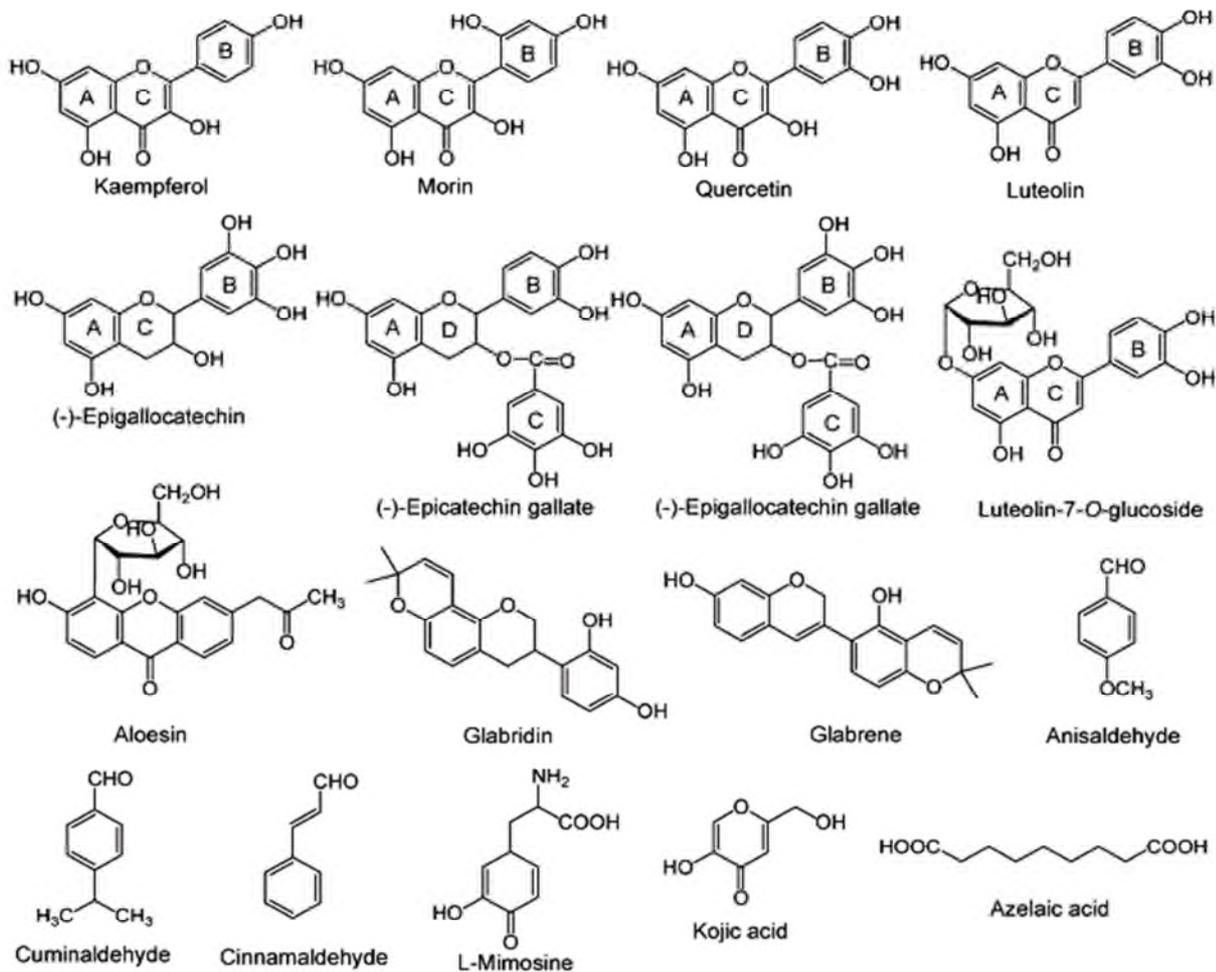


Figure 06: La structure de quelques substances phénoliques inhibitrices de tyrosinase [Kim et Uyamab, 2005].

Un autre flavanol, taxifolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanol) isolé à partir de *Polygonum hydropiper* qui présente une même activité inhibitrice de la tyrosinase que l'acide kojique [Chang, 2009]. Les études des extraits de racine et de graine de *Glycyrrhiza*, ont montré une teneur importante en isoflavonoïdes, la glabridine un dérivé d'isoflavane, qui révéla quinze fois plus actif que l'acide kojique sur l'activité monophénolase de la tyrosinase, selon un mécanisme non-compétitif [Neryaet *al.*, 2003]. Lee et ses collaborateurs, ont identifié d'autres isoflavonoïdes plus forts que l'acide kojique par un rapport de dix. Haginin A (2',3'-

Tyrosinase

dimethoxy-7,4'-dihydroxyisoflav-3-ene) isolé de l'espèce *Les pedeza cyrtobotrya* qui exerce une forte inhibition de l'activité monophénolase de la tyrosinase par un mécanisme non compétitif. D'autre isoflavonoïdes, la glyaspérine C, est encore plus active avec une $IC_{50} = 0,38 \text{ Mm}$ [Baeket *et al.*, 2008].

Les chalcones peuvent aussi inhiber les tyrosinases. Ces molécules, portant souvent un groupement prényle, ont révélé des activités antityrosinases intéressantes, c'est le cas de la kuraridine ($IC_{50} = 0,6 \text{ }\mu\text{M}$) qui exerce une inhibition sur l'activité monophénolase de la tyrosinase, une activité dix fois meilleure que celles exercées par les flavones et les flavanones [Zhang *et al.*, 2009]. Les positions et le nombre des groupements hydroxyles des chalcones influencent l'activité antityrosinase, Nerya et ses collaborateurs (2003) expliquent par la proximité structurale entre une 4-hydroxychalcone et la L-tyrosine. Ainsi, les taux d'inhibition pour la 4-hydroxychalcone et la 4,2',4'-trihydroxychalcone sont plus importants par rapport à d'autres analogues mono- ou dihydroxylés. Le motif résorcinol des chalcones est un élément important dans l'efficacité inhibitrice de ces métabolites. La 2, 4,3',4'- et la 2,4,2',4'-tétrahydroxychalcone ont en particulier montré des valeurs basses d' IC_{50} (respectivement 0,2 et 0,02 μM) [Khatib *et al.*, 2005].

Les stilbènes, des diphényléthènes qui se trouvent à l'état naturel sous forme polyhydroxylée, comme le resvératrol et ses dérivés, sont des inhibiteurs puissants de la tyrosinase. L'oxyresvératrol, métabolite portant deux motifs résorcinol possède une activité antityrosinase 32 fois plus forte que l'acide kojique et 50 fois plus forte que le resvératrol par un mécanisme non compétitif [Kim *et al.*, 2002]. Plusieurs dérivés stilbènes ont été identifiés pour leur potentiel intéressant dans l'inhibition de la tyrosinase, notamment la chloropurine, un oxyresvératrol géranylé provenant de *Chlorophora excelsa* [Shimizu *et al.*, 2003], ainsi, le gnétol et le piceatannol, des stilbènes tétrahydroxylés analogues de l'oxyresvératrol et isolés respectivement de *Gnetum gnemonet* d'espèces de raisin. Ces composés possèdent des valeurs d' IC_{50} de 15 à 30 fois meilleures que l'acide kojique [Ohguchiet *et al.*, 2003 ; Yokozawaet *et al.*, 2007]. La double liaison des stilbènes ne semblent pas être indispensable à l'activité antityrosinase. En effet, il a été révélé que le dihyteldrooxyresvératrol est environ 8 fois plus efficace que l'oxyresvératrol ($IC_{50} = 1,6 \text{ }\mu\text{M}$ contre 12,7 μM sur l'activité diphénolase) [Haudecoeur, 2011]. Un représentant de cette nouvelle classe, est le meilleur inhibiteur de la tyrosinase existant à ce jour. Il possède une activité 546 fois plus forte que l'acide kojique (activité monophénolase), avec un K_i d'environ 5 Nm [Ha *et al.*, 2007].

Tyrosinase

Tableau II : Type d'inhibition et d'efficacité de quelques polyphénols à activité antityrosinase.

Polyphenols	Source vegetale	Type d'inhibition	Constante d'inhibition Ki ou %	IC50	Reference
Résorsinol	<i>Inulaeflos</i>	Non compétitif	1.48µM	4.35mg/ml	[Loizzo et al,2012]
Quercétine	<i>Heterothecainuloide</i> <i>s</i>	Compétitif	-	0.07 mM	[Isao et al, 2000]
Kaempferol		Compétitif	-	0.23 mM	
Lutéoléine		Non Compétitif	-	0.19 mM	
Sophoravanone G	<i>Sophora flavescens</i>	Non Compétitif	7.7 µM	4.7 µM	[Ryu et al,2008]
Kurarinone		Non Compétitif	4.1 µM	2.2 µM	
Kuraronile		Compétitif	45.0 µM	0.1 µM	
Phlorotanindieckol	<i>Ecklonia cava</i>	Non Compétitif	-	20 µM	[Kang et al.,2012]
N-formylanonaine	<i>Michelia alba</i>	Irréversible	-	73.3 µM	[Wang et al,2010]
Transcinnamaldehyde	<i>Cinnamomun cassia</i>	Mixte	2.38mg/ml	4.04mg/ml	[Chang et al, 2013]
Aloesine	<i>Aloebarbadensis</i>	Non Compétitif	130.88 µg/ml	108.62 µg/ml	[Xiaofang et al, 2012]
Uralenol	<i>Broussonetiapapyrif</i> <i>era</i>	-	-	49.5 µM	[Zheng et al, 2008]
Quercetin		-	-	57.8 µM	

Tyrosinase

Tableau II : Type d'inhibition et d'efficacité de quelques polyphénols à activité antityrosinase (suite)

25 (26)-diene		-	-	1.32 μ M	
(23R)-5a-cycloart-24-ene-3b		-	-	4.93 μ M	
(22R)-cycloart-20, 25-dien-2a3b22a triol	<i>Amberboaramosa</i>	-	-	7.92 μ M	[Khan et al, 2006]
cycloart-23-ene-3b, 25-diol		-	-	8.32 μ M	
Extrait brute	<i>LavendulaStoechas</i>	Mixte	0.183 mg/ml	0.04 mg/ml	
	<i>Lavendula</i>				[Cheng et al, 2007]
Extrait brute	<i>Angustifolia(Vera)</i>	Mixte	-	0.03 mg/ml	

I.9.2) Les activateurs

La tyrosinase peut être activée, par un choc acide ou basique, par l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), [Seo *et al.*, 2003; Pérez-Gilabert *et al.*, 2004; Gandja-Herrero *et al.*, 2005]. Ce dernier (SDS), peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la tyrosinase de champignon de couche (*Agaricus bisporus*) [Espin *et Wichers*, 1999]. Il a même été montré que le SDS active la tyrosinase latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. De même, l'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la tyrosinase [Van Leeuwen *et Wichers*, 1999 ; Fan *et Flurkey*, 2004].

Radicaux libres
et
Antioxydants

II) Les radicaux libres (RL) et les antioxydants

II.1) Les radicaux libre

II .1.1) Définition

D'après **Goudable et Favier (1997)**, un radical libre est une espèce chimique, molécule, ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité et donc une demi-vie très courte.

En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable, il va donc se réduire en oxydant un autre composé [**Marfak, 2003**].

La réactivité chimique des radicaux libres de l'oxygène est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres entrant dans les processus physiopathologiques humains sont les radicaux superoxydes et hydroxyle, mais d'autres dérivés de l'oxygène jouent également un rôle important dans le stress oxydant, en particulier le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote. C'est pourquoi le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) est préféré à celui de radicaux libres puisque le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre [**Asmus et Bonifacic, 2000**].

II.1.2) Production des radicaux libres

La production des espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respiration oxydative. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau au niveau de la mitochondrie, elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés [**Favier, 1997**].

Les autres sources de production de radicaux libres sont classées en deux catégories :

❖ **Les sources endogènes** : où les radicaux libres sont des produits des réactions de l'organisme.

❖ **Les sources exogènes** : les êtres vivants sont exposés quotidiennement à des polluants (fumée de cigarette, rayons ultraviolets, radiations...) susceptibles d'être à l'origine de la production de radicaux libres, une fois dans l'organisme [**Pastre, 2005**].

La (**Figure 07**) résume les principales étapes de la production des espèces réactives de l'oxygène.

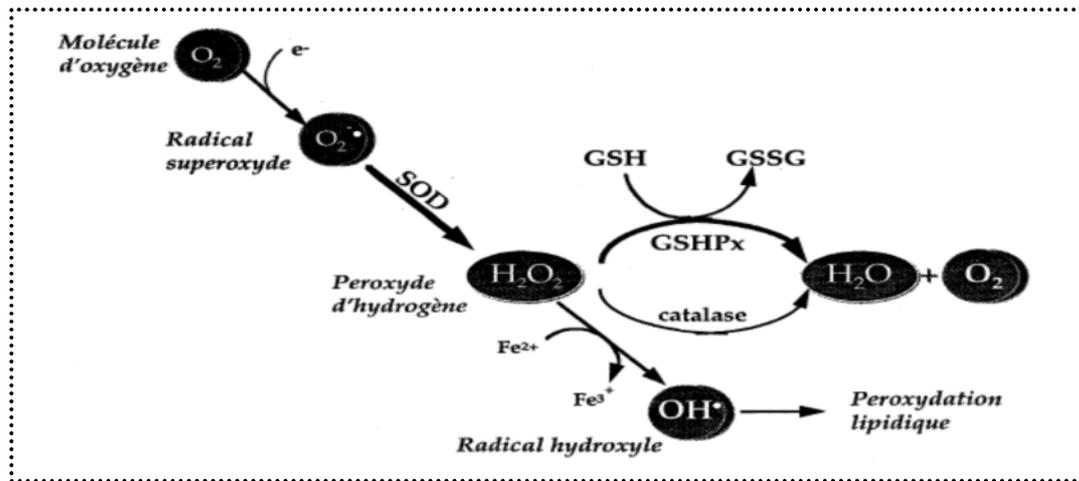


Figure 07: Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène
[Goudable *et al.*, 1997].

II.1.3) Le stress oxydant

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'ERO et les systèmes de défenses antioxydants. Il faut souligner que les ERO peuvent d'ailleurs jouer un rôle physiologique important comme dans la phagocytose des bactéries par les cellules immunitaires [Koechlin-Ramonatsco, 2006].

Un stress oxydant se définira lorsqu'il y aura un déséquilibre profond entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers. Cette situation peut résulter d'un dysfonctionnement de la chaîne mitochondriale (ischémie-reperfusion, vieillissement), d'une activation de systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, monoamine oxydase...), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, ...). Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant [Pincemail *et al.*, 2008].

II.1.4) Conséquences du stress oxydant

Des concentrations élevées en ERO peuvent être un important médiateur de dommages des structures cellulaires, des acides nucléiques, des lipides et des protéines (**Figure 08**) [Valko *et al.*, 2007].

Selon Favier, (2003), la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la production mitochondriale de radicaux.

Le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies comme le cancer, syndrome de détresse respiratoire aigue, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré...ect [Donnet, 2001]. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires [Sheehan, 2000 ; Pfaffly, 2001 ; Lesgards et al., 2002 ; favier, 2003].

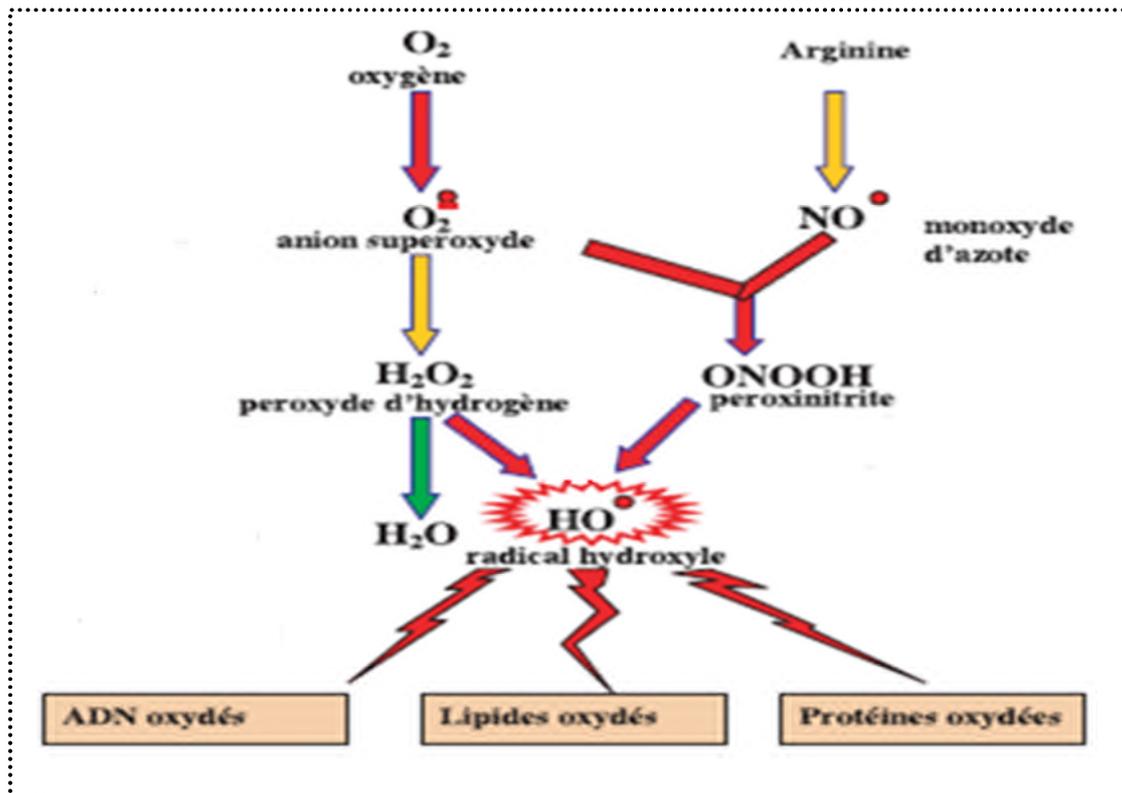


Figure 08 : Principales cibles des ERO [Favier, 2003].

II.2) Les Antioxydants

Les antioxydants sont définis par *kumaret al.*, (2012), comme étant des composés pouvant être de nature exogène ou endogène et possédant, l'un comme l'autre la capacité d'empêcher la génération des oxydants toxiques, d'arrêter ceux qui sont déjà produits et de les inactiver et de bloquer de ce fait la réaction en chaînes de propagation produite par ces oxydants .

Selon **Valko et al.,(2006)**, un bon antioxydant devrait à la fois :

- Agir spécifiquement sur les radicaux libres;
- Chélater les métaux de transition;
- Agir en synergie avec d'autres antioxydants pour se régénérer;
- Etre aisément absorbé;
- Agir à des concentrations physiologiques relativement faibles;

La (**Figure 09**), représente les principaux antioxydants et leurs sites d'action au niveau de l'organisme.

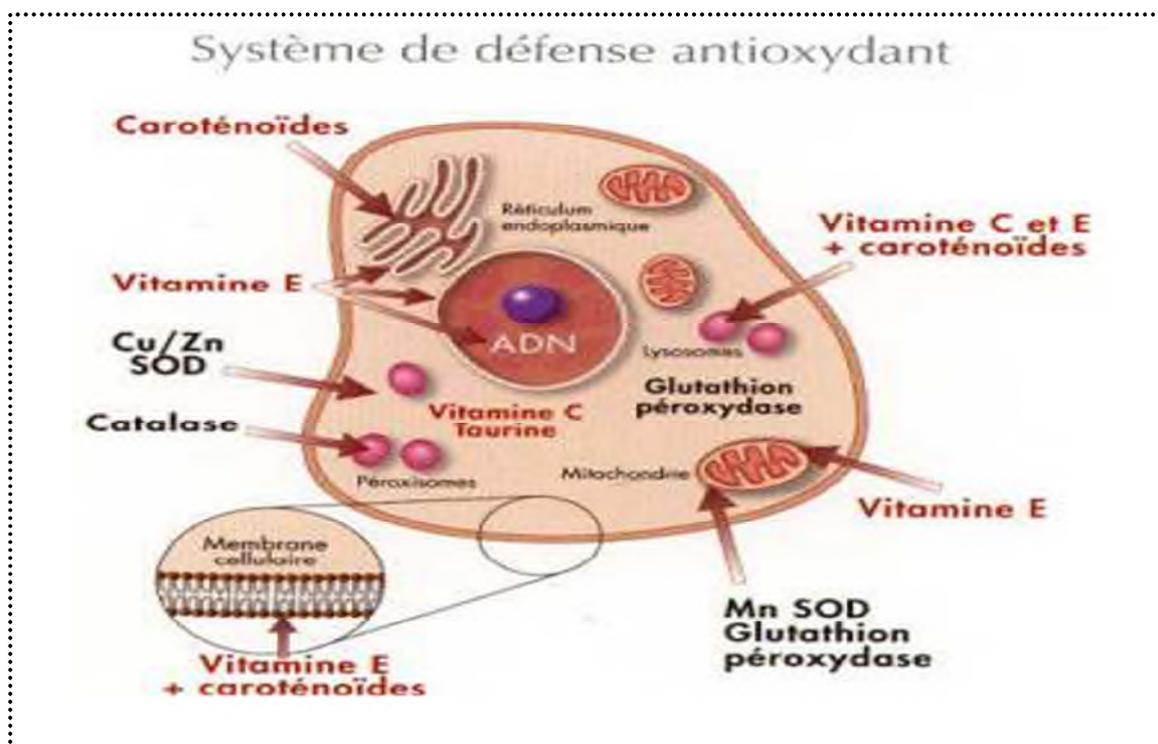


Figure 09:Sites d'action des nutriments antioxydants et des enzymes [Pastre, 2000].

II.2.1) Antioxydants endogènes

Pour lutter contre l'excès de production de radicaux libres (RL), l'organisme dispose d'enzymes antioxydants ubiquitaires tel que les superoxydesdismutases (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (**Afonso et al., 2007**), mais également de systèmes non enzymatiques comme les thiols, le glutathion, la bilirubine (**Berger et Chioléro, 2001**), des

lipases, des protéases, des endonucléases qui éliminent les molécules oxydées, l'albumine et la ferritine qui complexent les ions divalents (**Pastre, 2005**).

↳ A titre d'exemple, l'un des antioxydants enzymatiques intracellulaires les plus efficaces est la superoxydedismutase, il s'agit d'une enzyme antioxydant qui catalyse la dismutation de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en oxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui sera transformé à son tour en $H_2O + \frac{1}{2} O_2$ par la catalase (**Valko et al., 2006**).

II.2.2) Antioxydants exogènes

Les antioxydants alimentaires sont essentiellement représentés par l'acide ascorbique (vitamine C), l' α - tocophérol (vitamine E), les caroténoïdes, les polyphénols ainsi que d'autres antioxydants (**Valkoetal., 2007**).

Cette classe d'antioxydants est particulièrement intéressante puisqu'il est possible de renforcer les défenses de l'organisme en augmentant les apports exogènes de ces différentes molécules (**Pastre, 2005**).

↳ La vitamine C (acide ascorbique) est un antioxydant très puissant qui se concentre au niveau de l'organisme dans les milieux aqueux, ses associés antioxydants primaires sont la vitamine E et les caroténoïdes.

L'acide ascorbique possède deux groupes hydroxyle ionisables. Son mécanisme d'action est représenté dans la (**Figure 10**) (**Valkoetal., 2006**).

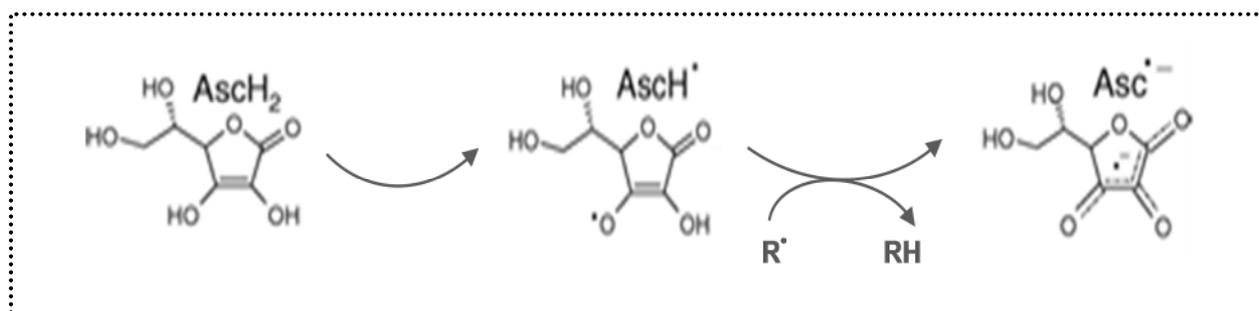


Figure 10 : Réaction entre l'acide ascorbique et un radical (R^{\cdot}) (**Valkoet al., 2006**)

↳ Vitamine E (tocophérol) : elle est considérée comme le principal antioxydant attaché à la membrane utilisé par la cellule pour inhiber la peroxydation lipidique [**Pryor, 2000 ; Valkoet al., 2006**]. Durant la réaction antioxydant, le α -tocophérol est converti en radical α -tocophérol beaucoup plus stable en perdant un hydrogène arraché par une espèce radicalaire (radical peroxy).

↳ Caroténoïdes : L'activité antioxydant de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure [Mortensen *et al.*, 2001]. Généralement, elles interagissent avec les radicaux libres (ROO^\bullet , R^\bullet) par 3 mécanismes, soit par l'abstraction d'hydrogène, transfert d'électron et addition du radical [El-Agamey *et al.*, 2004].

↳ Les polyphénols : Les polyphénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin *et al.*, 2002) ; Ces composés attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En effet, Les antioxydants phénoliques (PhOH) interfèrent dans l'oxydation des lipides et d'autres molécules par le transfert rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux (Figure 11).

Les radicaux phénoxy intermédiaires sont relativement stables et ne pourront donc pas promouvoir d'autres réactions d'oxydation en chaîne [Valko *et al.*, 2006].

Les polyphénols sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices [Pastre, 2005].

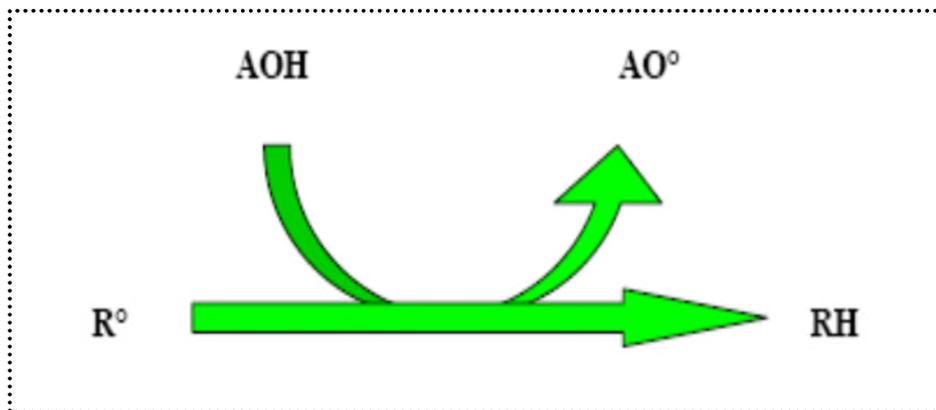


Figure 11 : Réaction entre un composé phénolique et un radical (R^\bullet) [Pastre, 2005].

Présentation
des
plantes étudiées

III) Présentation des plantes étudiées

Dans ce chapitre nous rapportons des généralités ; classification, descriptions botaniques et propriétés biologiques, de quelques espèces des genres auxquels appartient le matériel biologique que nous avons utilisé dans notre travail expérimentale. En l'occurrence, les genres *Citrus*, *Pistacia*, *Citratonia*, *Crataegus*, *Olea*, *Quercus* et *Arbutus*.

III.1) Le genre *Citrus*

III.1.1) Définition et classification

Le genre *Citrus* est composé de nombreuses espèces comestibles, dont les oranges, les citrons verts (*Citrus limon*), les pomelos (*Citrus paradisi*), les mandarines (*Citrus reticulata*), les clémentines (*Citrus clementina*) et les oranges (*Citrus sinensis*) [Milind et Dev, 2012] (**Figure 12**). Ces dernières sont connues sous le nom d'Agrume, du latin « *acrumen* », signifiant "saveur acre". Ces derniers appartiennent à la famille des Rutacées de la classe des Magnoliopsida et du règne des Plantae [Hallal, 2011].

Le genre *Citrus* semble être originaire du sud-ouest asiatique et la région indienne. [Bachése et Bachése, 2011]. Il contient plusieurs espèces qui peuvent être subdivisées en plusieurs variétés importantes résultant soit de mutations spontanées ou de multiples hybridations [Polese, 2008]. La plupart des espèces de ce genre sont compatibles avec une pollinisation croisée et peuvent être greffés les uns sur les autres [Benedicte et Michel, 2011].

III.1.2) Description botanique.

Les espèces de genre *Citrus* sont des arbres ou des arbustes de moins de 4 m à 12 m de haut. Les feuilles sont généralement persistantes sauf chez les hybrides de *Poncirus*, alternes, coriaces, entières ou légèrement dentées, beaucoup portent des épines axillaires, les inflorescences sont des cymes de feuillés. Les fleurs sont généralement à 5 sépales et 5 pétales, elles sont blanches, teintées en pourpre chez les citronniers. Le fruit, très caractéristique est une baie enveloppée d'une écorce parfois très épaisse. La pulpe est formée de « poils » devenant juteux à maturation, souvent plus ou moins acide ou sucrée ou amère (pamplemousse). Ces baies se nomment hespéridés. Les graines sont souvent polyembryoniques. Les feuilles et les fleurs portent des glandes produisant une huile essentielle [Dorji et Yapwattanaphun, 2011].

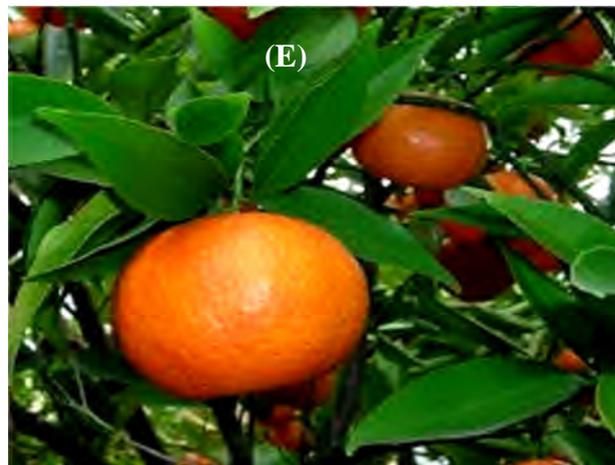
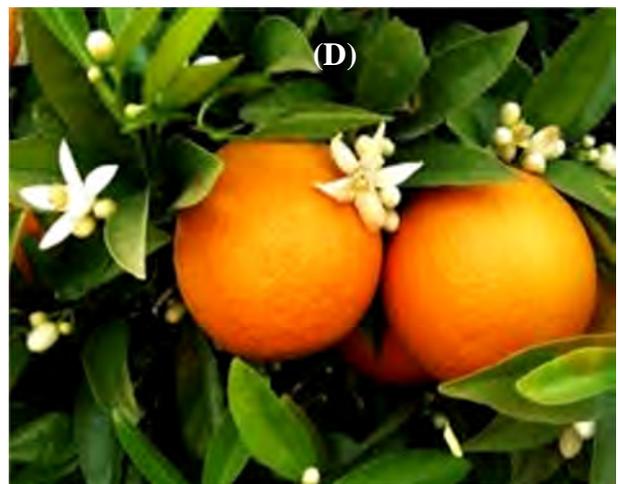


Figure 12: Photographies des différentes espèces de *Citrus*(**A**) *Citrus clementina* ;
(**B**) *Citrus limon* ;(**C**) *Citrus paradisi* ;(**D**) *Citrus sinensis* ;(**E**) *Citrus reticulata*.

III.1.3) Propriétés thérapeutiques des *Citrus*

Les *Citrus* sont utilisés depuis longtemps en médecine traditionnelle pour leurs propriétés thérapeutiques. En médecine arabe classique, les fleurs servent à préparer une huile carminative, alors que les écorces des fruits sont contre les coliques [Djerroumiet Nacef, 2004]. En Europe, les feuilles et les fleurs survenant antispasmodiques, calmantes, toniques, vermifuges, sudorifiques, stomachiques et sédatives. En médecine chinoise les zestes sont préconisés dans les troubles digestifs et les douleurs thoraciques et abdominales et même diurétique [Yu *et al.* ; 2009].

De nombreuses études ont montrés que les espèces de genre *Citrus* sont riches en principes actifs tels que les compose phénoliques et les flavonoïdes, utilisés à des fins thérapeutiques ou dans les domaines cosmétiques ou alimentaires [Kahkonen *et al.*, 1999 ; Shahaib *et al.*, 2011]. Parmi ses propriétés thérapeutiques en trouve : l'effet veinotonique, facilitant la circulation sanguine (flavonoïdes), antispasmodique (extrait d'écorce), hypocholestérolémiant (naringine, hétéroside flavonique), antibactérien (surtout l'huile essentielle), antiviral (flavonoïdes), anti-tumoral (limonène, tangéretine, nobilétine), traitement des insomnies et de la nervosité (feuilles et fleurs) [Macheix *et al.*, 2005 ; Manner *et al.*, 2006 ; Tranchida *et al.*, 2012]. Stimulation de l'appétit (zestes) [Santo *et al.*, 2011 ; Karimi *et al.* , 2012]. Un effet antioxydant et antiradicalaire, antiallergique (flavonoïdes) et antidépresseur (polyphénols) [Li, 2006 ; Khizar *et al.*, 2010].

III.2) Le genre *Pistacia*

III.2.1) Nomenclature et classification

Le genre de *Pistachia* regroupant les arbrisseaux connus sous le nom pistachier. Une étude monographique du genre *Pistachia* a été réalisée par ZOHARY (1954) in KHELIL et KELLAL (1980) montrant qu'il comprend 11 espèces à savoir: *P. atlantica* (Pistachier de l'Atlas), *P. terebinthus* (Thérébinthe), *P. afghanistania*, *P. intergerrima*, *P. lentiscus* (Pistachier lentisque), *P. vera* (Pistachier cultivé), *P. chinensis*, *P. wienmannifolia*, *P. khinjuk*, *P. mexicana*, *P. palestina*.

Le genre *Pistachia* appartient à la famille des *Anacardiaceae*, classe des Magnoliopsida et du règne des planteas [Judd *et al.*, 2002 ; Lieutaghi, 2004 ; Yaaqobi *et al.*, 2009]

III.2.2) Description botanique

Le pistachier est une Arbrisseau dioïque, ligneuse et spontanée pouvant atteindre 20 mètres de hauteur, selon l'espèce, à tronc bien individualisé et à frondaison hémisphérique, le port est arrondi et à ramifications étalées. Le rameau jeune est rougeâtre à feuillage persistantes, caduc, composé, imparipenné (4 à 10folioles ovales acuminées, tomenteuses puis coriaces à l'âge adulte). Les fleurs sont apétales et rougeâtres, en grappes lâches, les fruits gros comme un pois, légèrement ovales pour *pistacia atlantica* [Monjause, 1980 ; Belhadj *et al.*, 2008], petite, subglobuleux, apiculé, rouge, puis noircis à la maturité pour *pistacia lentiscus* [Iserin, 2001, More et White, 2005]. L'écorce est d'abord rougeâtre, puis grisâtre assez claire avant de devenir craquelée et crevassée (rhytidome), se détachant du tronc [Yahya, 1992]. La Figure (13) montre quelques espèces de Pistachier.



Figure 13 : Photos de quelques espèces de pistachier : (A) *P- lentiscus* , (B) *P- atlantica*, (C) *P- thériventus*

III.2.3) Propriétés thérapeutiques

Les espèces du genre *Pistacia* occupent une place appréciable dans la médecine traditionnelle et pharmaceutique depuis l'antiquité. Elles attirent l'attention des chercheurs grâce à ces potentiels antioxydants et ces activités antimicrobienne, anti-inflammatoire, antipyrétique, antidiabétique, antiradicalaire et cytotoxique [Hamdan et Afifi, 2004 ; Topçu *et al.*, 2007; Benhammou *et al.*, 2008]. Elles sont employées dans le traitement d'eczéma, les infections de la gorge, la lithiase rénale, l'asthme, l'estomac et comme un stimulant [Kordali *et al.*, 2003]. *P. atlantica* constitue avec *P. lentiscus* des espèces principales de la production d'oléorésine, qui est produit par l'écorce et exsudé naturellement de façon abondante par temps chaud est utilisée comme antiseptique du système respiratoire [Delazar *et al.*, 2004].

Chez les marocains, la décoction des feuilles est largement employée pour traiter les infections de l'œil [El-Hilaly *et al.*, 2003]. Les fruits trouvent leur application dans la cuisine et les pratiques médicinales Algériennes, les graines sont séchées, écrasées ou moulues et ramassées avec de l'eau sucrée et consommées en boulettes ou bien séchées et croquées telles quelles comme des cacahuètes [Belhadj, 2001].

III.3) Le genre *Ceratonia*

III.3.1) Définition et classification

Le genre *Ceratonia*, originaires du pourtour méditerranéen (îles Canaries, Afrique du nord, Europe méridionale, Proche-Orient), appartient à la famille des Fabacées (sous famille des *Césalpinioïdées*, tribu des *Caesalpinieés*), de la classe des Magnoliopsida et du règne des Plantae. Il ne comporte que deux espèces végétales dicotylédones, l'espèce Cultivée ; *Ceratonia siliqua* et l'espèce sauvage ; *Ceratonia oreothauma* [Tucker, 1992](Figure 14). *Ceratonia siliqua* est le nom scientifique du caroubier, il dérive du grec Keras (corne) et du latin *siliqua* désignant une siliqua ou gousse, faisant allusion à la dureté et à la forme du fruit. Le nom commun serait d'origine hébraïque : karuv [Battle et Tous, 1997].

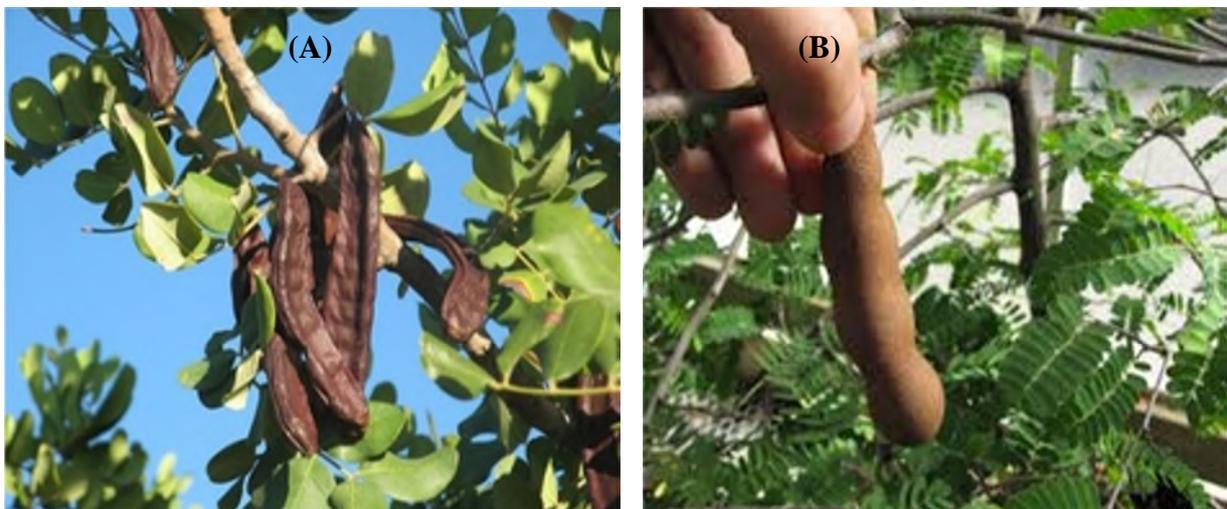


Figure 14 : Photographies des espèces de *Ceratonia* : (A)*Ceratonia siliqua* ;
(B)*Ceratonia oreothauma*.

III.3.2) Description botanique du caroubier

Le caroubier est un arbre ou arbuste sclérophylle qui peut atteindre 7 à 20 m de hauteur et une circonférence à la base du tronc de 2 à 3m. Il a une écorce lisse et grise lorsque la plante est jeune ; brune et rugueuse à l'âge adulte. Son bois de couleur rougeâtre est très dur. Le caroubier peut vivre jusqu'à 200 ans [Ait Chitt *et al.*, 2007]. Le caroubier est une espèce dioïque dont les fleurs sont initialement bisexuelles puis deviennent habituellement unisexuées au cours du développement floral [Thomas et Metha, 1983]. Les feuilles persistantes, de 10 à 20 cm long, se caractérisent par un pétiole sillonné sur la face interne et un rachis portant 8 à 15 folioles, opposées, de 3 à 7 cm, elles sont coriaces, entières, ovales à elliptiques, paripennées, de couleur verte [Ait Chitt *et al.*, 2007]. Les fleurs sont verdâtres, de petite taille (6 à 16 mm de longueur), spiralées et réunies en un grand nombre pour former des grappes droites et axillaires, plus courtes que les feuilles [Batlle et Tous, 1997]. Le fruit est de grande taille : de 10 à 20 cm de longueur, et de 2 à 3 cm de largeur. Il est vert puis brun, au moment de la maturité, brun foncé à noir. Il est sinueux sur les bords, aplati et présente un tissu pulpeux, sucré, rafraîchissant renfermant de 12 à 16 graines brunes [Rejeb, 1995].

III.3.3) Propriétés thérapeutiques

De nombreuses études cliniques ont souligné l'efficacité de la poudre de caroube dans le traitement des diarrhées aiguës infantiles [Se rairi *et al.*, 2000]. Selon Rejeb (1995) la pulpe est recommandée contre la tuberculose pulmonaire et les affections des bronches. Étant riche en composés phénoliques, en sucres, protéines, fibres, potassium et calcium, cette plante est connue en thérapeutique pour son effet hypocholestérolémiant, antiprolifératif, antioxydant, antidiarrhéique et troubles digestifs [Berrougui, 2007]. D'autres études expérimentales ont démontré les capacités bactéricides de la pulpe de caroube vis-à-vis de *staphylococcus aureus* ; la caroube adsorberait aussi les entérotoxines produites par certaines souches bactériennes, ce mécanisme d'adsorption pourrait être expliqué par la présence des tannins dans la partie insoluble et active de la caroube [Tolentino, 1950 ; Sanchez *et al.*, 2010]. La gomme de caroube est extraite de l'albumen des graines de *Ceratonia siliqua* du fait de sa richesse en galactomannanes, cette gomme est utilisée dans l'agro-alimentaire comme épaississant connu sous le code normalisé E410, la confiserie, le secteur cosmétique, pharmaceutique et aussi dans les préparations alimentaires diététiques, pour diminuer l'apport alimentaire dans le traitement de l'obésité ; et en cas d'insuffisance rénale chronique [Avallone *et al.*, 1997 ; Biner *et al.*, 2007].

III.4) Le genre *Crataegus*

III.4.1) Nomenclature et classification

L'aubépine, nom commun de toutes les espèces végétales du genre *Crataegus*, appartient à la famille des rosacées de la classe des Dicotylédones, du règne végétale [Gausсен *et al.*, 1982]. Le nom du genre *Crataegus* du grec kratos (force) et aigon (chèvre), traduit l'idée que les chèvres broutant le feuillage de cette plante acquéraient des forces. Kratos, est une allusion au bois dur de l'aubépine [Farrar, 1996 ; Nicole *et al.*, 2013]. Le nombre d'espèces appartenant au ce genre est difficile à déterminer compte tenu de la facilité avec laquelle les différentes espèces d'aubépines s'hybrident entre elles en générant des variétés polyploïdes.

En Algérie deux espèces d'aubépines sont plus connues, *Crataegus azarolus* (azarolier) et *Crataegus monogyna* (épine blanche) [Quezel P. et Santa S., 1962] (Figure 15).



Figure 15: photographies de deux espèces d'Aubépine (A) *Crataegus monogyna* ; (B) *Crataegus azarolus*

III.4.2) La description botanique

L'aubépine est un petit arbre ou arbuste très épineux. Proliférant dans tout l'hémisphère nord [Kashap *et al.*, 2012 ; Kumaret *et al.*, 2012], pouvant atteindre 5m de hauteur (jusqu'à 10m). les jeunes rameaux sont glabres, les épines (production non détachables des rameaux) acérées sont assez courtes [Nicole *et al.*, 2013]. Les feuilles entières sont petites, ovales et divisées en 3 à 5 lobes qui se rapprochent vers le sommet (connivents). Elle sont incisées-dentées dès la base et les nervures secondaires se courbent vers l'intérieur du limbe. Jeunes, les feuilles sont vertes claires puis deviennent vert foncé et brillantes. A la

base du pétiole il y a deux stipules foliacées [Nicole *et al.*, 2013]. Les fleurs très nombreuses régulières (actinomorphes) apparaissent avant les feuilles, blanches ou rosées possèdent des nectaires très odorantes [Nicole *et al.*, 2013]. Le Fruit, est une petite drupe de la taille d'un gros pois ; la firme est globuleuse-allongée, la couleur jaune ou rouge vif selon les espèces, brillant devient plus sombre et mat à maturité ; il est couronné par les restes des lobes du calice. Les cenelles persistent longtemps sur l'arbre [Nicole *et al.*, 2013].

III.4.3) Propriétés thérapeutiques

L'aubépine a été utilisée dans la médecine traditionnelle comme un remède contre le stress, la nervosité, les troubles du sommeil, les maux d'estomac et de gorge [Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2013]. Les fleurs et les fruits ont été utilisés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chronique, l'hypertension artérielle, l'arythmie, contre les calculs urinaires et biliaires et divers troubles digestifs [Garcia *et al.*, 1997 ; Sparska *et al.*, 1999 ; Barros *et al.*, 2011]. En Europe, les feuilles, les fleurs et les baies d'aubépine combinées ont été traditionnellement utilisées comme astringent, antispasmodique, cardiotonique, diurétique et antiathérosclérotique [Keser *et al.*, 2012]. Les fleurs d'aubépin contiennent de la quercétine qui a des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antiallergiques, ainsi pour traiter les tumeurs et inhiber les enzymes impliqués dans l'activation de nombreux agents cancérigènes [Chwil *et al.*, 2014]. Le fruit de l'aubépine est consommé non seulement à des fins médicinales mais aussi en tant que denrée alimentaire (des conserves de fruits, de la confiture, de la gelée, boisson...ect) [Chang *et al.*, 2002].

III.5) Le genre *Olea*

III.5.1) Nomenclature et Classification

L'olivier appartient au genre *Olea* de la famille des oléacées de la classe végétale Magnoliopsida [Djerroumi et Nacef, 2004]. La famille des oléacées comprend 25 genres, le genre « *Olea* » qui en lui-même composé de 30 espèces [Talantikite, 1988], dont l'*Olea europaea* (olivier) est la seule espèce portant des fruits comestibles dont l'extraction donne une huile végétale comestible [Olias *et al.*, 1993]. En Algérie deux espèces d'olivier sont répandue ; l'espèce cultivée ; *Olea europaea* et l'espèce sauvage ; *Olea olester* [Laurent & Barnouin, 2000] (Figure 16).



Figure 16 : Photographies des deux espèces d'olivier : (A) *Olea europaea* (B) *Olea olester*.

III.5.2) Description botanique

L'olivier est un arbre caractéristique de la région méditerranéenne qui peut vivre plusieurs siècles. Bien qu'il soit trouvé en Mexique, puis en Pérou, en Californie, en Chili et enfin en Argentine [Coutin, 2003], et reste cependant une culture méditerranéenne par excellence [COI, 2006].

C'est un arbre à feuillage qui peut atteindre 15 m de hauteur avec 2 à 4 mètres de circonférence, son tronc est lisse et verdâtre les premières années puis devient noueux, crevassé et prend une teinte gris cendré à noir. Généralement, il ne commence à produire des fruits qu'à l'âge de 7 ans, Sa croissance se poursuit jusqu'à 35 ans et il peut donner des fruits jusqu'à 150 ans [Baudet, 1996]. Les feuilles sont petites, opposé et allongées, persistants, coriace, glauques, vert foncé verni sur la face supérieur et gris-vert argenté sur la face inférieure [Djerroumi et Nacef, 2004]. Les fleurs relativement uniformes, blanches ou jaunâtres et parfumés, sont groupées en panicules axillaires donne un fruit s'appelle l'olive, une drupe charnue, de forme ovoïde, sa couleur varie du vert léger au noir en passant par le rose violacée selon le degré de maturation du fruit [Fedeli, 1997].

III.5.3) Propriétés thérapeutiques

Les feuilles d'olivier sont utilisées pour désinfecter les blessures, abaissement de la tension artérielle et améliorent la circulation sanguine, il a été suggéré qu'un pourcentage accru d'acide oléique membranaire pouvait influencer favorablement sur les transports ioniques au niveau des cellules des endothéliums vasculaires [Jacotot, 1997]. Ils sont capables de

réduire le taux de glucose dans le sang, selon **Garg et ses collaborateurs(1988)**, la substitution des carbohydrates complexes par la matière grasse mono-insaturée de l'huile d'olive, a donné des résultats positifs liés à l'amélioration du contrôle glycémique et au profil lipoprotéique. Le régime à base de l'huile d'olive permet, en fait de diminuer le taux de cholestérol des LDL et une augmentation du cholestérol des HDL. D'autre part, dans une étude épidémiologique évaluant la densité osseuse d'une femme adulte vivant dans le Midi de la France, il a été montré qu'une bonne minéralisation osseuse est associée à l'activité physique et la consommation régulière de l'huile d'olive [**Jacotot, 1997**]. Ainsi elle exerce une action protectrice sur l'appareil digestif, les principaux effets digestifs de l'huile d'olive portent sur le fonctionnement biliaire. Elle est en effet à la fois cholérétique et cholécystokinétique [**Jacotot,1997**].

III.6) Le genre *Quercus*

III.6.1) Nomenclature et Classification botanique

Le genre *Quercus*, du latin *Quercus*, qui proviendrait du celtique "kaerquez", "bel arbre"; appartient à la famille *Fagacéae* de la classe végétale des *Dicotylédones* [**Boudy, 1952**]. Les espèces de ce genre sont connues sous le nom de « chêne ». Les Chêne sont des arbres sur 400 espèces de *Quercus*, on peut citer quatre espèces les plus connues en Algérie, qui sont *Quercus ilex* (Chêne vert) *Quercus suber* (Chêne liège), *Quercus canariensis* (Chêne zen) et *Quercus afarès* (Chêne afarès) [**Djallil, 1994**] (**Figure 17**).

III.6.2) La description botanique

Le chêne est un Arbre à feuillage. Il peut atteindre 50 m de hauteur. Il possède un houppier large et irrégulier et des branches basses puissantes dont l'aspect tortueux est caractéristique en hiver. L'Écorce du chêne est lisse et claire chez l'arbre jeune, elle devient foncée chez l'adulte et se creuse de profonds sillons longitudinaux ; Grise chez le chêne pédonculé et marron chez le chêne rouvre ou sessile et le chêne chevelu [**Gaussen et al., 1982**]. Les feuilles du chêne sont caduques (sauf chez le chêne vert et le chêne-liège) et alternes, elles ont un bord lobé ou profondément denté (chêne vert, chêne-liège, chêne châtaignier) [**Didier,2004**].Les fleurs mâles sont regroupées en chapelets, les fleurs femelles sont isolées ou réunies en petits épis dressés et portent 6 à 8 étamines. Le fruit est un akène, appelé gland, fixé dans sa cupule. Le gland du chêne pédonculé possède un

long pédoncule alors que le gland du chêne sessile possède un pédoncule court [Didier, 2004].

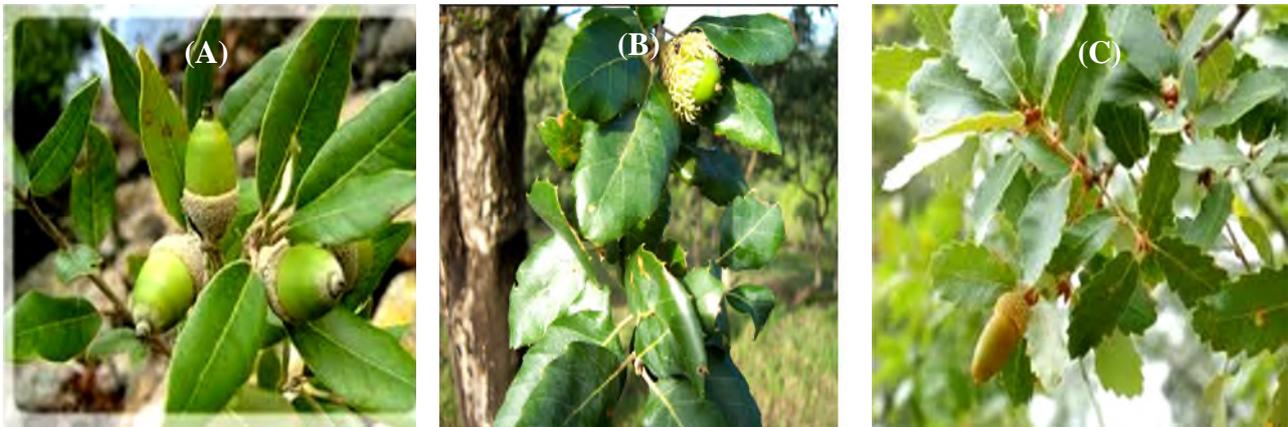


Figure 17 : Quelques photographies de Quercus algériennes : (A) *Quercus suber*, (B) *Quercus ilex* (C) *Quercus canariensis*

III.6.3) Propriétés thérapeutiques

Il existe plusieurs espèces de chêne mais leurs propriétés thérapeutiques sont quasiment identiques. On l'utilisait pour les propriétés astringentes de son écorce, de ses feuilles et de ses glands. En décoction, l'écorce du chêne est employée contre les irritations de la gorge et l'angine. On l'administre en lavement et on l'applique en onguent ou en lotion pour soigner les hémorroïdes, les fissures anales, les petites brûlures et les affections de la peau. On la prescrit moins fréquemment contre la diarrhée, la dysenterie, les varices et les saignements du rectum. L'écorce, en poudre, est inhalée pour traiter les polypes du nez, ou appliquée sur l'eczéma pour assécher la zone atteinte. La galle est très astringente, et peut être utilisée à la place de l'écorce. [Djerroumi et Nacef, 2004]. Les composés phénoliques, tannins et les triterpènes des chênes ont été avérés responsables de beaucoup de prestations maladies, incluant l'activité antibactérienne, antivirale, anti-carcinogène, anti-inflammatoires et antiallergique [Fernandes *et al.*, 2011].

III.7) Le genre *Arbutus*

III.7.1) nomenclature et Classification botanique

Arbutus est un genre de plusieurs plantes à fleurs, de la famille des *Ericaceae*, dans le nom latin *unedo* vient de *un ede* qui signifie «je n'en mange qu'un» [Borgrow *et al.*, 2008],

de la classe de *Magnoliopsida* [Schauenderg et Paris., 2006]. Originaire des régions tempérée chaudes de la Méditerranée, de l'Europe occidentale et de l'Amérique du Nord [Bogrow et al., 2008], *Arbutus unedo* ou Arbousier [Wichtl et Antor, 2003] appelé aussi «arbre à fraise» [Rameau et al., 1989] de la famille des *Ericaceae*.

III.7.2) La description botanique

L'arbousier, est un arbrisseau rameux qui peut atteindre parfois 8 mètres de hauteur et 10 mètres de largeur à tronc brune. Avec l'âge, des plaques d'écorce se détachent. Les jeunes rameaux rougeâtres se dressent puis s'étalent [Goris, 1967]. Ses feuilles sont persistantes, alterne sur les rameaux verts ou roses, ovales à ovoïdes, de 5 à 10 cm de long et de 1.5 à 4 cm de large ; arrondies à l'apex et en coin à la base ; marge bordée de petites dents pointues dirigées vers l'avant ; face supérieure coriace et vert foncé, revers vert clair ; pétiole rose de 0.7 à 1 cm [Schauenderg et Paris., 2006]. Ses fleurs campanulées sont roses ou blanches groupées en petites panicules. Le fruit est rond et rugueux de 1.5 à 2 cm (**Figure 15**), rappelant la fraise [Schauenderg et Paris., 2006].



Figure 18:La photographie des feuilles et des fruits d'*Arbutus*

III.7.3) Propriétés thérapeutiques

L'arbousier a été traditionnellement utiliser comme nourriture, en employant le fruit dans la production des boissons, des confitures et des gelées, et comme phytopharmaceutique

tels que les fruits d'arbousier sont bien connus dans la médecine en tant qu'antiseptique, diurétique et laxatif , tandis que les feuilles sont employées en tant qu'astringent, antidiarrhéique, dépuratoires et plus récemment, dans la thérapie de l'hypertension, du diabète, et des maladies inflammatoires [**Pallauf et al., 2008**].

Des études phytochimiques ont prouvé que les extraits de feuille contiennent plusieurs composés phénoliques, comme les tannins, flavonoïdes, acides phénoliques, vitamines C et E et caroténoïdes, sont connues en tant que très bon source diététique des antioxydants et antibactériennes [**Ivo et al., 2009 ; Djabou et al., 2013**]. Vasorelaxant, natriurique, comme il été employé pour traiter des pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, athérosclérose et thrombose [**Afkir et al., 2008**] et comme un meilleure antiagrégants plaquettaire [**Mohamed et al., 2007**].

Etude expérimentale

Matériel
et
méthode

I) Matériels et méthodes

I.1) Récolte et préparation du matériel végétal

Le matériel végétal que nous avons sélectionné pour étudier l'activité antioxydant et anti-enzymatique est constitué de feuilles de plusieurs arbres de divers genres. Le choix des arbres comme source de substances bioactives a pour but de prouver que ses arbres sont à la fois un produit fini destiné à la consommation (fruits) et une matière première pour l'obtention de substances bioactive à des fins thérapeutiques importantes. La sélection des arbres est basée sur une enquête ethnopharmacologique auprès de la population ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle ; huit variétés appartenant à quatre espèces du genre *Citrus*, trois espèces du genre *Quercus*, Cinq variétés de deux espèces du genre *Olea*, deux espèces de *Pistachier*, une espèce du genre *Arbutus*, une espèce du genre *Ceratonia* avec trois variétés et trois espèces du genre *Crataegus*. L'identification de ces arbres; variétés, espèces et genres ; a été confirmée par Mr Bouadam Said botaniste de la FSNV de l'université de Bejaia. Les feuilles d'arbres cultivés et sauvages sont été récoltées à partir des différentes stations de la région de Bejaia, à savoir : Adekar, Sidi Aich, Amizour, Ighzer Amokran et Timezrit (**Figure 19, Tableau III**) et les récoltes ont été réalisées entre le mois de décembre jusqu'au mois de mars 2013 (**Tableau III**).



Figure 19 : localisation géographique des stations de récolte des feuilles de différentes espèces d'arbres (Google map)

Tableau III: Périodes et coordonnées géographiques des différentes stations de récolte du matériel végétal (*Google map*).

Espèces ou genre d'arbres	Stations	Période de la récolte	Longitude (Ouest)	Latitude (Nord)	Altitude (m)
<i>P. atlantica</i>	AcifElhamam (Adekar, Bejaia)	Mars	4°34'56.23"	36°43'51.38"	836
<i>P. lentiscus</i>	Ikhtaben (Adekar, Bejaia)	Mars	4°39'47.23"	36°45'48.60"	913
<i>Citrus</i>	Timezrith (Sidi Aiche, Bejaia)	Janvier	4°46'29.70"	36°36'54.57"	670
<i>Olea</i>	Ifri(Ouzelaguen , Bejaia)	Décembre	4°33'05.0"	36°33'03.1"	152
<i>Ceratonia</i>	Amizour (Amizour, Bejaia)	Mars	4°54'12.00"	36°38'31.62"	670
<i>Quercus</i>	Akfadou (Sidi Aiche, Bejaia)	Mars	4°37'27.84"	36°37'50.58"	1100
<i>Crataegus</i>	AcifElhamam (Adekar, Bejaia)	Mars	4°34'56.23"	36°43'51.38"	836
<i>Arbutus</i>	Takamera (Adekar, Bejaia)	Mars	4°39'26.30"	36°41'6.23"	1092

Les feuilles récoltées ont été nettoyées de tous les contaminants à l'eau courante, puis séchées à l'étuve à 40°C pendant une semaine jusqu'à la stabilité de leurs poids. La matière sèche obtenue a été ensuite réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique et tamisées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine d'un diamètre $\leq 125 \mu\text{m}$. Les poudres obtenues ont été conservées dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière.

I.2) Extraction et dosage des composés phénoliques

I.2.1) Préparation de l'extrait brut éthanolique

L'extraction des substances actives a été réalisée par technique d'extraction solide /liquide en suivant le protocole décrit par **Benhammou et al, (2008)**.

20g de poudre végétale a été laissée macérer dans un volume de 100 ml d'éthanol absolue pendant 5 jours. Le macérât a été filtré sur papier wattman sous vide. L'évaporation du solvant organique a été réalisé sous haute chimique à température ambiante pendant 10 Jours. L'extrait sec obtenu a été ensuite complètement séché à l'étuve (40°C) pendant 24H.

➤ **Calcul du taux d'extraction**

Le taux d'extraction exprimé en (%) a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [P1 / P0] * 100$$

P1 : poids de l'extrait sec exprimé en gramme.

P0 : poids initial de poudre végétale exprimé en gramme.

I.2.2) Dosage des composés phénoliques totaux

La quantification des composés phénoliques totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique au réactif de Folin-Ciocalteu, décrite par **Singleton et Rossi (1965)** in **Souseket al., (1999)**. Cette méthode est basée sur la réaction d'oxydation des polyphénols par les constituants du réactif de FolinCiocalteu ; acide phosphotungstique (H3 PW12 O40) et d'acide phosphomolybdique (H3PMo12 O40). Ces derniers réduits en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [**Ribereau-Gayon, 1968**] présentent une absorbance maximale à 765nm. La coloration bleue ainsi produite sera proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans l'extrait végétal.

Pour cela, 0.2ml de l'extrait végétal solubilisé dans l'éthanol (1mg/ml) sont bien mélangés avec 1,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 10% et 0,8 ml de solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃ : 75g/ml). Après avoir bien agité, laissés réagir à température ambiante pendant 2h avant de mesurer la DO à 765 nm. Il est à noter qu'un blanc a été préparé en mélangeant 0,2 ml de méthanol avec 1,5ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,8 ml de solution de carbonate de sodium.

➤ **Expression des résultats**

Les taux de composés phénoliques totaux contenus dans les extraits éthanoliques des feuilles de différentes espèces de nos plantes sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage (**Annexe 02**) obtenue à différentes concentrations en acide gallique dans du méthanol suivant

le même protocole de dosage des polyphénols exprimé en mg équivalent d'acide gallique /g d'extrait végétal (mg EQAG/g).

I.2.3) Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode colorimétrique de **Quettier-Deleu et ses collaborateurs (2000)** décrite dans **Djeridane *et al.*, (2006)** dont le principe étant la capacité du groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 des flavonoïdes à se complexer au chlorure d'aluminium par chélation de l'ion Al^{3+} formant ainsi un complexe jaunâtre qui présente un maximum d'absorbance à 488nm (**Figure 20**).

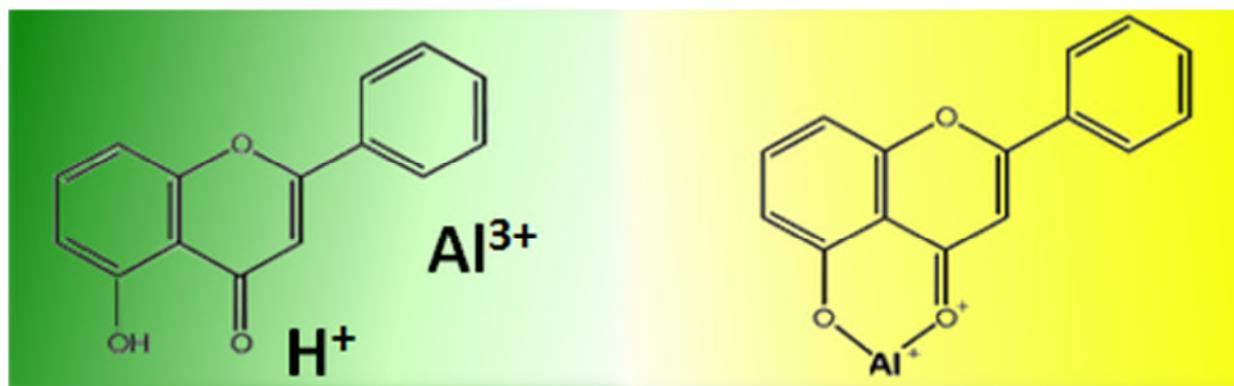


Figure 20 : Mécanisme de l'interaction du chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes [**Ribereau-Gayon, 1968**].

1ml d'extrait végétal (1mg/ml) a été mélangé avec 1ml de Solution méthanolique de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$ à 2%). Après incubation pendant 10 mn à température ambiante, la mesure de l'absorbance a été effectuée à 488 nm. Un blanc a été préparé en mélangeant 1 ml de solution d'extrait avec 1 ml de méthanol pour chaque extrait.

➤ Expression des résultats

La concentration en flavonoïdes contenue dans les différents extraits, est calculée par référence à une courbe d'étalonnage, en utilisant la quercétine comme standard et la concentration a été exprimée en mg équivalent de quercétine /g de matière sèche (**Annexe 02**)

I.2.4) Dosage des tannins totaux

Le dosage des tannins totaux a été effectué selon le protocole d'**Hagerman et Bulter (1978)**. Le principe de ce dosage est basé sur la propriété qu'on les tannins à se complexer et

précipiter les protéines globulaires (BSA), le complexe tannins-BSA formées est déterminé spectrophotométriquement à 510 nm.

500 µl d'extrait végétal solubilisé dans l'éthanol (1mg/ml) ont été mélangés avec 1ml de solution d'albumine sérique bovine (BSA) (1mg/ml) et laisser réagir pendant 24h à 4°C. Le mélange est ensuite centrifugé (4000 rpm / 15min). Le culot récupéré est suspendu dans un mélange contenant 2ml de solution SDS/TEA et 500µl de solution FeCl₃ (0.01M). La DO est mesuré à 510 nm au bout de 15min d'incubation.

➤ **Expression des résultats**

Les concentrations en tannins sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage en utilisant l'acide tannique comme référence (**Annexe 02**) et sont exprimées en milligramme d'équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EQAT/gMS).

I.3) Evaluation des activités des extraits végétaux

I.3.1) Evaluation de l'activité antioxydant

Afin de mettre en évidence l'activité antioxydant des extraits des déférentes plantes, trois tests ont été réalisés : tests de piégeage des radicaux DPPH, ABTS et un de test de Chélation d'ions métalliques.

I.3.1.1) Mesure de l'activité antiradicalaire

➤ **Test du DPPH**

Le protocole de l'activité scavenging du radical DPPH suivi est celui de **Hemalatha et al., (2010)**. La méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH, car un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH- (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) de coloration violette(forme oxydée) pour le stabiliser en DPPH 2,2 Diphenyl-1- picrylhydrazine) de coloration jaune-verdâtre. L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre à 517 nm, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des antioxydants [**Kouamé et al., 2009**].

Une solution de DPPH (0,1 mM) a été préparée dans du méthanol, 0.5 ml de cette solution a été ajouté à 1.5 ml de solution d'extrait à différentes concentrations allant de 1µg/ml jusqu' à

100 µg/ml. Après une incubation de 30 mn à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

Un blanc pour chaque extrait a été préparé en mélangeant 0.5 ml du méthanol avec 1.5 ml de solution d'extrait et le contrôle a été préparé en remplaçant l'extrait par du méthanol. La BHA et l'acide ascorbique ont été utilisés comme standards à différentes concentrations (0,5µg/ml-5µg/ml).

➤ **Expression du résultat**

L'activité anti radicalaire exprimée en pourcentage est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'activité anti-radical DPPH(\%)} = \frac{\text{DO}_{517\text{C}} - (\text{DO}_{517\text{T}} - \text{DO}_{517\text{B}})}{\text{DO}_{517\text{C}}} \times 100.$$

DO_{517C}: absorbance à 517nm du contrôle (solution ne contenant que du DPPH)

DO_{517B}: absorbance à 517nm de l'extrait (solution ne contenant que l'extrait végétale)

DO_{517T}: absorbance à 517nm de l'essai (mélange de solution de DPPH et extrait de plante).

➤ **Test de l'ABTS**

Le test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleue-verte en le transformant en ABTS⁺ incolore par piégeage d'un proton par l'antioxydant. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre [Re et al., 1999].

0,1ml d'extrait végétal (1mg/ml) sont mélangés à 1,9ml d'une solution d'ABTS^{•+} (7mM) préalablement préparée. Après 7 min de réaction, la DO est lue à 734nm contre un blanc dont l'extrait est remplacé par le méthanol.

➤ **Expression des résultats**

L'activité antiradicalaire anti-ABTS^{•+} des extraits de plante est exprimée en TEAC, capacité antioxydant équivalente au trolox, qui correspond à la concentration de trolox donnant la même activité antioxydant d'1ml du composé testé.

II.3.1.2) Mesure du pouvoir de Chélation des ions métalliques ; Test du Fe(II)-Ferrozine

La capacité chélatrice des extraits végétales est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après incubation des échantillons avec le fer divalent selon la méthode de **Le et ses collaborateurs (2007)**.

La ferrozine se complexe spécifiquement avec l'ion bivalent Fe^{2+} pour produire un complexe Fe(II)-Ferrozine stable de couleur violet avec un maximum d'absorbance à 562 nm. En présence d'un agent chélateur la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine est inhibé ce qui conduit à une diminution ou disparition de la couleur violette. (**Hazra et al., 2008**).

Un volume de 100 μ l d'extrait ou de standard (EDTA) (100 μ g/ml) a été mélangé avec 200 μ l de $FeCl_2$ (0,2mM) et 500 μ l d'eau distillée. Après agitation, 200 μ l de ferrozine (5mM) ont été ajoutés, suivis d'une agitation et incubation pendant 10mn. La mesure de l'absorbance a été réalisée à 562nm. Il est à noter qu'un blanc général a été préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol et un blanc pour chaque extrait, en ajoutant à ce dernier de l'eau distillée.

➤ Expression des résultats

Le taux de chélation du fer par l'extrait végétal est calculé par la relation suivante :

$$\% \text{ de Chélation} = \frac{\text{Abs}_{562}\text{C} - (\text{Abs}_{562}\text{T} - \text{Abs}_{562}\text{E})}{\text{Abs}_{562}\text{C}} \times 100$$

Abs₅₆₂C: Absorbance à 562nm du mélange Ferrozine/Fe(II)

Abs₅₆₂T: Absorbance à 562nm du mélange Ferrozine/Fe(II) /extrait de plante.

Abs₅₆₂ E : est l'absorbance du blanc de l'extrait (extrait + eau distillée)

I.3.2) Evaluation de l'activité antityrosinase des extraits de plantes

I.3.2.1) Matériel biologique

Le champignon de couche *Agaricus bisporus* ou champignon de Paris a été utilisé comme source de la tyrosinase. Le champignon doit être blanc, frais, jeune et petit si possible (**Figure 21**).



Figure 21 : Champignon de paris *Agaricus bisporus*.

I.3.2.2) Préparation de l'Extrait brut enzymatique

L'extrait tyrosinase du champignon de Paris « *Agaricus bisporus* » a été obtenu selon le protocole décrit par **Janovitz- Klappet *al.* (1989)**.

100 g de champignon sont lavés abondamment à l'eau distillés afin d'éliminer de tous contaminants, ils sont découpés et broyés à l'aide d'un mixeur électrique dans 100 ml de tampon phosphate (0.05 M, PH 7.0) préalablement refroidi à 4 °C, la suspension est centrifugée à 15000 tours à 4°C pendant 30 min. Le surnagent obtenu est filtré sur papier wattman N°1 afin d'éliminer toutes particules solides restantes, ce filtrat est homogénéisé et conservé dans le congélateur dans des aliquotes de 2 ml.

I.3.2.3) Mesure de l'activité de la tyrosinase

L'activité tyrosinase est déterminée spectrophotométriquement utilisant la L-tyrosine comme substrat. En présence de l'enzyme la L-tyrosine est oxydée en o-quinone, un composé qui présente une absorbance maximale à 475 nm [**Espin *et al.*, 1995**].

L'activité tyrosinase a été mesurée en absence et en présence d'extrait végétal selon le protocole de **Vanni *et al* (1990)** in **Zong-Ping *et al* (2008)**.

Dans des conditions de température ambiante, 1ml de L-tyrosine (3mM) a été mélangé avec 100µl de tampon phosphate (0.05 M, pH7) contenant 1% de DMSO et 100µl d'extrait

enzymatique d'*Agaricus bisporus*. La variation de l'absorbance a été suivie pendant 10min à 475 nm.

NB :

- Pour l'activité antityrosinase on a remplacé le tampon phosphate (0.05 M, pH 7) à 1 % DMSO par nos extraits de plantes diluer dans le même tampon à 1 % DMSO.
- La solution de L-tyrosine a été préparée dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 7.

Expression des résultats

- L'activité enzymatique de la tyrosinase est le résultat de la variation de l'absorbance pendant un laps de temps (ΔDO (nm) / Δ temps (min)).
- Le pourcentage d'inhibition par l'extrait phénolique est calculé selon la formule donnée par **Zong-Ping et al., (2008)**.

$$\% \text{ d'inhibition (\%)} = \frac{\text{Abs}_{475} \text{ A} - \text{Abs}_{475} \text{ B}}{\text{Abs}_{475} \text{ A}} \times 100$$

A = Activité tyrosinase en $DO_{475\text{nm}}$ / min mesurée en absence d'extrait végétal.

B = Activité tyrosinase en $DO_{475\text{nm}}$ / min mesurée en présence d'extrait végétal.

La concentration inhibitrice à 50% (IC50) qui correspond à la concentration d'extrait végétal nécessaire pour réduire 50% de l'activité enzymatique de la tyrosinase est déterminée graphiquement à partir de la variation du taux d'inhibition de la tyrosinase en fonction de la concentration de l'extrait végétal.

I.3.3) Traitement statistique

Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous forme : moyenne \pm écartype. Des comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel Statistica. Les différences ont été considérées comme étant significatives à $\alpha = 0,05$. Les valeurs des IC50 été calculées en utilisant le logiciel Origin 9, L'analyse des données des régressions linéaires et des régressions non linéaires a été fait par l'utilisation des programmes suivants : Excel® (Microsoft Excel 2007), Sigma Plot 2012 (Systat Software, Inc., Windows Version 12.0,12.0).

Résultats
et
Discussions

II) Résultats et discussion

II.1) Rendement d'extraction

Le taux d'extrait brut obtenu par macération dans l'éthanol des feuilles des différentes plantes étudiées variées entre 7,25% et 25,7% (**Tableau IV**). Ces extraits sont enrichis en composés bioactifs polaires. En raison de sa polarité, l'éthanol est le solvant d'extraction par excellence pour ces composés, comme il est moins altérant que le méthanol, qui peut exercer un effet méthanolyse sur les tannins [Bruneton, 1999 ; Mueller-Harvey, 2001].

Tableau IV: Rendement en extraits bruts éthanoliques de feuilles plantes étudiées.

Genre	Espèce	Variété	Rendement %
<i>Citrus</i>	<i>C. sinensis</i>	Thomson	8.16
		Tardive	8.88
		Sanguinelli	8.48
		Double Fine	8.56
	<i>C. reticulata</i>	Clémentine	7.84
		Wilking	7.68
	<i>C. limon</i>	Citron	8.44
<i>C. aurantiifolia</i>	Lime	7.56	
<i>Quercus</i>	<i>Q. canariensis</i>		12.12
	<i>Q. Ilex</i>		13.8
	<i>Q. suber</i>		12.72
<i>Olea</i>	<i>O. europaea</i>	Chemlal	21.32
		Azeradj	20.16
		Amalo	22.84
		Avonakar	18.84
	<i>O. olester</i>	Sauvage	21.88
<i>Pistachier</i>	<i>P. lentiscus</i>		21.40
	<i>P. atlantica</i>		20.12
<i>Arbutus</i>	<i>A. unedo</i>		25.72
<i>Ceratonia</i>	<i>C. siliqua</i>	Lahlou	12.4
		Tounsi	13
		Kechkache	13.60
<i>Crataegus</i>	<i>C. azarolus</i>		22.36
	<i>C. monogyna</i>		27.2
	<i>C. azarolus-monogyna</i>		16.4

Selon les résultats obtenus, les genres *Arbutus*, *Crataegus*, *Olea* et *Pistacia* présentent aucune différence significative ($p < 0,05$) en terme de taux d'extraction, comme elles enregistrent les taux les plus élevés de l'ordre de 32,15 %, 27,48 %, 26,26% et 25,95 % respectivement où *C. monogyna* est l'espèce qui présente le meilleur rendement d'extraction de l'ordre de 27,2 %. D'autres rendements plus au moins considérables ont été observés dans les extraits du genre *Ceratonia* (16,25%) et *Quercus* (16,1%). Les *Citrus*, restent le genre le plus faible en termes de taux d'extraction ($\approx 8\%$).

Il est difficile de faire une comparaisons de nos résultats avec les données bibliographiques en terme de taux d'extraction, sachant que elles varient en fonction de plusieurs paramètres qui influencent sur les taux d'extractions pour la même espèce végétale, t'elle que la température, la méthode d'extraction utilisée, la granulométrie de la poudre, le temps de macération, ainsi que les solvants employés et leur degré de pureté [Nacz et Shahidi, 2004 ; Hayat *et al.*, 2009]. Les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique), abiotiques (facteurs édaphiques) [Ksouriet *al.*, 2008] et le type du microclimat [Atmaniet *al.*, 2009].

II.2) Teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins

II.2.1) Résultats

Les taux en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins dans les extraits éthanolique déterminés par méthodes colorimétriques spécifiques et exprimés respectivement en mg équivalent d'acide gallique (mg EqAG), de Quercitain (mgEqQ) et acide tannique (mgEqAT) par g de la matière sèche (**Tableau V**) montrent que les feuilles des différentes espèces de plantes sélectionnées renferment des quantités non négligeables en substances actives polyphénoliques, avec une différence importante entre les différents genres de plantes étudiées.

Les résultats obtenus montrent généralement, que les taux de polyphénols totaux varient significativement entre les genres de différentes plantes ($P < 0,05$) et ne présentent aucune différence significative ($P < 0,05$) entre les espèces du même genre. Les feuilles des genres *Arbutus* et *Pistacia* sont les plus riches en polyphénols totaux avec des teneurs de $129,84 \pm 3,42$ mg EqAG/ g MS, $129,71 \pm 2,31$ mg EqAG/ g MS et $98,44 \pm 3,39$ mg EqAG/ g MS pour *P. atlantica*, *A. unedo* et *P. lentiscus* respectivement, tandis que les espèces du genre *Citrus* révèlent les teneurs les plus faibles allant jusqu'à $09,43 \pm 0,08$ mg EqAG/ g MS (variété lime de l'espèce *Citrus aurantiifolia*). Les feuilles des genres *Quercus* et *Ceratonia* présentent des teneurs significativement similaires ($P < 0,05$) mais des variations

importantes ($P < 0,05$) ont été observées entre les espèces du même genre (**Tableau V**). Une différence significativement importante ($P < 0,05$) a été marquée entre ces deux derniers genres et le genre d'*Olea* et entre les deux espèces de *Crataegus* ; *C. azarolus* (85.49 ± 0.79 mg EAG/ g MS) et *C. monogyna* (82.24 ± 1.86 mg EAG/ g MS) et l'espèce issue de leur croisement ; l'hybride *C. azarolus-monogyna* (40.94 ± 0.61 mg EAG/ g MS).

Tableau V : Teneurs en phénols totaux, tannins et flavonoïdes des feuilles de différentes espèces étudiées.

Genre	Espèce (Variété)	Phénols totaux (mg EqAG/g MS)	Flavonoïdes (mg EqQ/g MS)	Tannins (mgEqAT/g MS)
<i>Citrus</i>	<i>C. sinensis</i> (Thomson)	09.55 ± 0.09	04.61 ± 0.19	02.16 ± 0.12
	<i>C. sinensis</i> (Tardive)	11.20 ± 0.07	03.31 ± 0.06	02.30 ± 0.07
	<i>C. sinensis</i> (Sanguinelli)	10.23 ± 0.12	01.97 ± 0.48	02.17 ± 0.18
	<i>C. sinensis</i> (Double fine)	09.67 ± 0.44	03.63 ± 0.07	02.66 ± 0.09
	<i>C. reticulata</i> (Clémentine)	10.11 ± 0.13	02.60 ± 0.13	02.74 ± 0.02
	<i>C. reticulata</i> (wilking)	10.09 ± 0.07	02.90 ± 0.07	01.46 ± 0.06
	<i>C. limon</i> (citron)	13.45 ± 0.09	03.06 ± 0.01	04.04 ± 0.09
	<i>C. aurantiifolia</i> (lime)	09.43 ± 0.08	02.71 ± 0.15	03.51 ± 0.031
<i>Quercus</i>	<i>Q. canariensis.</i>	39.12 ± 0.70	5.84 ± 0.27	08.71 ± 0.08
	<i>Q. Ilex .</i>	48.62 ± 0.03	07.06 ± 0.27	08.87 ± 0.09
	<i>Q. suber .</i>	65.97 ± 0.74	05.99 ± 0.19	07.91 ± 0.09
<i>Olea</i>	<i>O. europaea</i> (Chemlal)	35.94 ± 1.16	09.37 ± 0.31	04.20 ± 0.13
	<i>O. europaea</i> (Azeradj)	33.01 ± 0.43	08.07 ± 0.21	02.43 ± 0.09
	<i>O. europaea</i> (Amalo)	43.20 ± 0.57	09.44 ± 0.19	04.82 ± 0.18
	<i>O. europaea</i> (Avonakar)	30.75 ± 0.41	08.50 ± 0.04	02.43 ± 0.24
	<i>O. olester</i>	34.44 ± 1.22	12.04 ± 0.32	03.27 ± 0.17
<i>Pistachier</i>	<i>P. lentiscus.</i>	98.44 ± 3.39	10.32 ± 0.25	14.45 ± 0.19
	<i>P. atlantica.</i>	129.84 ± 3.42	10.86 ± 0.19	07.43 ± 0.26
<i>Arbutus</i>	<i>A. unedo.</i>	129.71 ± 2.31	14.11 ± 0.27	13.21 ± 0.14
<i>Ceratonia</i>	<i>C. siliqua</i> (Lahlou)	46.85 ± 0.94	13.28 ± 0.06	04.02 ± 0.13
	<i>C. siliqua</i> (Tounsi)	67.86 ± 1.75	09.23 ± 0.08	03.05 ± 0.13
	<i>C. siliqua</i> (Kachkache)	58.72 ± 1.36	07.29 ± 0.06	04.59 ± 0.14
<i>Crataegus</i>	<i>C. azarolus.</i>	85.49 ± 0.79	19.92 ± 0.39	05.32 ± 0.17
	<i>C. monogyna.</i>	82.24 ± 1.86	17.71 ± 0.46	04.85 ± 0.12
	<i>C. azarolus - monoguna</i>	40.94 ± 0.61	10.89 ± 0.32	04.42 ± 0.13

Les teneurs en flavonoïdes et en tannins enregistrées montrent également des différences significativement importantes entre les différentes espèces étudiées. L'espèce *C. azarolus* présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes (19.92 ± 0.39 mg EqQ/ g MS), suivie par *C. monogyna* (17.71 ± 0.46 mg EqQ/ g MS) et *Arbutus unedo* (14.11 ± 0.27 mg EqQ/ g MS). La variété Sanguinelli de l'espèce *Citrus sinensis* révèle la teneur la plus faible en flavonoïdes (01.97 ± 0.48 mg EQ/ g MS). Des similarités ($P < 0,05$) importantes ont été observées entre quelques groupes d'espèces telles que *O. olester*, *P. atlantia*, *P. lentiscus* et l'hybride *C. azarolus – monogyna* et entre les espèces du genre *Quercus*, *C. siliqua* et *O. europaea* qui présentent les mêmes teneurs en flavonoïde. Les espèces *A. unido* et *P. lentiscus* sont les plus riches en tannins avec des taux de $13,21 \pm 0.14$ mg EqAT/ g MS et $14,25. \pm 0.19$ mg EqAT/ g MS respectivement, suivi par les espèces de genre *Quercus* et *P. atlantica*. Les feuilles des espèces des genres *Citrus*, *Olea*, *Ceratonia* et *Crataegus* ne présente aucune différence significatives en terme de concentration en tannins avec les taux les plus faibles (≤ 5 mg EqAT/ g MS) (**Tableau V**).

Pour déterminer le type majoritaire de polyphénols (flavonoïdes, tannins ou autre) présenté dans les feuilles des différentes espèces végétales étudiées, on a calculé les fractions en polyphénols de type flavonoïdes (F/PT), tannins (T/PT) et flavonoïdes-tannins (F+T/PT). Les résultats obtenus (**Figure 22**) montrent que les taux des polyphénols en flavonoïdes et en tannins sont inférieurs à 50% quelque soit l'espèce caractérisée. Ce qui signifie, que les extraits éthanoliques des feuilles de différentes espèces végétales contiennent en plus des flavonoïdes et des tannins, d'autres polyphénols polaires comme les acides phénoliques et aussi des substances apparentées à l'acide gallique.

Selon la nature de polyphénols (tannins ou flavonoïdes) extrait par l'éthanol à partir des feuilles, les espèces végétales étudiées seront classées en trois groupes :

✓ Le groupe à polyphénols de type flavonoïde majoritaire (F/PT > T/PT) regroupe les genres *Olea*, *Ceratonia*, *Crataegus* et *Citrus* (excepté de l'espèce *C. Limon* et les variétés *sanguinelli* et *clémentine* des espèces *C. sinensis* et *C. reticulata*). Le genre *Citrus* porte le taux le plus élevé en (F/T) avec un rapport de 30,07%, suivi par les genres *Olea* et *Crataegus* dont les taux sont de 26,99%, 23,81% respectivement ;

✓ Le groupe à polyphénols de type tannins majoritaire (F/PT < T/PT) regroupe les espèces du genre *Quercus*, certaines espèces et variétés de genres *Citrus* et le genre *Pistacia*; *C. limon* et *C. sinensis* variété *Sanguinelli* et *P. lentiscus*). Le taux des tannins dans ces espèces peuvent atteindre jusqu'à 30 à 40%, c'est ce qui a été remarqué chez les variétés *Lime*

et Citron de l'espèce *C. limon* avec des taux de 30% et 37,20% respectivement ;

✓ Le groupe contenant même taux de polyphénols de type tannin-flavonoïde (F/PT≈T/PT). Dans ce groupe, l'espèce *A. unedo* et l'espèce *C. reticulata*, variété *Clémentine*.

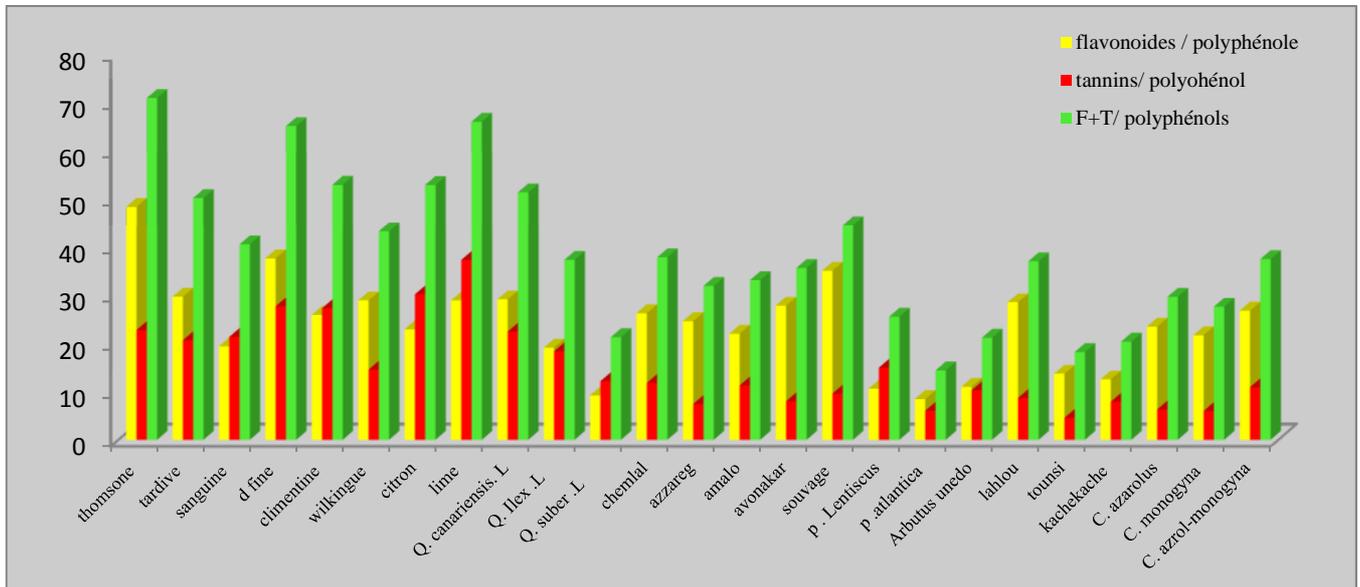


Figure 22 : Représentation graphique des Taux de flavonoïdes (F), tannins(T) et flavonoïdes-tannin (F+T) par rapport aux polyphénols totaux (PT) des feuilles de différentes plantes étudiées.

II.2.2) Discussion générale

Si on compare les résultats du dosage des polyphénols avec ceux de la bibliographie, on constate que la richesse des *Pistachiers* en polyphénols avec l'*Arbutus unedo* a été confirmée par certains auteurs. Les feuilles de *P. lentiscus* sont plus riches en phénols totaux ($136.25 \pm 18.9 \text{ mg EC/g d'extract}$) et en tannins (909.4 ± 42.61 équivalent d'acide tannique/ g d'extract) et similaire en flavonoïdes ($12.93 \pm 1.69 \text{ mg équivalent de quercétine/g d'extract}$) [Atmaniet al.,2009] de *P. lentiscus* où nous enregistrons des teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins de l'ordre de 98.44 ± 3.39 , 10.32 ± 0.25 et 14.45 ± 0.19 respectivement, et inférieur à celle trouvée par [Belyakoubi, 2011] de *P. atlantica* avec une concentration de polyphénols ($285.956 \pm 10.257 \text{ mg EAG/g MS}$) mais similaire en flavonoïde ($12.44 \pm 0.256 \text{ mg EC/g MS}$) et supérieur en tannins ($3.066 \pm 0.151 \text{ mg EC/g MS}$). D'autres travaux réalisés par Goli et al (2005) ont montré que la teneur la plus élevée des phénols totaux chez *P. vera* est de l'ordre de $34.7 \text{ mg équivalent d'acide tannique/g MS}$ quelle est supérieur à nos résultats. Chez les fruits de *P. terebinthus*, Topçu et ces collègues (2007) ont montré la variation des teneurs en polyphénols par rapport à la polarité du solvant d'extraction, qui sont de l'ordre de 61.05 et $122.78 \text{ } \mu\text{g équivalent de pyrocatechol/ mg d'extract}$ dans les extraits acétonique et méthanolique respectivement. Alors que, les teneurs

en flavonoïdes sont de l'ordre de 5.49 et 22.60 μg équivalent de Quercitaine /mg d'extrait dans les deux extraits.

Les résultats d'**Ivo et ses collaborateurs (2009)** sur les extraits méthanoliques des feuilles d'*Arbutus unedo* montrent des concentrations plus élevées en polyphénols (149.28 ± 5.33 mg EAG/g d'extrait) par rapport à nos résultats (129.71 ± 2.31 mg EAG/g MS). Les travaux de **Pallauf et ses collaborateur (2007)** sur les extraits méthanoliques des fruits d'*Arbutus unedo* soulèvent des teneurs plus élevées en tannins (27.46 ± 0.989 GEAT/g MS) mais inférieures en flavonoïdes (6.45 ± 0.856 g EQ/g MS) par comparaison à nos résultats. **Mendes et ses collaborateurs (2011)** constatant une grande différence dans la concentration en polyphénols entre les feuilles (170.3 ± 5.33 mg EAG /g d'extrait) et les fruits ($16.7 \pm$ mg EAG/g d'extrait). **Djabouet al (2013)** montrent que les racines d'*Arbutus unedo* sont riches en flavonoïdes (26.30 mg EQ/g MS).

La comparaison des résultats des dosages des polyphénols des *Citrus* avec les travaux de **Li et ses collaborateurs (2006)** qui ont étudié plusieurs variétés de *Citrus* et qui ont montré des teneurs de 1.2 ± 11.89 mg EAG/ g d'écorce sec de la mandarine et 1.61 ± 17.36 mg EAG/g d'écorce sec de limon, ces valeurs sont totalement inférieures à celles de nos résultats, mais une grande similarité a été observé avec les teneurs de **Kammoun et ses collaborateurs (2012)** sur quelque espèces de *C. senensis*. Une étude faite par **Menichini et al (2011)** sur les fleurs, les feuilles et les fruits de *Citrus media* montre une teneur de 4.016 ± 5.1 mg/ g MS dans les feuilles, cette teneur est presque similaire à celles obtenues par nos extraits. Une autre étude réalisée par **Ghasemi et al (2009)** sur l'écorce et les tissus de 13 variétés de *Citrus* exhibe des valeurs variant de 104.2 ; 161.17 et 172.1 mg EAG/ g MS d'écorce selon les variétés de *Citrus*, ces résultats sont largement supérieurs à ceux de nos extraits. Nos résultats sont proportionnelles à ceux trouvés par **Dahmoune et al (2013)** sur les extraits éthanoliques de *Citrus limon* avec une concentration 12.11 ± 1.12 mg EAG/g MS et un peu plus inférieur à ceux trouvés par **Lagha et Madani (2013)** pour les polyphénols mais supérieur pour les flavonoïde sur les extraits méthanoliques de quelques variétés de *Citrus* algérienne de l'ordre de 13.36 ± 0.89 mg EAG/ g MS et 0.36 ± 0.01 mg EQ/g MS pour la variété double fine , 19.59 ± 0.59 mg EAG/ g MS et 2.67 ± 0.05 mg EQ/g MS pour la variété Thomson et $15,89 \pm 1.09$ mg EAG/ g MS et 2.06 ± 0.003 mg EQ/g MS pour la variété Sanguelli de polyphénols et de flavonoïdes respectivement .

Pour le genre *Crataegus*, dans une étude réalisée par **Hamoudi et Zourane, (2012)** sur les feuilles de l'aubépine en utilisant le méthanol (50%) comme solvant d'extraction , la

teneur en polyphénol est de 26,002 g EAG/100 g cette teneur est largement inférieure par rapport à nos résultats (82.24 ± 1.86 mg EAG/g), mais beaucoup plus supérieure à celle trouvée par [Mario *et al.*, 2010], soit 1.99 g EAG/100g, réalisée sur une espèce des Rosacées (*Fragaria chiloensis* spp), ceci pourrait être due à la méthode utilisée par l'auteur (fractionnement) ou au diamètre des particules (supérieur à 250 μ m) ainsi qu'à la pureté de solvant. Dans une autre étude réalisée par [Kumaret *al.*, 2009] sur trois espèces de la famille des Rosacées (*Rosa brunonii*, *Rosa bourboniana*, *Rosa damascena*) les teneurs en polyphénols sont de l'ordre de 25,4 ; 17.8 ; 14.5 g EAG/ 100 g de poids frais respectivement, utilisant le méthanol comme solvant d'extraction sont aussi inférieurs à nos résultats. Ce qui nous a permis de déduire que l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

Lorsqu'on compare les résultats de dosage des polyphénols de feuilles de *Ceratonia siliqua* avec les résultats d'étude d'Avallone *et al.*, (1997) (1,9mg/g de MS) sur la pulpe de même espèce et Papagiannopoulos *et al.*, (2004) (4,142mg/g MS), ces résultats sont largement inférieurs aux nôtres (57.819mg/g de MS). Une autre étude a été réalisée par Abi Azar (2007) sur les gousses de caroube vertes et qui ont montré que ces dernières contenaient 45,2 g/l de polyphénols totaux, cette valeur est proportionnelle à celle obtenue par nos extraits. En effet, Joslyn *et al.*, (1968) constatent par extraction à l'eau chaude et au méthanol que les gousses vertes contiennent beaucoup plus de polyphénols totaux que les gousses mûres (67 mg/g de matière sèche pour les gousses mûres et 204,3 mg/g de matière sèche pour les gousses vertes). Les teneurs en polyphénols (1625 mg EAG/100g MS) et flavonoïdes (292 mgEQ/100g MS) qui ont été trouvés par Benchikh et Louailéche, (2014) sur la pulpe de *Ceratonia siliqua* sont beaucoup plus inférieures à celles de nos extraits (46.85mg EAG/g MS de polyphénols et de 13.28mg EQ/ g MS de flavonoïdes).

La mise en évidence des composés phénoliques dans les feuilles de différentes espèces de *Quercus* s'accorde avec les données de la bibliographie. Les teneurs enregistrées varient de 39.12 à 65.97 mg EAG/g MS pour les espèces de genre *Quercus*. Ces valeurs s'intègrent dans l'intervalle des données rapportées par Karioti, (2010) ; Boubaker *et al.* (2004) et Custodio (2013) (12,31 mg EAG/g MS à 91.6 mg EC/g MS), il n'y a pas de nombreuses études réalisées sur la composition phytochimique des *Quercus*, en effet le peu d'études réalisées montrent que les espèces du genre *Quercus* sont riches en tannins [Fernandes *et al.*, 2011 ; Velez Marquesa et Pereirab, 2012]. Les résultats d'analyses quantitatives de Karioti et ses collaborateurs (2010) sur les extraits méthanoliques de

Quercus ilex montrent que cette espèce présente une source importante des flavonoïdes glycosylés est surtout en Kampferol (1.22%) qui a été trouvé avec des quantités minimales chez d'autres plantes (0.5%). **Boubaker et al. (2004)** indiquent que les teneurs en polyphénols totaux solubles d'extrait de feuilles de *Quercus suber* (12,31%) présentent des teneurs supérieures à celles de nos données analytiques sur les feuilles de *Quercus suber*.

Plusieurs études se sont intéressées à la quantification des polyphénols dans les extraits de feuilles d'olive. **Faten et al., (2013)** ont réalisé des dosages quantitatifs de l'extrait méthanolique des feuilles de l'olivier de la variété chemlal en Tunisie, ils ont montré que la teneur en polyphénols totaux des feuilles de chemlal est de l'ordre de 219,85 dans le mois d'octobre à 464,27 mg/100 g MS au janvier. Or, notre récolte qui a été effectuée en mois de décembre sur des feuilles de l'olivier de la même variété montre des concentrations en polyphénols beaucoup plus importantes (35.94 ± 1.16 mg EAG/g MS). Ce qui confirme que le maximum des polyphénols totaux a été obtenu dans la phase terminale de la croissance des feuilles c'est-à-dire le mois de décembre, montrant ainsi la richesse de notre variété en polyphénols totaux. Concernant les flavonoïdes, les mêmes auteurs ont obtenu les résultats suivants pour la variété chemlal : 98,40 (octobre) à 377,06 mg CEQ/100 g MS (janvier) elles sont inférieures à nos résultats avec la teneur de 09.37 ± 0.31 mg EQ/g MS. Les résultats de dosage des phénols totaux par **Boudhrioua et al., (2008)** sont l'ordre de 1.40 g EAG/100 g MS 2.32 ± 0.11 et 2.01 ± 0.16 g EAG /100 g MS pour les variétés chemlal, chetoui et azzarag respectivement qui sont un peu plus proches de nos résultats.

Les écarts trouvés entre les résultats obtenus et les données de la bibliographie sont tout à fait justifiés. En effet, les conditions d'extraction, l'état et l'origine de l'échantillon en terme de provenance géographique, saison de collecte et cultivar, les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et le type du microclimat [**Ranalli et al., 2006 ; Falleh et al., 2007 ; Li et al., 2009 ; Atmani et al., 2009**]. Ainsi la diversité structurale des composés phénoliques conduit à la variabilité des propriétés physico-chimiques, la différence des standards utilisés, les méthodes de conservation et d'exposition des plantes à la lumière peuvent affecter la teneur en composés phénoliques [**Escribano-Baillon et al., 2001; Santos-Buelga et al., 2003 ; Tawaha et al., 2007**].

II.3) Activité antioxydant des extraits éthanoliques

L'évaluation de l'activité antioxydant des extraits éthanoliques des feuilles des différentes plantes étudiées a été effectuée par trois tests ; le test DPPH et le test ABTS, pour déterminer le pouvoir antiradicalaire de ces extraits en mesurant leurs capacités à neutraliser ou à piéger les radicaux libres DPPH et ABTS et le test de chélation de fer pour déterminer la capacité des extraits à former des complexes avec les métaux par inhibition du cycle redox du métal, en formant des complexes métalliques insolubles, inhibant ainsi le développement de la réaction d'oxydation avancée (sous le nom ; la réaction de fenton) qui aboutisse à la formation du radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$.

Les résultats obtenus (**Tableaux VI**), où l'efficacité de l'activité antiradicalaire est exprimée en concentration d'extrait végétal capable de piéger 50% du radical libre DPPH ou ABTS (IC50) et où le pouvoir de chélation des métaux est exprimé en % de fer chélaté par 100 μg d'extrait, montrent que tous les extraits testés présentent un pouvoir chélateur des métaux et une activité antiradicalaire dont l'efficacité dépendent de l'espèce à partir de laquelle l'extrait a été réalisé.

II.3.1) Activité antiradicalaire

➤ *Activité scavenger du radical DPPH*

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydant [Suhaj, 2006 ; Mohsen et Ammar, 2009 ; Wang *et al.*, 2009]. La méthode est basée sur la capacité des composés antioxydants à agir en tant que piègeurs de ce radical en donnant un atome d'hydrogène H sur le DPPH alors transformé en une molécule stable DPPHH [Confortietal.,2008 ; Sharma et Bhat, 2009; Popovicietal., 2010].

Pour la mise en évidence du pouvoir antiradicalaire de nos extraits par le radical DPPH on a réalisé un premier test à une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour tous les extraits. On a constaté des pourcentages d'inhibition importants pour toutes les plantes. L'analyse statistique des résultats obtenus a montré une simple différence significative ($P < 0,05$), dans les meilleurs rapports, ont été constatés chez les espèces *Crataegus azarolus*, *Pistacia atlantica*, *Arbutus unedo*, *Crataegus monogyna*, *Ceratonia siliqua*, *P. lentiscus*, *C. azarolus-monogyna*, *Citrus limon* et les espèces de genres *Quercus* qui présentent des rapports $\geq 90\%$ selon les espèces. Les espèces du genre *Olea* et *Citrus* présentent les plus faibles activités par rapport aux autres genres.

Tableau VI: Résultats du pouvoir antioxydant des extraits éthanoliques des feuilles de différentes espèces étudiées.

Genre	Espèce (Variété)	EC50 (µg/ml) DPPH	EC50 (µg/ml) ABTS	% de Chélation fer (100µg/ml)
<i>Citrus</i>	<i>C. sinensis</i> (Thomson)	26.83 ± 1.17	896.27 ± 1.01	85.5 ± 3.40
	<i>C. sinensis</i> (Tardive)	19.83 ± 1.20	627.32 ± 0.68	73.47 ± 3.39
	<i>C. sinensis</i> (Sanguinelli)	48.57 ± 0.71	588.95 ± 1.09	85.01 ± 6.79
	<i>C. sinensis</i> (Double fine)	33.78 ± 1.11	690.35 ± 0.81	67.84 ± 3.40
	<i>C. reticulate</i> (Clémentine)	21.79 ± 21.79	487.42 ± 1.26	92.54 ± 4.75
	<i>C. reticulate</i> (wilking)	52.53 ± 0.57	526.66 ± 1.42	86.80 ± 6.79
	<i>C. limon</i> (citron)	08.08 ± 0.89	168.83 ± 1.08	84.31 ± 3.40
	<i>C. aurantiifolia</i> (lime)	20.02 ± 0.68	239.10 ± 0.90	73.33 ± 4.07
<i>Quercus</i>	<i>Q. canariensis</i> .	13.87 ± 0.44	89.94 ± 0.77	68.62 ± 1.35
	<i>Q. Ilex</i>	02.66 ± 0.59	47.31 ± 0.80	65.50 ± 2.03
	<i>Q. suber</i>	15.37 ± 0.72	50.94 ± 1.16	64.70 ± 4.75
<i>Olea L</i>	<i>O. europaea</i> (Chemlal)	10.79 ± 1.03	155.89 ± 0.76	76.86 ± 5.43
	<i>O. europaea</i> (Azeradj)	21.11 ± 2.74	122.03 ± 1.13	78.82 ± 6.11
	<i>O. europaea</i> (Amalo)	21.75 ± 0.65	179.37 ± 1.35	76.07 ± 1.35
	<i>O. europaea</i> (Avonakar)	16.07 ± 0.75	167.09 ± 0.88	74.07 ± 1.37
	<i>O. olester</i>	19.11 ± 0.60	105.7 ± 0.77	80.78 ± 3.39
<i>Pistachier</i>	<i>P. lentiscus</i>	05.14 ± 0.78	34.52 ± 0.27	75.68 ± 4.07
	<i>P. atlantica</i>	01.21 ± 0.77	08.25 ± 0.70	76.86 ± 6.11
<i>Arbutus</i>	<i>A. unedo</i>	09.05 ± 0.60	47.71 ± 0.48	70.19 ± 7.47
<i>Ceratonia</i>	<i>C. siliqua</i> (Lahlou)	15.01 ± 0.39	46.49 ± 1.34	86.27 ± 2.71
	<i>C. siliqua</i> (Tounsi)	06.33 ± 0.78	22.6 ± 0.87	71.37 ± 2.71
	<i>C. siliqua</i> (Kachkache)	03.22 ± 0.52	68.71 ± 0.48	79.21 ± 0.67
<i>crataegus</i>	<i>C. azarolus</i>	02.45 ± 1.02	125.34 ± 0.67	72.15 ± 1.35
	<i>C. monogyna</i>	07.37 ± 0.80	120.97 ± 2.13	77.25 ± 1.35
	<i>C. azarolus - monoguna</i>	10.42 ± 0.71	127.38 ± 0.53	65.09 ± 3.39

Pour se renseigner sur la puissance antiradicalaire de nos extraits contre le radicale DPPH, nous avons testé une gamme de concentrations qui correspond à chaque plante. On a remarqué expérimentalement, lorsqu'on additionne un volume défini de l'extrait phénolique à un volume déterminé de la solution DPPH[•], quel que soit la plante d'origine, l'absorbance du mélange réactionnel diminue et devient stable dans lapse de temps court, ainsi la solution change de couleur instantanément du violé sombre au jaune pâle en fonction des concentrations, suivi par une augmentation dans le pourcentage d'inhibition. L'activité antioxydant de nos extraits exprimée en IC50 (**Tableau XI**) a été déterminée graphiquement (**Figure 23**). Elle est définie comme étant la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire ou inhiber 50% du radicale DPPH en solution.

À des fins comparatives, deux antioxydants standards sont utilisés; l'acide ascorbique et la BHA. Ils ont montré une activité antiradicalaire très puissante avec des IC50 de l'ordre de 1.76 µg/ml et 2.16 µg/ml respectivement, la valeur d'IC50 de l'acide ascorbique est proche à celle retrouvée par les chercheurs **Rached et ses collaborateurs (2010)**.

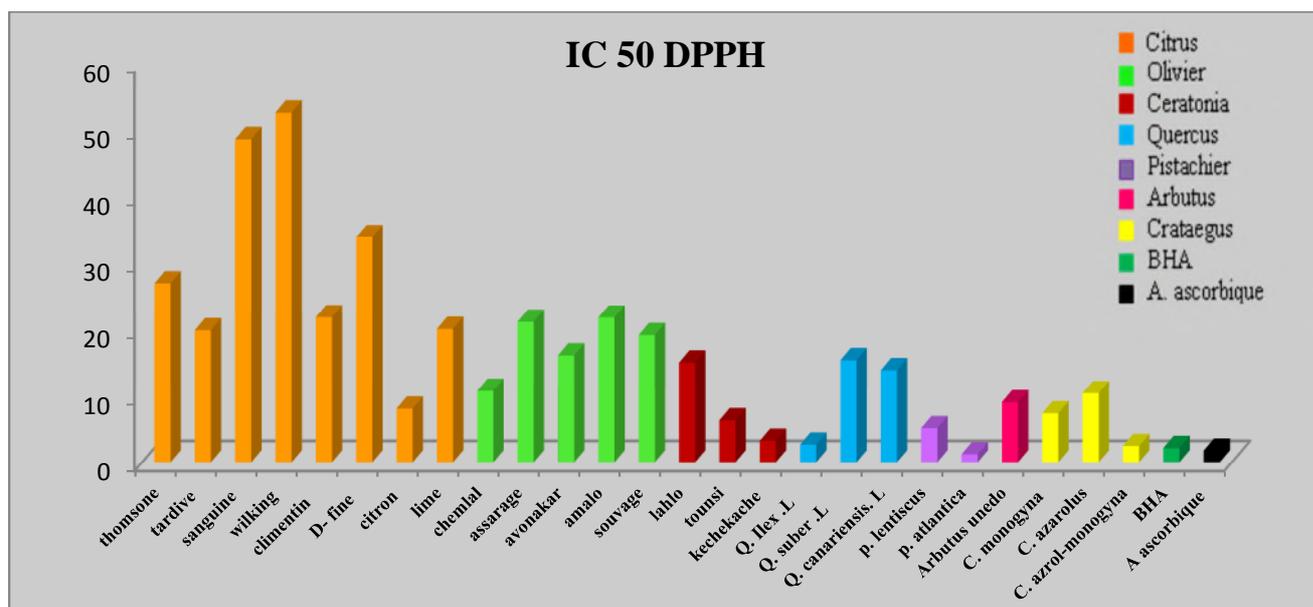


Figure 23 : Les concentrations efficaces à piégé 50% (EC50) du radical DPPH par les extraits de plantes étudiés et les antioxydants de référence.

Malgré la puissante activité antiradicalaire de nos extraits contre le radicale DPPH, elle reste toujours moins active que les standards à l'exception de *P. atlantica* qui présente une activité considérablement importante presque comparable à celle de l'acide ascorbique.

Les résultats obtenus montrent que les différents extraits des plantes sélectionnées ont des activités antiradicalaires dont les concentrations inhibitrices (IC₅₀) sont de l'ordre de 1 µg/ml à 55 µg/ml. L'analyse statistique des concentrations inhibitrices à 50% (IC₅₀) des plantes étudiées contre le radical DPPH, montre des différences significativement importantes ($P < 0,05$). Dans les plus efficaces *P. atlantica* (01.21 ± 0.77 µg/ml), *C. Azarolus* (02.45 ± 1.02 µg/ml), *Q. ilex* (02.66 ± 0.59 µg/ml), *C. siliqua* (Kachkache) (03.22 ± 0.52 µg/ml). Les efficacités antiradicalaire de ces espèces sont très proche à celles de l'acide ascorbique (IC₅₀ = 1.76 µg/ml) et de la BHA (IC₅₀=2.16 µg/ml). *P. lentiscus*, *A. unedo*, *C. monogyna*, *C. siliqua*, les espèces des genres *Quercus* et *Olea* exerçant un pouvoir similaire ($P < 0,05$) avec des concentrations considérablement importantes. Le genre *Citrus* présente les IC₅₀ les plus élevées, ce qui signifie une faible activité antiradicalaire à l'exception de la variété *Citron* de l'espèce *Citrus limon* qui marque une activité très importante (IC₅₀ = 08.08 ± 0.89 µg/ml).

➤ *Activité scavenger du radical ABTS*

Afin de valider l'efficacité antioxydant de nos extraits obtenue contre le radical DPPH, nous avons utilisées un 2^{iem} test basé sur la capacité de piégeage du proton du radical cationique ABTS [Van-denBerget *al.*, 2000]. L'efficacité des extraits de plantes à piéger le radical ABTS, mesuré à la concentration 100 µg/ml pour chaque extrait, montré que tous les extraits présentent une activité antiradicalaire contre le radical ABTS, mais cette activité antiradicalaire reste inférieure à celle exprimée par le standard (trolox = 89,09%). Les pourcentages d'inhibition du radical ABTS à la concentration 100 µg/ml varient entre 18.20 à 75.31% avec des différences significativement importantes ($P < 0,05$) entre les différentes plantes étudiées.

Les résultats d'études des concentrations inhibitrices à 50 % (IC₅₀) contre le radical ABTS montrent des différences significatives ($P < 0,05$) varient selon le genre et l'espèce végétale dans une gamme de 1 µg/ml à 1mg/ml (Tableaux VI). Selon ces résultats, les espèces du genre *Pistacia*, les deux variétés *tounsi* et *lahlou* de l'espèce *C. siliqua*, *Q. ilex* et *A. unedo* présentent des IC₅₀ meilleurs que celle de standard contre le radical ABTS, il s'est avéré clairement que *P. atlantica* est l'espèce qu'exerce le meilleur pouvoir antiradicalaire contre le radical ABTS avec IC₅₀ = 08.25 µg/ml dont l'efficacité est six fois plus élevée que le trolox (un analogue soluble de la vitamine E, puissant antioxydant) (IC₅₀ = 52,87 µg/ml), suivi par les espèces *Q. canariensis*, les espèces du genre *Olea* et *Crataegus* dans les IC₅₀ varient dans une gamme de concertation de [89.94-156 µg/ml] qui ne présentent aucune

différence significative ($P < 0,05$). Les espèces qu'exercent la plus faible activité antiradicalaire contre ce radical est les espèces de *C. sinensis* et *C. reticulata* qui présentent des IC50 variées dans la gamme [0,59-0,90 mg/ml]. Au sein du même genre et/ou espèces des différences significativement importantes ($P < 0,05$) ont été constatées pour les variétés *C. siliqua*, les espèces de genre *Quercus* et surtout avec les variétés de genre *Citrus*.

À des fins comparatives par rapport à des antioxydants naturels (comme δ -tocophérol, flavonoïdes, caroténoïdes et acide ascorbique) [Mouret *et al.*, 2001], ou de synthèse (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène (BHT); le 3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole (BHA), de l'efficacité des extraits de plantes à piéger le radical ABTS est évaluée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) qui correspond à la concentration de Trolox (en μM ou mM) produisant le même effet de réduction d'ABTS⁺ dans un g de matière sèche à partir de laquelle l'extrait a été obtenu.

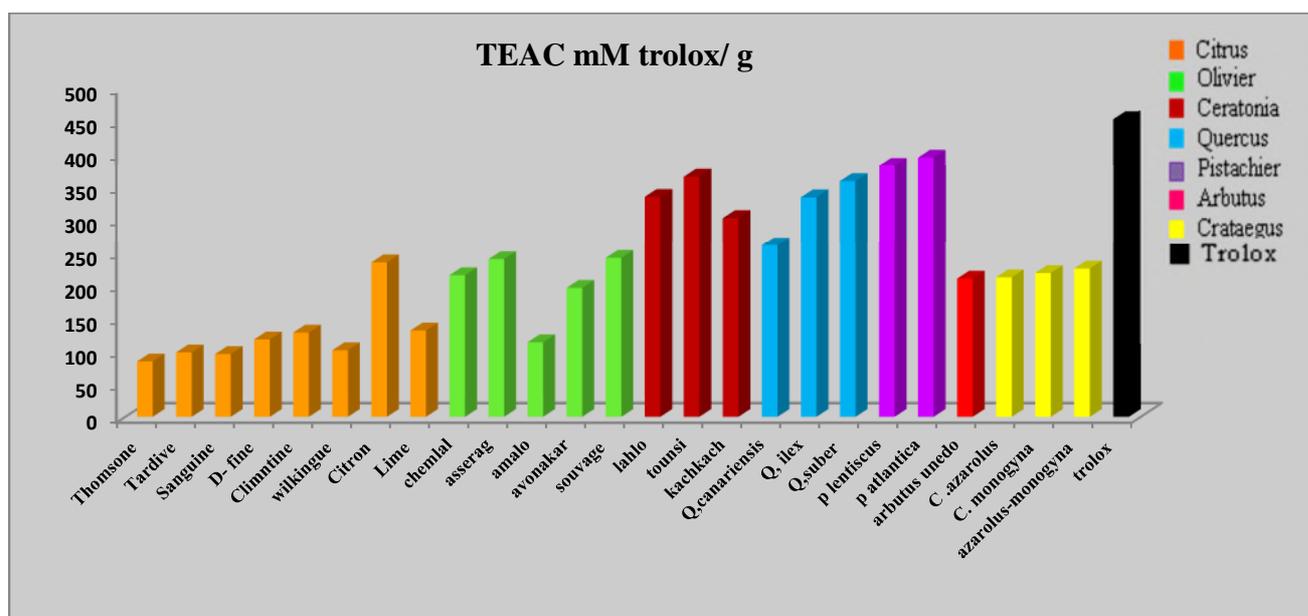


Figure 24 : Effet scavenger vis-à-vis le radical ABTS des extraits éthanolique des feuilles des différentes plantes exprimé en μmol de trolox /g MS

Les valeurs de TEAC pour nos extraits varient entre 84.74 ± 1.17 et 394.55 ± 0.98 μmol de trolox /g MS avec des différences significatives importantes ($P < 0,05$). Les activités scavenger du radical ABTS de nos extraits sont plus faibles que ceux obtenus pour des antioxydants de référence telle que l'acide caféique, acide gallique, quercitrine, rutine, BHA, BHT et TBHQ qui présentent des valeurs de TEAC comprise entre 2.56 et 22.3 mM trolox/ g [Olszewska *et al.*, 2012]. Plus la valeur de TEAC est grand plus l'antioxydant est puissant

[Djeridane *et al.*, 2006], ce qui nous permis de déduire que les feuilles des citrus présentent les plus faibles activités antiradicalaires avec des efficacités au voisinage de 100 µmol de trolox /g MS(Figure 24).

II.3.2) Pouvoir chélateur de fer

L'activité chélatrice des métaux est très importante du fait qu'elle réduit la concentration des métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxy et alcoxy qui peuvent à leur tour entretenir la réaction de peroxydation lipidique [Elmastas *et al.*, 2006].

Le pourcentage de chélation du fer des différents extraits de nos plantes à 100 µg/ml sont présentés dans la Figure (25).

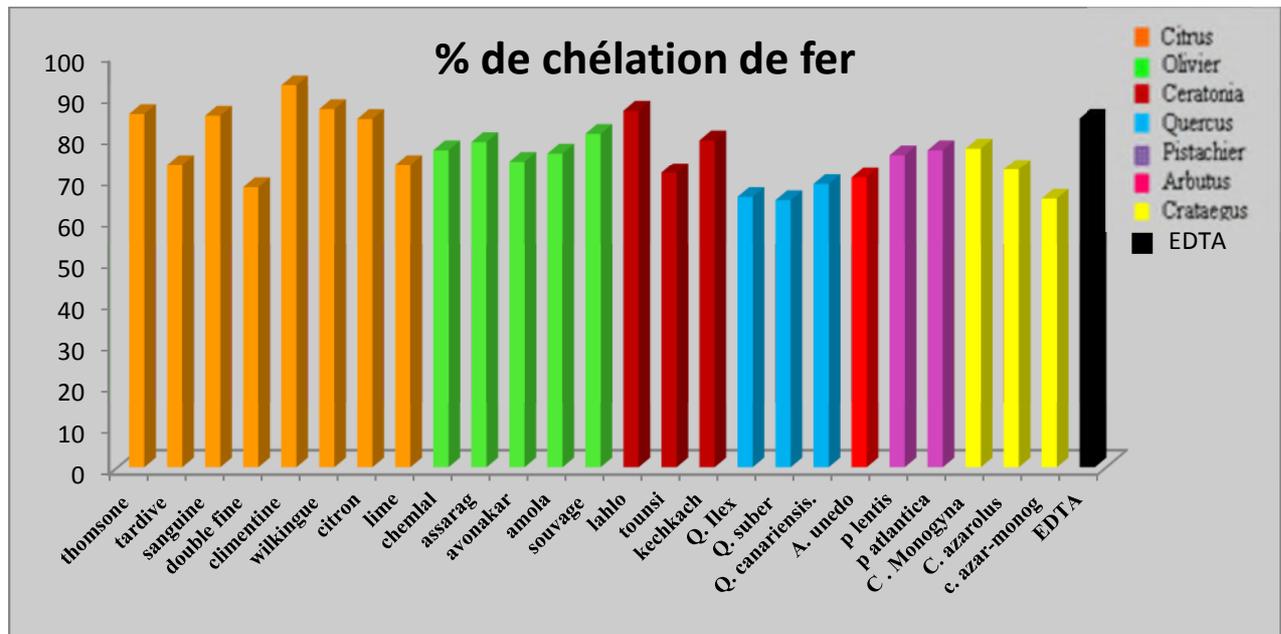


Figure 25 : Pourcentages de chélation du fer par les extraits de feuilles de différentes plantes étudiées.

Une vue générale de la représentation graphique, nous permet de constater que nos extraits de plantes ont une très forte activité chélatrice du fer (64.70 à 92.54%) comparativement au standard utilisé, l'EDTA qui est connu pour sa forte activité chélatrice des métaux avec un pourcentage de chélation de fer (84,42% ± 1,74 %) à la concertation de 100 µg/ ml.

Les résultats d'étude statistique des pourcentages de chélation de fer de nos extraits présentent une simple différence significative (P < 0,05) dans les meilleurs rapports, sont

enregistrés pour les espèces du genre *Citrus*, qui aller jusqu'à 92.54 ± 4.75 avec la variété *Clémentine*, à l'exception de la variété *Double fine* qui présente un faible pourcentage de chélation de l'ordre de $67.84 \pm 3.40\%$, suivi par la variété *Lahlou* de l'espèce *Ceratonia siliqua* par un rapport important ($86.27 \pm 2.71\%$).

La majorité d'espèces restantes varient dans une même gamme de chélation [70,19-80,78 %] qui ne présente aucune différence significative ($P < 0,05$) à l'exception des espèces du genre *Quercus*, qui présentent les plus faibles rapports avec l'hybride *C. azarolus-monogyna* de genre *Crataegus*.

En sein du même genre et/ou des espèces, on trouve des différences significatives importantes, c'est ce qui a été observé avec les espèces du genre *Citrus* avec la variété *Clémentine* (92.54 ± 4.75 %) de l'espèce *Citrus. Reticulata* et la variété *Double fine* de *Citrus sinensis*, ainsi les espèces du genre *Crataegus* et les variétés de *Ceratonia siliqua* quelles soulèvent des différences significatives importantes ($P < 0,05$). Les espèces d'*Olea* et *Ceratonia siliqua* présentent des différences considérablement importantes avec les espèces *C. azarolus* et *C. monogyna* avec des rapports variés dans la même gamme [71.37 ± 2.71 - $86.27 \pm$ %] qui ne présentent aucune différence significative ($P < 0,05$).

II.3.3) Analyse de corrélations entre les polyphénols et les activitésantioxydants

II.3.3.1) Corrélations entre les teneurs en polyphénols et l'activité scavenger du radical DPPH•

Nous avons voulu établir une corrélation entre l'efficacité antiradicalaire pour le radical DPPH et les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes et tannins des différents extraits de plantes. Les résultats obtenus (**Figure 26**), montrent la présence d'une corrélation linéaire entre les phénols totaux et le pouvoir antiradicalaire contre le radical DPPH ($R = 0.619$). Les deux familles de composés phénoliques, flavonoïdes et tannins interviennent d'une façon comparable (flavonoïdes $R = 0.565$, tannins $R = 0.525$) dans le bailliage de ce radical, ce qui nous permis de déduire un effet synergique entre ces deux composés (56.6% de cette réduction est liée aux flavonoïdes et 52.5% et due aux tannins) ce qui explique la puissance activité antiradicalaire de nos extraits contre le radical DPPH.

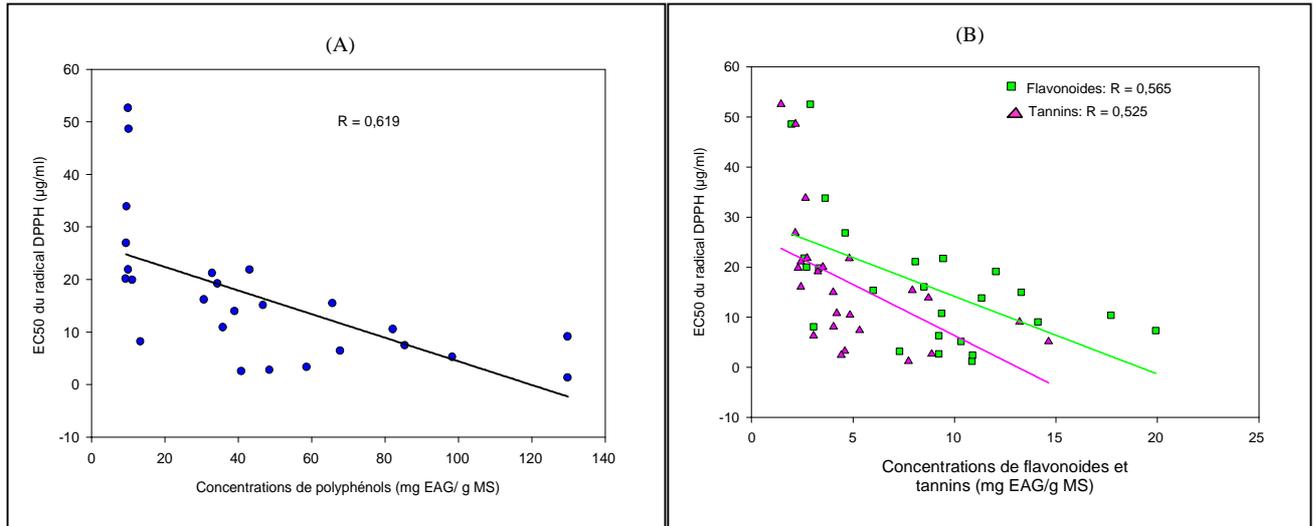


Figure 26: Relation entre la capacité antioxydant anti- radical DPPH et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B).

II.3.3.2) Corrélations entre les teneurs en polyphénols et l'activité scavenger du radical ABTS

En établissant la relation entre les teneurs en phénols totaux, flavonoïdes, tannins et la capacité antioxydant contre le radical ABTS des différents extraits des plante étudiées (**Figure 27**), on constate qu'il y a une bonne corrélation entre les teneurs en phénols totaux et la capacité antioxydant $R = 0,662$, une moyenne avec les tannins ($R = 0,568$) et un peu plus faible avec les flavonoïdes ($R = 0,444$).

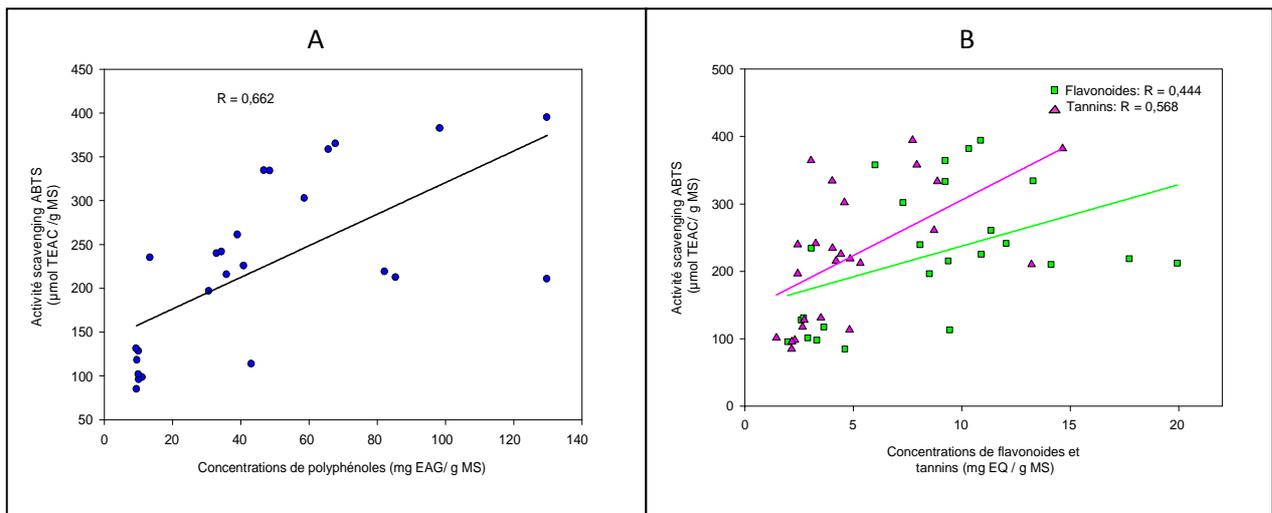


Figure 27: Relation entre la capacité antioxydant contre le radical ABTS et les teneurs en phénols totaux (A), flavonoïdes et les tannins (B).

II.3.3.3) Corrélations entre les teneurs en polyphénols et le taux de chélation de

Fer

Dans le but d'établir la relation entre la chélation de fer et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins, la **Figure 28 (A,B)** illustre le pourcentage de chélation de fer en fonction des teneurs.

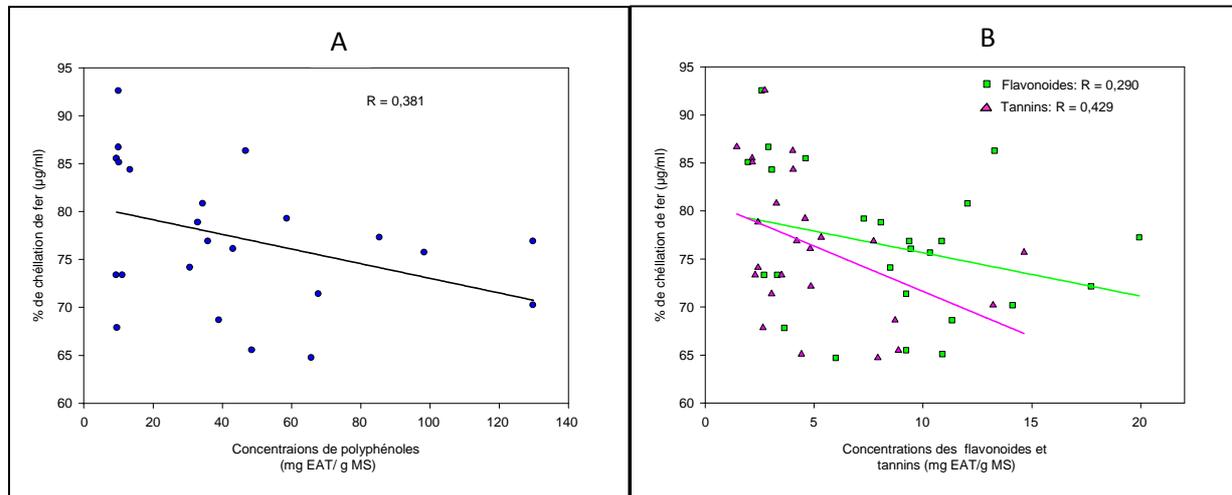


Figure 28: la corrélation entre la chélation de fer et les teneurs en phénols totaux (A) flavonoïdes et les tannins (B).

Nous remarquons une très faible corrélation entre les pourcentages de chélation du fer et les teneurs en polyphénols $R = 0.381$, et en flavonoïdes $R = 0.290$ et une corrélation moyenne avec les tannins $R = 0.429$ par rapport aux autres composés.

II.3.4) Discussion générale de l'activité antioxydant

Les polyphénols constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales, exerçant de multiples activités biologiques telle que l'activité antioxydant, cette activité attribuée en partie à la capacité de ces composés à réduire les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{HO}\cdot$) et superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) mais aussi à leur affinité pour une grande variété de protéines dont certaines enzymes par la chélation des métaux qui les constituent [Ba et al., 2009].

Le radical DPPH est généralement l'un des composés le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydant et la majorité des travaux antérieurs pour confirmer la puissance antioxydant des plantes a été réalisé contre ce radical, en raison de sa stabilité en forme radicale et leur simplicité de l'analyse [Bozin et al., 2008].

La forte activité antioxydant des *Pistachier* a été auparavant confirmée par plusieurs auteurs, qui dû aux composés phénoliques présents dans les différents organes de *Pistachier*, qui sont connus comme substances antioxydants ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène [Kelly *et al.*, 2002]. En effet les extraits éthanoliques de *P. atlantica* révèlent une forte activité à piéger les radicaux DPPH ($IC_{50} = 01.21 \pm 0.77 \mu\text{g/ml}$) et d'ABTS ($IC_{50} = 08.25 \pm 0.70 \mu\text{g/ml}$) avec *P. lentiscus* (DPPH ($IC_{50} = 05.14 \pm 0.78 \mu\text{g/ml}$) et ABTS ($IC_{50} = 34.52 \pm 0.27 \mu\text{g/ml}$), cette forte activité a été confirmé par Benhammou *et al.*, (2008) sur les extraits éthanoliques des feuilles de *P. atlantica* avec ($IC_{50} = 27.76 \text{ mg/ g DPPH}$) et *P. lentiscus* ($IC_{50} = 90.87 \text{ mg/ g DPPH}$), les travaux de Hatammnia et ses collaborateurs (2014) sur les graines de *P. lentiscus* contre le radical DPPH ($IC_{50} = 1.90 \text{ mg/ml}$), Belyagoubi (2011) (IC_{50} de DPPH est de l'ordre 47.40 mg/ g) sur les feuilles de *P. atlantica*, Atmani et ses collaborateurs (2009) sur les extraits aqueux de *P. lentiscus* avec une ($IC_{50} = 4,24 \mu\text{g/ml}$). Tous ses travaux confirment la forte activité antiradicalaire des pistachiers qui a été expliqué par l'effet inductif des trois groupes hydroxyles de l'acide gallique et ses dérivés et aussi à la présence de l'acide ρ -coumarique [Sanchez-Moreno *et al.*, 1998; Benhammou *et al.*, 2008]. Luigia et ses collaborateurs (2008) ont montré que les (anthocyanines) présentent dans les fruits de *Pistacia lentiscus* piègent à 92 % le radical DPPH pour une concentration de 0,005 mg/ml. La présence de l' α -tocophérol (0,005308 %) dans les feuilles de *Pistacia lentiscus*, explique la forte activité antioxydant de ses extraits [Kivaçak et Akay, 2005]. Bhourri et ses collaborateurs (2010) notent que l'acide digallique, isolé de l'extrait aqueux des fruits de *P. lentiscus*, a une activité potentielle vis-à-vis du radical ABTS+ pour une concentration de 0,15 et 0,2 mg/ml. Ceci peut être expliqué par le fait que la molécule de l'acide digallique qui est un flavonoïde riche en groupements hydroxyles. De plus, les anthocyanines et les tannins présentes dans les fruits de *Pistacia lentiscus* ont déjà prouvé leurs pouvoir chélateur envers les métaux, et leurs effets protecteurs contre la peroxydation est lié à la capacité de fixer le fer [Ilhamiet *et al.*, 2005]. D'autres travaux ont montré que l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide férulique et la catéchine possèdent de forte corrélation positive entre les activités du piégeage des radicaux (DPPH, ABTS+). En plus, l'acide gallique et la catéchine sont étroitement corrélés à l'activité de chélation des métaux et à l'inhibition de la peroxydation lipidique [Tsai *et al.*, 2007 ; Wissem *et al.*, 2008].

La puissance du pouvoir antioxydant d'*Arbutus unedo* a été constatée par plusieurs auteurs, en effet, les études phytochimiques sont prouvé que les extraits de feuilles d'*Arbutus*

unedo contiennent plusieurs antioxydants comme les tannins, les flavonoïdes, les caroténoïdes, les anthocyanes, l'acide gallique et ses dérivés, la vitamine C, la vitamine E aussi bien α -tocopherol qui sont des substances connues par ses fortes activités antioxydants [Kivcak et Mert, 2001 ; Males et al., 2006; Fiorentino et al., 2007]. Les travaux d'études Malheiro et al (2011) sur le pouvoir antioxydant d'*Arbutus unedo* montre des fortes activités avec des concentrations de l'ordre de microgramme [Malheiro et al., 2011] mais elles restent toujours inférieures à celles enregistrées dans ce présent travail. Les résultats d'Ivo et ses collaborateurs (2009) du balayage radical DPPH montrent des IC₅₀ importantes avec les extraits éthanoliques de feuille d'*Arbutus unedo* qui sont de l'ordre IC₅₀ = 63,2 μ g/mL mais elle est inférieure à nos résultats (IC₅₀ = 09.05 \pm 0.60 μ g/ml). Dans une autre étude préliminaire réalisée par Pabuccuoğlu et al., (2003) sur l'activité antioxydante contre le radical ABTS montre une forte activité, mais elle reste toujours inférieure à nos résultats.

Les résultats obtenus concernant l'IC₅₀ des feuilles de genre *Ceratonia* se rapprochent de ceux de Ben Hsouna et al., (1986) qui a travaillé sur la caroube de Tunisie avec un IC₅₀ de 0,033mg/ml, par contre Kumazawa et al. (2002) a trouvé que l'IC₅₀ de l'extrait phénolique de la caroube est de 0,25 mg/ml ce qui reste très faible par rapport à nos résultats. Selon Makris et Kefalas (2004), cette importante activité antioxydante des extraits phénoliques de la caroube est due à leur forte teneur en flavonoïdes particulièrement les pranthocyanidines et l'acide gallique qui présentent une très forte chélation de fer [Klenow et Gleis, 2009].

La présence des antioxydants, dans les échantillons de différentes espèces de genre *Crataegus* nous permet d'enregistrer une très forte activité antioxydante avec tous les différents tests réalisés. Le test antiradicalaire avec le DPPH montre des IC₅₀ variées entre 02.45 \pm 1.02 à 10.42 \pm 0.71 μ g/ml, ces résultats sont beaucoup plus supérieures à ceux trouvés par [Yoo et al., 2008] qui ont travaillé sur les extraits éthanoliques des feuilles de *Crataegus pinnatifida* qui présentent des pourcentages d'inhibition inférieurs au *Crataegus* étudiées avec un rapport de 84.5% à la concentration de 0.88 mg/ml, sachant que ce pourcentage a été constaté à une concentration de 75 à 100 μ g/ml pour nos extraits selon les espèces de *Crataegus*. Une étude réalisée par Bernatoniené et al., (2008) sur les fruits *Crataegus monogyna* a révélé que les extraits éthanoliques (200 mg de fruit coupé en petits morceaux dans 1ml de l'éthanol 70%) présentent une forte activité à piéger le radical DPPH (54%) alors que les extraits à l'eau distillée (200 mg de fruit coupé en petits morceaux dans 1ml d'eau distillée) ont une faible activité antiradicalaire (24%). Ces concentrations sont faibles par rapport à celles trouvées avec nos extraits, les écarts observés entre nos résultats et ceux des auteurs sont probablement

dus à la nature du solvant d'extraction et à la nature d'échantillon. Les mêmes auteurs [Bernatonienèet *al.*, 2008] ont montré que les extraits éthanoliques ont une forte activité antioxydant (45%) contre le radical ABTS à la concentration de 500 µg/ml, ces valeurs sont identiques à celles constatés dans notre étude pour toutes les espèces de *Crataegus* étudiées avec des teneurs variées entre 41.69 à 55.13% selon l'espèce, mais beaucoup plus importante que celles enregistrées par les mêmes auteurs avec les extraits de l'eau distillée (18%).

Nos résultats d'étude de l'activité antioxydant exercée par les extraits de feuilles de *Citrus* contre le radical DPPH sont largement supérieurs à ceux obtenus lors d'une étude menée par Ghasemi *et al.*, (2009) sur l'écorce et tissus de 13 variétés de citrus exhibe des valeurs variant de 600µg/ml pour *Citrus reticulata* et 3900 µg/ml pour *Citrus aurantium* d'écorce selon les variétés de *Citrus*, et un peu plus supérieures à celle trouvé par Lagha et Madani., (2013) sur 7 variétés de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* qui varient dans l'intervalle de [0,555 ± 1,06 – 0,825 ± 0,49 (mg/ml)] et supérieure à celle de Dahmoune et al (2013) sur les extraits éthanoliques de feuilles de *Citrus limon* avec IC50 = 298.82 ± 8,60 µg EAG/ml. Les travaux Ramful et ses collaborateurs (2011) sur le fruit du *Citrus* exhibe des valeurs variant entre 2,92 ± 0,06 à 5,63 ± 0,19 µmol équivalente de Trolox/ g MS qui sont largement inférieurs à nos résultats qui varient entre 84,74± 1,17 et 394,55± 0.98µmol de trolox /g MS.

Les feuilles d'olive représentent une source naturelle de plusieurs antioxydants. Lee et Lee (2009) montre que l'oleuropéine est le composé majoritaire des feuille d'olive, il atteint un pourcentage de 14,2% de la matière sèche et l'hydrolyse acide de l'extrait de feuilles d'olives produit une concentration élevée en hydroxytyrosol (2,3 g d'hydroxytyrosol/ 100 g) de feuilles fraîche. D'après les résultats de la technique du piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS par les extraits de feuilles d'olivier, on constate que l'olivier pourrait être une très bonne source d'antioxydants naturels, ce qui est confirmé par Bensallahet *al.*, 2012 qui ont étudié l'activité antioxydant des feuilles d'une variété de l'olivier cultivé dans la région Chemlali en Tunisie. Les auteurs ont obtenu une IC50 de l'ordre de 7.90 µg/ml en utilisant l'eau/éthanol (30/70) (v/v) comme solvant d'extraction. Ce résultat se rapproche de nos résultats obtenus avec la variété chemlal (IC50 = 10.79 ± 1.03 µg/ml). Les résultats d'Arab et ses collaborateurs (2013) montrent que 50% de radical DPPH a été éliminé par les polyphénols totaux de l'olivier sauvage à partir d'une concentration de 0.29 mg/ml, 0.30 mg/ml pour l'olivier cultivé, ses résultats sont largement supérieurs à celle enregistrés par nos extraits d'olives, ce qui confirme la puissance activité antioxydant de nos variétés.

Très peu de données relatives au pouvoir antioxydant des extraits de genre *Quercus* rapportées par la littérature. Les études sur des extraits méthanoliques de glandes de *Quercus ilex* réalisées par **Luisa et al.,(2013)** montrent qu'ils possèdent un pouvoir antiradicalaire supérieur à celui de nos résultats sur les feuilles de la même espèce mais elles sont en accord avec celles de **Vázquez et al. (2012)**. La capacité de piéger le radical ABTS par nos extraits éthanoliques des différentes espèces de *Quercus* dépasse le seuil de 50 % à la concentration de 100µg/ml mais reste inférieure à celle du trolox (92,857 %), ces résultats sont supérieurs à celles trouvées par **Luisa et al. (2013)** sur le fruit de *Quercus ilex*. La forte activité antioxydant des *Quercus* a été expliquée par les travaux de caractérisation de **Fernandes et al., (2010)** par HPLC et GC/MS des extraits méthanoliques de feuilles de *Quercus suber*, qui montrent la richesse de ces feuilles en acide protocatechique, acide gallique, acide caféique, acide ferulique, l'acide ellagique et essentiellement en tannins qui présentent la majorité des composés bioactifs des *Quercus*, ces molécules sont connues par leur fortes activités antioxydants.

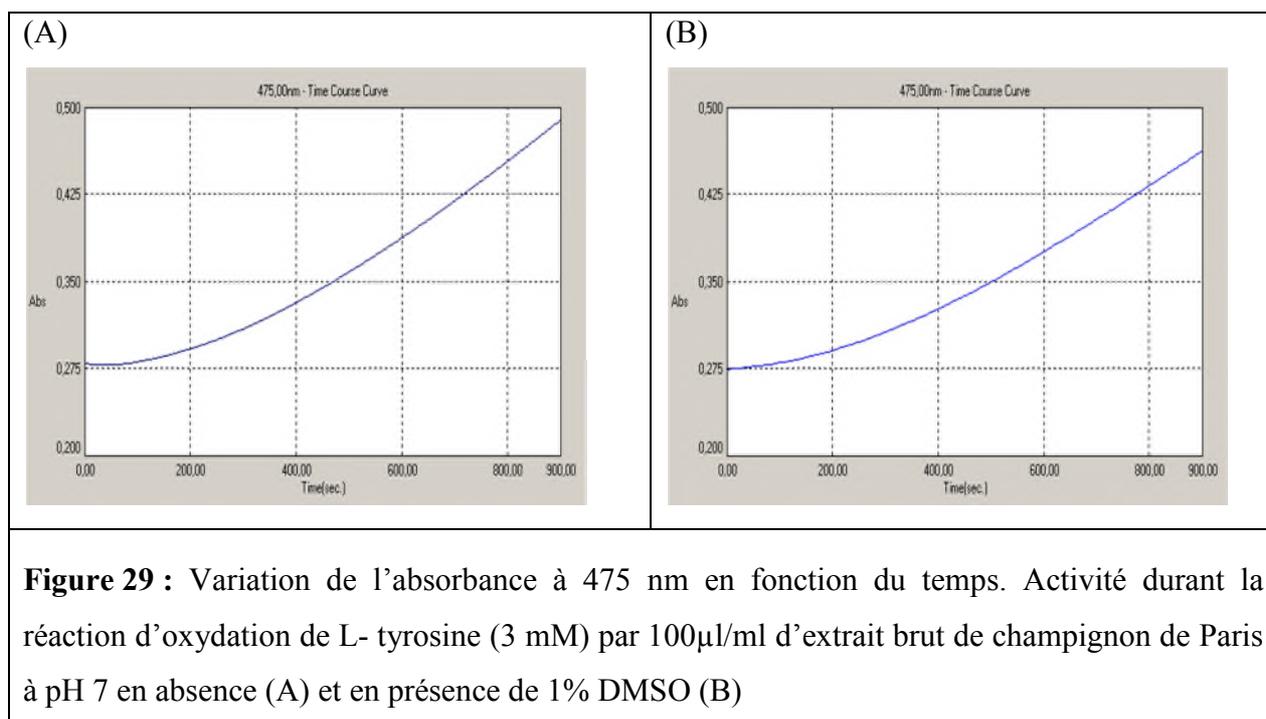
Les corrélations positives entre les substances actives et les activités antioxydants ont été expliquées par nombreux facteurs. Selon **Scherer et Gody, 2009** ; la structure des composés phénoliques, en particulier le degré et la position des groupements hydroxyles, leur substitutions et la présence des doubles liaisons sur le noyau aromatique, ainsi que la glycosylation et la présence d'autres groupements donneurs de protons renforcent l'activité antioxydant de ces molécules [**Cai et al.,2006**]. En effet, les flavanols aglycones comme la quercétine, la myricétine et le kaempferol qui contiennent plusieurs groupements hydroxyles ont une activité antioxydant supérieure à celle de leurs dérivés glycosylés comme la rutine et la myricétine...etc [**Scherer et Gody, 2009**]. Comme on a travaillé sur des extraits bruts, il est important de signaler que l'activité antioxydant réalisée peut être attribuée aux composés non phénoliques telles que les lipides, les sucres et la chlorophylle.

II.4) Activité antityrosinase

II.4.1) Activité tyrosinase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*)

Pour déterminer l'effet antityrosinase des extraits éthanoliques des feuilles de différentes espèces végétales étudiées, nous avons opté pour la tyrosinase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) parce qu'elle présente une source importante de tyrosinase [Chiara *et al.*, 2011]. Les conditions optimales du milieu réactionnel pour mesurer l'activité de cette enzyme dans l'extrait brut du champignon ont été préalablement mises au point. D'autres parts, pour avoir la gamme la plus large possible de concentrations d'extrait végétal à tester lors des essais d'inhibition, l'activité enzymatique a été mesurée en présence et en absence d'éthanol ou de DMSO à différentes concentrations (1 à 10%) car une faible solubilité aqueuse des extraits a été révélée.

Les résultats obtenus (**Figure 29**) ont montré que la meilleure activité de l'extrait tyrosinase du champignon de Paris est observée dans des conditions de tampon phosphate 0.05mM, à pH 7, en présence d'une concentration de tyrosine de 3 mM. Dans ces conditions, l'activité tyrosinase est de 0.020 nm /min.ml. Comme, il a été démontré que le DMSO est moins dénaturant que l'éthanol et que son effet à 1% est négligeable. L'activité tyrosinase mesurée est de même ordre de grandeur que celles obtenues par Solomon *et al.*, (1996) in kim et hyama, (2005) et celle de Schurink *et al.*, (2007) et Guozi, (2011).



Lors de mesure de l'activité tyrosinase à température ambiante, on a observé que la variation d'absorbance à 475nm en fonction du temps suit un profil de cinétique atypique avec une phase de latence d'environ 5 min que ce soit en absence ou en présence de DMSO (**Figure 29**). Ce profil enzymatique est typique des tyrosinases. En effet, la phase de latence de quelques minutes avant d'atteindre l'état stationnaire est le résultat d'une inhibition temporaire de la forme *met* de la tyrosinase par un excès de substrat monophénolique [**Nufiez-Delicado et al.,1996**].

II.4.2) Effet des extraits éthanoliques sur l'activité de la tyrosinase

Pour évaluer l'activité des extraits de feuilles de différentes espèces végétales sur l'activité de la tyrosinase de champignon de Paris *Agaricus bisporus*, ont été réalisées après une solubilisation de ses dernières dans le DMSO à 1%, à une concentration élevée de l'ordre de 1mg/ ml comme un test préliminaire pour tous les extraits de plantes. Les vitesses initiales en présence et en absence d'extrait de plante ont été déterminées à partir de la partie linéaire de la courbe d'absorbance en fonction du temps de la phase stationnaire. En effet, une faible solubilité aqueuse se révèle, souvent être un handicap pour des évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* [**Okombi, 2005**] et le choix du DMSO comme un solvant de solubilisation de nos extraits phénoliques de plantes est déjà décrit auparavant comme un meilleur solvant pour solubiliser les extraits de plantes et/ou même moins inhibant l'activité enzymatique, car l'éthanol (le solvant d'extraction) et d'autres solvants organiques possèdent une limite de solubilité de ses extraits avec une forte inhibition enzymatique, même à des faibles concentrations [**Bnao, 1999**]. Les résultats de ce test (1mg/ml) sont mentionnés dans le **Tableau VII**.

A l'issu des résultats obtenus de l'activité inhibitrice de la tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus* par les extraits de plantes étudiées à la concentration de 1 mg/ml, trois séries de plantes ont été constatées, dont la première regroupe les genres de *Pistacia*, *Ceratonia*, *Citrus* et *Arbutus* qui exercent un effet inhibiteur sur la cinétique enzymatique de la tyrosinase avec des pourcentages d'inhibition variables, dans la deuxième série, on a observé les espèces de genre *Quercus* qui sont dépourvues d'activités antityrosinase et dans la dernière série, on a constaté un effet activateur de la tyrosinase par les espèces de genre *Olea* et *Crataegus*.

L'analyse statistique des taux d'inhibition de l'activité enzymatique de la tyrosinase par les extraits de plantes à 1mg/ml montre des différences significatives ($p < 0.05$), la meilleure inhibition est représentée par *P. lentiscus* avec un rapport de 83,67 %, suivie par *A*

.unedo et les deux variétés *Citron* et *Lime* du genre *Citrus* qui ne présentent aucune différence significative ($p < 0.05$). Les espèces *Ceratonia siliqua*, *Citrus reticulata* et *Pistacia atlantica* sont statiquement similaires ($p < 0.05$) avec des rapports d'inhibition considérablement importants. Ces rapports restent toutefois plus faibles chez les variétés d'espèces *Citrus sinensis* par rapport aux autres espèces avec des pourcentages variant entre 55.20 à 65.65 %.

Tableau VII: Effet des extraits éthanoliques de feuilles de quelques espèces végétales sur l'activité tyrosinase de champignon de Paris.

Genre	Espèce (Variété)	Effet sur la Tyrosase	(%) d'inhibition 1mg/ml d'extrait
Citrus	<i>C. sinensis</i> (Thomson)	Inhibition	62.50
	<i>C. sinensis</i> (Tardive)		64.86
	<i>C. sinensis</i> (Sanguinelli)		55.20
	<i>C. sinensis</i> (Double fine)		65.65
	<i>C. reticulata</i> (Clémentine)		72.07
	<i>C. reticulata</i> (wiling)		65.76
	<i>C. limon</i> (citron)		71.17
	<i>C. aurantiifolia</i> (lime)		73.45
Quercus	<i>Q. canariensis</i>	Aucun Effet	//
	<i>Q. Ilex</i>		//
	<i>Q. suber</i>		//
Olea	<i>O. europaea</i> (Chemlal)	Activation	//
	<i>O. europaea</i> (Azeradj)		//
	<i>O. europaea</i> (Amalo)		//
	<i>O. europaea</i> (Avonakar)		//
	<i>O. olester</i>		//
Pistachier	<i>P. lentiscus</i>	Inhibition	83.67
	<i>P. atlantica.</i>		64.64
Arbutus	<i>A. unedo.</i>	Inhibition	73.73
Ceratonia	<i>C. siliqua</i> (Lahlou)	Inhibition	80.20
	<i>C. siliqua</i> (Tounsi)		61.22
	<i>C. siliqua</i> (Kachkache)		69.38
Crataegus	<i>C. azarolus.</i>	Activation	//
	<i>C. monogyna.</i>		//
	<i>C. azarolus - monoguna</i>		//

II.4.3) Efficacité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits éthanoliques

Afin de se renseigner sur la puissance d'inhibition de nos extraits de plantes sur l'activité de la tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus*, nous avons testé une gamme de concentrations (250µg/ml à 2mg/ml), correspondant à chaque plante qui est déjà pourvue de l'activité antityrosinase à la concentration de 1 mg/ml. On a remarqué expérimentalement, lorsqu'on additionne un volume défini de l'extrait phénolique aux milieux réactionnels contenant de la tyrosinase et la tyrosine comme substrat, la cinétique enzymatique diminue en fonction du temps, ainsi la solution change de couleur jaune pâle au noir sombre en fonction des concentrations, suivi par une augmentation dans le pourcentage d'inhibition (**Annexe IV**). Les valeurs d'IC₅₀ sont calculées pour les différents extraits et les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure (30)**.

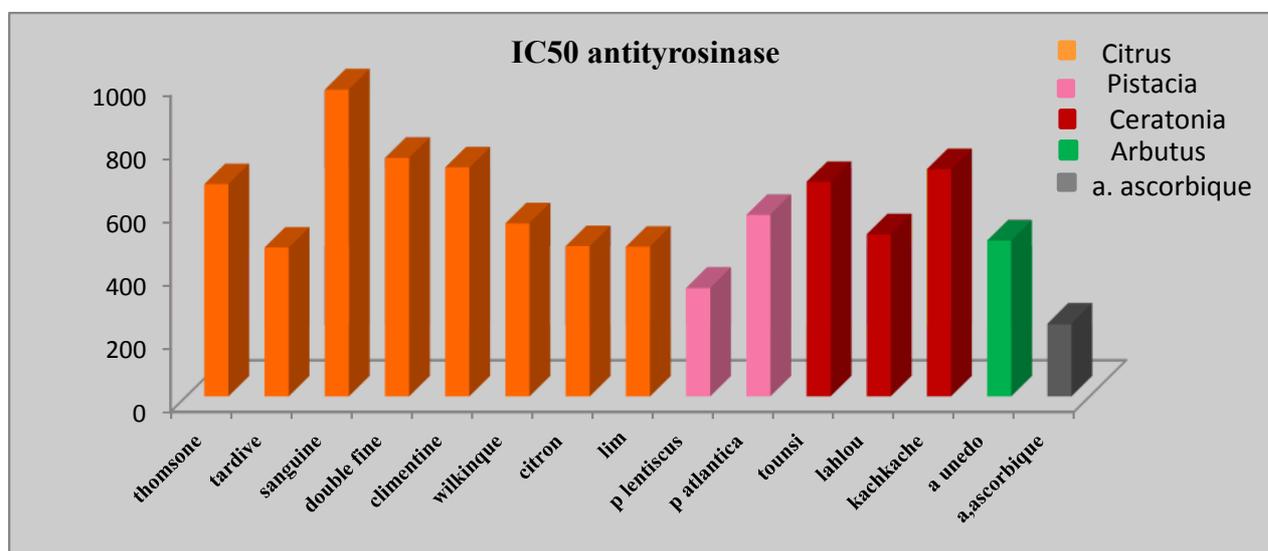


Figure 30 : Représentation des IC₅₀ de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits éthanoliques des feuilles des espèces de *Citrus*, *Pistachier*, *Ceratonia*, et *Arbutus*

Les IC₅₀ de l'activité antityrosinase des différents extraits de plantes varient entre 0,4 mg/ml à 1,1mg/ml. La **Figure 30** montre que les concentrations inhibitrices de tous nos extraits sont plus faibles que l'acide ascorbique (IC₅₀ = 0,23 mg/ml), un métabolite connu pour être un puissant inhibiteur des tyrosinases [Jo et ses collaborateurs, 2011]. D'autre part, il est à noter que l'extrait inhibiteur le moins efficace est celui de feuilles de la variété *Sanguine* de l'espèce *C. sinensis* dont l'IC₅₀ est égale à 1,1mg/ml. Par contre, l'extrait le plus efficace est celui de l'espèce *P. lentiscus* (IC₅₀=0,34 mg/ml).

L'analyse statistique des concentrations inhibitrices de l'activité enzymatique de la tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus* à 50 % (IC₅₀) montre des différences hautement

significatives entre les espèces ($p < 0.05$) avec une forte activité enregistrée par *Pistachia lentiscus*, suivie par *Arbutus unedo* puis les variétés de l'espèce *C. limon* qui ne présentent aucune différence significative entre elles ($p < 0.05$).

La forte activité inhibitrice de la tyrosinase par les Pistachiers, peut être expliquée par la richesse de ces derniers en substances actives inhibant l'activité de la tyrosinase. L'analyse qualitative des substances actives des feuilles de *Pistachia lentiscus* par HPLC et GC-MS réalisée par **Rodríguez-Pérez et ses collaborateurs (2013)**, montre la richesse de cette espèce en quercitine et ses dérivés surtout glycosylés, en acides myristiques, luteoline, acide gallique, le kaempferol et Pistafolin A. Ces substances sont connues par leur forte activité inhibitrice de la tyrosinase, sachant que l'acide gallique et le kaempferol sont utilisés comme des molécules de références de l'inhibition enzymatique de la tyrosinase par certains auteurs. *Pistacia atlantica* contient des substances bioactives de type polyphénolique; acide ascorbique, acides gallique, la rutine, acide caféique, acides p- hydroxybenzoïque, acide vanilique, acide p-coumarique, acide syringique, acide ferulique et l'acide cinnamique, (**Hatamnia et al., 2013**). Ces acides phénoliques sont des molécules connues comme des très forts inhibiteurs de la tyrosinase [**Chang, 2009**]. L'effet inhibiteur des Pistachiers peut être lié à la présence de molécules bioactives chélatrices de métaux comme les anthocyanines. En effet, la chélation de cuivre est l'un des mécanismes d'inhibition de la tyrosinase et l'étude de **Ilhami et al., (2005)** sur le pouvoir chélateur des métaux par les anthocyanines de *Pistacia lentiscus* a montré une très forte activité chélatrice de métaux.

Les composés actifs constituant les *Citrus*, tels que la quercitine et le kaempferol ont été identifiés comme étant de bons chélateurs de cuivre, ce qui explique l'effet inhibiteur de la tyrosinase exercé par ce genre. La nobiletine, naringine et neohesperidine, sont des flavonoïdes largement distribués dans les *Citrus* qui montre une activité inhibitrice semblable à celle de l'acide kojique, qui présente une très forte inhibition de l'activité de la tyrosinase [**Hung et al., 2012**].

La richesse des *Arbutus* en acide gallique et ses dérivés, la catéchine, Procyanidin, acide digalloylquinique, strictinin ellagitannin, procyanidin gallate, kaempferol et leurs dérivés, acide arabinoside et ses dérivés qui exercent une très forte activité antioxydante [**Mendes et al., 2011**] ce qui pourrait expliquer aussi leurs activités inhibitrices de la tyrosinase. Dans la littérature, toutes les deux activités sont expliquées par l'action des polyphénols et

particulièrement des flavonoïdes qui sont les composés majoritaires d'*Arbutus unedo* [Loizzo, 2012].

L'activité antityrosinase de *Ceratonia siliqua* peut être expliquée par son abondance en substances bioactives comme les acides 4-Hydroxybenzoïques (acide cumarique, l'acide ferulique, l'acide gallique, la naringenin, eriodictyol, isorhamnetin, quercetin-3-alpha-L-rhamnoside) et les acides cinnamiques (acide caféïque, acide Syringique, Apigenin, Genistein, Luteolin, Kaempferol), Chrysoeriol, Tricetin 3',5' etherdimethyl, Myrecetin glucosidés, sont des composés qui présentent une très forte activité antityrosinase soit comme inhibiteur compétitif au non compétitif et même comme des bon chélateurs de cuivre [Kim et Uyama, 2005].

II.4.4) Analyse de Corrélation entre les teneurs en polyphénols et l'activité antityrosinase

Dans le but d'établir la relation entre l'IC50 de l'activité antityrosinase et les teneurs en polyphénols (phénols totaux, flavonoïdes et tannins), la **Figure (31)** illustre la variation d'IC50 en fonction des teneurs de ces substances.

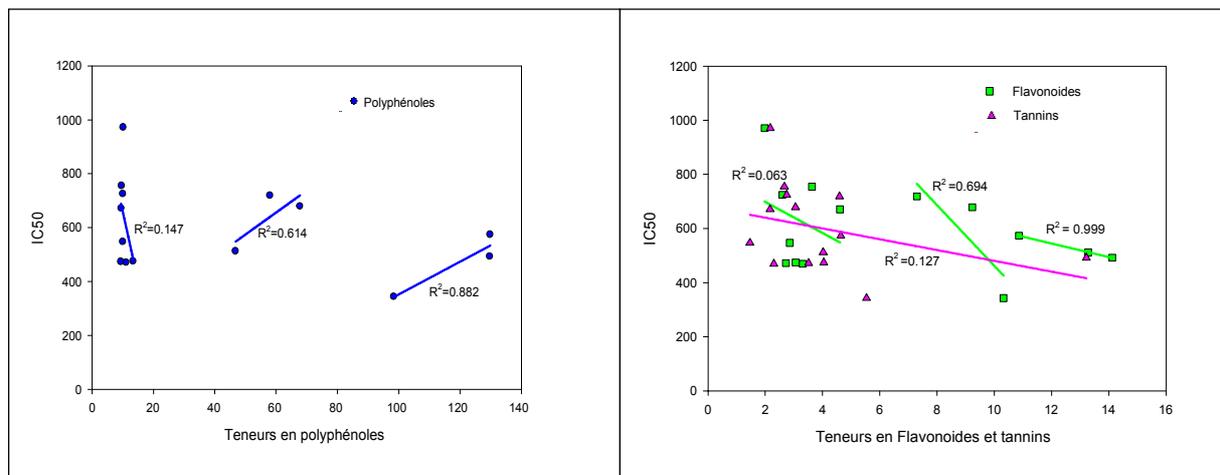


Figure 31 : Les corrélations entre les composés phénoliques et les IC50 de l'activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits de plantes.

Les résultats de corrélation entre les IC50 de l'activité de la tyrosinase et les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes montrent l'existence de trois lots de plantes. Dans le premier lot, on trouve *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *A. unedo* et la variété *lahlou* de *Ceratonia siliqua* qui présentent une très forte corrélation entre l'IC50 de la tyrosinase et les teneurs en polyphénols ($R^2 = 0.889$) et en flavonoïdes ($R^2 = 0.999$). Le deuxième lot renferme les variétés de genre *Ceratonia* avec une bonne corrélation $R^2 = 0.614$ et $R^2 = 0.694$ pour les polyphénols et flavonoïdes respectivement. Dans le troisième lot, on distingue les variétés de genre *Citrus*,

qui enregistrent une très faible corrélation pour les flavonoïdes avec $R^2 = 0.063$ et $R^2 = 0.147$ pour les polyphénols. Nous remarquons ainsi une faible corrélation entre les teneurs en tannins totaux et les concentrations d'IC₅₀ de l'activité antityrosinase avec un $R^2 = 0.127$, ceci nous permet de déduire que la capacité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits de plantes étudiées est due à la participation de 88.9% des composés phénoliques, 99.9 % des flavonoïdes pour le premier lot et à 61.4% au polyphénols et à 69.4 au flavonoïdes pour le deuxième lot, le troisième lot enregistre une très faible corrélation de l'ordre de 1 à 6 % pour les polyphénols et les flavonoïdes respectivement, les tannins participent dans ses activités avec un rapport très faible de l'ordre de 12.7 %. Il semble aussi que les capacités antityrosinase des différentes espèces étudiées soient liées à la concentration des polyphénols est plus particulièrement à celle des flavonoïdes, ce qui confirme les données bibliographiques où la majorité des antityrosinases sont des flavonoïdes.

II.4.5) Analyse de corrélation entre les activités antityrosinase et les activités antioxydants

La corrélation entre les IC₅₀ de l'activité inhibitrice de la tyrosinase et les valeurs IC₅₀ de l'activité antiradicalaire ainsi que les pourcentages de chélation de fer de l'activité antioxydant des différentes plantes étudiées, a pour but de montrer la relation de ces deux activités avec les composés phénoliques qui réagissent soit comme antioxydant et/ou antityrosinase dans le milieu réactionnel de chaque activité (**Figure 32**)

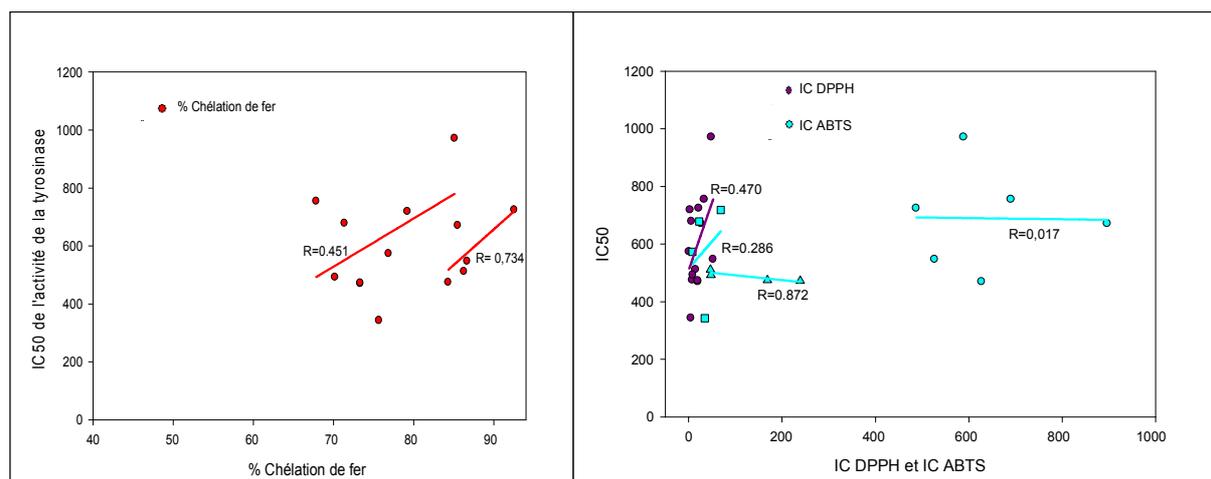


Figure 32 : Corrélation entre l'activité inhibitrice de la tyrosinase (AIT) et l'activité antioxydant

Les résultats d'études des corrélations entre les pourcentages de chélation de fer et l'activité antityrosinase des différentes espèces étudiées, nous permettent de déduire deux groupes de plantes, dans le premier regroupes *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *A. unedo* et les variétés de *C. siliqua* qui enregistre une très bonne corrélation entre les deux activités avec $R=0.734$, ce qui confirme les données bibliographiques, que les chélateurs de métaux sont des bons inhibiteurs de la tyrosinase, représentés par des flavonoïdes et la puissance de ses deux activités revient à la qualité et à la quantité des flavonoïdes constituant nos extraits, car le rapport flavonoïdes/ polyphénols est très important dans ses extraits, ce qui explique la corrélation entre ses deux activités. Dans le deuxième groupe, on désigne les différentes variétés des différentes espèces de genre *Citrus* qui présente une corrélation moyenne entre les deux activités, c'est ce qui a été démontré dans l'étude phytochimique de nos extraits qui révèle que les *Citrus* constitue le genre le plus pauvre en substances actives analysées par rapport aux autres espèces étudiées; en effet, cette corrélation est due à la qualité et à la quantité des composés constituant ses extraits qui peuvent exercer les deux effets antioxydant et antityrosinase.

Les corrélations entre l'activité antityrosinase et l'activité antiradicalaire de l'activité antioxydant marquent une corrélation assez importante avec le radical DPPH et l'activité antityrosinase avec $R=0,470$ mais avec le radical ABTS, on remarque trois corrélations différentes en fonction des espèces étudiées. Une forte corrélation a été enregistrée avec les espèces *P. lentiscus*, *P. atlantica*, *A. unedo*, et les deux variétés de genre *Citrus* Citron et Lime avec $R=0.872$, une corrélation assez faible avec les variétés de genre *Ceratonia siliqua* ($R=0.286$) et une très faible corrélation avec les variétés d'espèces *Citrus sinensis* et *Citrus reticulata* avec un $R=0.017$. On peut déduire que les composés phénoliques constituant nos extraits interviennent d'une façon ou d'une autre avec des pourcentages plus au moins comparables et variées entre 1 à 87 % selon les espèces pour les activités biologiques réalisées.

Après toutes les combinaisons effectuées, nous enregistrons des corrélations différentes qui varient entre une forte, moyenne et faible corrélation entre les activités antioxydant et antityrosinase et les teneurs en polyphénols selon les espèces, cette confirmation est largement répandue dans la littérature [Sun *et al.*, 2005]. Il est très accepté que ce n'est pas nécessairement la forte teneur en polyphénols qui exhibe une puissante activité antioxydante et/ ou antityrosinase [Moure *et al.*, 2001] mais la nature des composés constituant ses extraits peut aussi présenter des rapports importants même à de faibles

concentrations. La seule explication de l'absence de cette corrélation chez quelques espèces est à la synergie des composés phénoliques dans les extraits éthanoliques [Rice-Evans *et al.*, 1997] et que l'activité antioxydant et antityrosinase dépend non seulement de la concentration mais aussi de la qualité et la structure de ces molécules. C'est pourquoi, les deux extraits de *P. atlantica* et *A. unedo* qui présentent des teneurs comparables en polyphénols de l'ordre de 129.84 et 129.71 mg EAG/ g MS peuvent présenter des changements remarquables dans leur activité antioxydant et antityrosinase. De même, les espèces *C. limone* et *O. oleastre* possédants différentes teneurs en phénols totaux de l'ordre de 13.45 pour le Citron, la moyenne de 35mg/ g (MS) pour les espèces de *O. oleastre* mais l'activité antioxydant avec le Citron a été beaucoup plus importante que celles des variétés de l'espèce de *O. oleastre*, en effet l'activité inhibitrice de la tyrosinase a été totalement absente chez les espèces de genre *Olea* par contre le Citron enregistre une très bonne activité antityrosinase. Les corrélations positives entre l'activité antioxydant et l'activité antityrosinase avec les teneurs en composés phénoliques peuvent être dues à la présence des flavonoïdes, ces derniers possèdent des propriétés antioxydants et antityrosinase puissantes, ainsi le nombre et/ ou la position des groupes hydroxyle sur les noyaux de ces molécules, les substitutions sur les cycles B et A avec la présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo sur le cycle C renforcent l'activité antioxydant et antityrosinase par les flavonoïdes [Caiet *al.*, 2006].

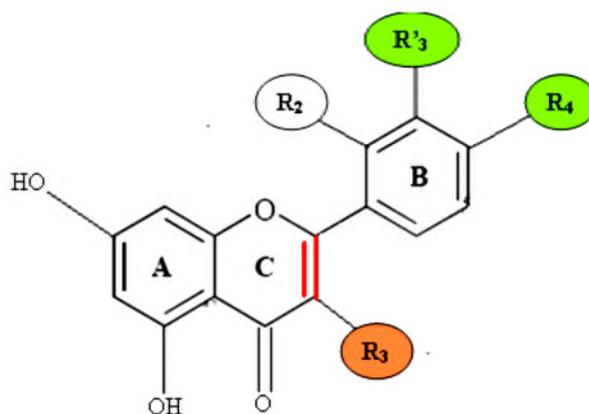


Figure 33 : Principaux éléments de l'activité antioxydant et antityrosinase des flavonoïdes [Belyagoubi, 2011].

Conclusion

Conclusion et perspectives

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimique contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicaux [Belyagoubi, 2011]. Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie, comme agents pharmacologiques dans le traitement de nombreuses pathologies et dans l'industrie alimentaire comme agents de conservation antioxydants à cibles enzymatiques et/ou non enzymatiques pour remplacer les substances de synthèses qui présentent des effets néfastes pour la santé humaine. L'objectif assigné par cette étude s'insère dans ce contexte et les résultats d'évaluation des propriétés antioxydants et antityrosinase de quelques plantes médicinales Algérienne sont assez promoteurs en réponse à cet objectif.

En effet, la quantification par des méthodes colorimétriques a montré que les feuilles des plantes sélectionnées contiennent des phénols totaux, des flavonoïdes et des tannins. Les teneurs de ses derniers ont permis de grouper ces plantes en trois séries dont la première, regroupe les espèces des genres *Pistachia*, *Arbutus* et *Crataegus*, constituent une source prometteuse en polyphénols totaux (82.24 ± 1.86 à 129.84 ± 3.42 mg EAG/ g MS), avec des taux en tannins qui varient de 04.42 ± 0.18 à 14.45 ± 0.19 mg EAT/ g MS et en flavonoïdes allant de 10.32 ± 0.08 à 19.92 ± 0.39 mg EQ/ g MS. La deuxième série englobe les espèces des genres *Olea*, *Quercus* et *Ceratonia*, leurs concentrations en polyphénols totaux varient entre 30.75 ± 0.41 à 65.97 ± 0.74 mg EAG/ g MS et des rapports en flavonoïdes et tannins considérablement importants variant d'une espèce à l'autre. Les espèces du genre *Citrus* représentent la troisième série avec les plus faibles teneurs en substances actives phénoliques de l'ordre de 9.55 ± 0.089 à 13.45 ± 0.09 mg EAG/ g MS.

L'évaluation des activités biologiques des composés phénoliques de ces espèces végétales, en termes d'activité antioxydant et d'activité antityrosinase a démontré une interaction entre les extraits de plante avec les radicaux libres (DPPH, ABTS), le fer bivalent

et la tyrosinase. Cette interaction a eu pour conséquence, une activité antiradicalaire, un pouvoir de chélation des métaux bivalents et une activité antityrosinase des extraits de plantes.

L'activité antioxydants de nos extraits, est d'autant plus importante que la concentration est grande. Ceci peut refléter la qualité et la quantité d'antioxydants présentés dans les différents échantillons. L'efficacité antioxydant des extraits varie selon l'espèce et le genre végétal. Ainsi, Les IC50 enregistrées oscillent de 01.21 ± 0.77 à $52.53 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$ pour le radical DPPH et de 08.25 ± 0.70 à $896.27 \pm 1.01 \mu\text{g/ml}$ avec le radical ABTS. L'extrait végétal à potentiel antiradicalaire le plus élevé est celui de *Pistacia atlantica*, par contre, la plus faible activité antiradicalaire a été enregistrée pour les espèces de genre *Citrus*, à l'exception de la variété Citron. Contrairement aux résultats de l'activité antiradicalaire, les meilleurs potentiels de chélation de fer ont été enregistrés avec les variétés de genre *Citrus*, particulièrement la variété *Climentine* de *Citrus reticulata*, dont le taux de chélation de fer est de 92.54% pour 100 μg d'extrait.

Probablement ce sont les polyphénols de nos extraits de plantes qui présentent une activité antityrosinase. Les résultats de ce test indiquent une très forte activité inhibitrice de la tyrosinase par les extraits de *Pistachier*, *Arbutus unedo*, *Ceratonia* et *Citrus limon*. Par contre, elle est totalement absente dans les espèces de genre *Quercus*. Les extraits des espèces de genre *Olea* et *Crataegus* présentent plutôt un effet activateur de la tyrosinase.

Les études de corrélation montrent que ces activités biologiques sont fortement influencées par la variation qualitative et quantitative en composés phénoliques des extraits de plantes étudiées.

L'ensemble de l'étude menée et les résultats obtenus nous ont permis d'évaluer et de caractériser certaines plantes d'origine Algérienne afin de les utiliser comme ressources de substances bioactives en application agro-alimentaire, pharmaceutique ou cosmétique. Reste donc à isoler, identifier et caractériser ces substances bioactives d'intérêt biologique fondamental ou appliqué.

*Référence
bibliographiques*

Références Bibliographiques

Abi Azar. R, (2007), Complexations des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier. Propriétés technologiques des coagulums obtenus, Thèse de doctorat à Agroparistech Ecole Doctorale Abies,

Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P. & Lomri, A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydesdismutases : rôle dans les maladies rhumatismales Reactiveoxygenspecies and superoxidisedismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme* 74 (2007) 636–643.

Anderson. J. W, (1968). Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*. Vol.7, 1973-1988.
Antioxydant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Science*

Arab. K, Bouchenak. O, Yahiaoui. K, (2013), Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. *Afrique SCIENCE*, 09, (3), 159-166.

Asmus. K. D, Bonifacic M, (2000), Free radical chem. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O. Editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier, pp: 3-53.

Atmani. D, Chaher. N, Berboucha. M, Ayouni. K, Lounis. H, Boudaoud. H, Debbache. N, Atmani. D, (2009), Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*, 112: 303–309.

Avallone. R, Plessi. M, Baraldi. M, Monzani. A, (1997), Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 166–172.

Bachés. B, Bachés. M, (2011), Agrumes. Comment les choisir et les cultiver facilement. édition Eugen Ulmer, pp : 53-106.

Baek. S, Kim. J, Kim. D, Lee. C, Kim. J, Chung. D.K, Lee. C, (2008), Inhibitory effect of dalbergioidin isolated from the trunk of *Lespedeza cyrtobotrya* on melanin biosynthesis. *J. Microbiol. Biotechnol*, 18, 874-879.

Ben Hsouna. A, Trigui. M, Jaoua. S, (1986), Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of the ethyl acetate extract of endemic *Ceratonia siliqua* leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 34, N° 5, pp. 827-829.

Ben Salah. M, Hafedh. A, Manef. A, (2012), Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia. *Medicinal chemistry*, 2-5.

Benchikh. Y, Louailèche. H, (2014), Effects of extraction conditions on the recovery of phenolic compounds and in vitro antioxidant activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp, *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, 161:2, 175-181,

Benhammou. N, Atik Bekkara. F, Panovska. K.T, (2008), Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 022-028.

Benhammou. N, (2011), Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.

Berger, M.M., Chioléro, R.L. (2001). Apport d'antioxydants en réanimation : pourquoi, lesquels, avec quels objectifs c. *Réanimation*, 10 : 527-34.

Bernatoniene, Masteikova, Majiene, Savickas, Kovelaitis, Bernatoniene, Dvoráčková, Civinskienė, Lekas, Vitkevičius, Pečiūra., (2008). Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Medicina (Kaunas)*, 44(9).

Bhourri. W, Safa. D, Skandrani. I, Boubaker. J, Bouhlef. I, B.Sghaier. M.B, Kilani. S, Mariotte. A.M, Marie. G. Dijoux-Franca, Ghedira. K, Chekir Ghedira. L, (2010), Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from *Pistacia lentiscus* fruits. *Toxicol In Vitro*, 24, 509–515.

Bouabdallah. A, (2014), Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier sauvage (*Olea europaea sylvestris*), Université Abou Bekr Belkaïd – Tlemcen,

Boubaker. A, Buldgen. A, Kayouli. C, (2004), Composition chimique et teneur en composés phénoliques des espèces arbustives du Nord-Ouest de la Tunisie. *Cahiers Options Méditerranéennes*. N° 62 p. 315- 317.

Boudhrioua. N, Bahloul. N, Ben Slimen. I, Kechaou. N, (2009), Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves industrial crops and products, 29, 412–419.

Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M. & Chaabouni, M.M. (2008). Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*. 10 : 119-125.

Bozin. B, Mimica-Dukic. N, Samojlik. I, Goran. A, Igić. R, (2008), Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111, 925–929.

Brahmi. F, Mechri. B, Dhibi. M, Hammami. M, (2013), Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, 49, 256–264.

Bruneton. J, (1999), Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} éd. France: Tech & Doc – Lavoisier.

Burton. S.G, (1994), Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*, 21, 543-594.

- Cai. Y, Luob. Q, Sunc. M, Corke. H, (2004)**,Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74,2157–2184.
- Cai. Y.Z, Sun. M, Xing. J, Luo. Q,Corke. H, (2006)**, Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78: 2872-2888.
- Castedo-Dorado. F, Gomez-Vazquez. I, Fernandes. P.M, Crecente-Campo. F, (2012)**, Shrub fuel characteristics estimated from overstory variables in NW Spain pine stands. *For. Ecol. Manage.*, 275, 130–141
- Chang. T.S,(2009)**, an Updated Review of Tyrosinase Inhibitors, *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2440-2475.
- Chen. C.Y, Chang. F.R, Yen. H.F., Wu. Y.C. (1998)**.Amides from stems of *Annona cherimola*. *Phytochemistry*. 49 (5), 1443-1447.
- Chen. L, Flurkey, W. H, (2002)**, Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry*. 5,109-120.
- Cheng. K. T, Hsu FL, Chen. S. H, Hsieh. P. K, Huang. H.S, Lee. C. K, Lee. M.H, (2007)**,New constituent from *Podocarpus macrophyllus* var. *macrophyllus* shows antityrosinase effect and regulates tyrosinase-related proteins and mrna in human epidermal melanocytes. *ChemPharm Bull*. 55:757–61.
- Cheriot.S, (2007)**, Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides, thèse de doctorat à l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- Cho. Y. K, Ahn, H.K. (1999a)**. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*. 23, 577-592.
- Cho. Y.K,Ahn H.K. (1999b)**. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry*. 23,593 605.
- Claus. H, Decker. H. (2006)**. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- Criton. M, Le Mellay-Hamon V.(2008)**.Analogues of N-hydroxy-N'-phenylthiourea and Nhydroxy-N'-phenylurea as inhibitors of tyrosinase and melanin formation. *Bioorg.Med. Chem. Lett*.18, 3607-3610.
- Cruz. J. M, Franco. D, Dominguez. J. M, Sineiro. J, Dominguez. H, Nunez. M. J, Parajo. J. C, (2001)**,Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Custodio, L. Patarra. J, Albericio. F, Rosa. N, Manuel. N.J, Nogueira. F, Romano. A, (2013)**, Extracts from *Quercus sp.* acorns exhibit in vitro neuroprotective features through inhibition of cholinesterase and protection of the human dopaminergic cell line SH-SY5Y from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity, *Industrial Crops and Products*, N° 45 p .114-120

Custódio. L, Escapa.A. L, Patarra.J, Aligué. R, Alberício. F, Neng. N. R, Manuel.J Nogueira. F, Romano. A, (2013), Sapwood of Carob Tree (*Ceratonia siliqua*L.) as a Potential Source of Bioactive Compounds, *Records of natural products*; 7:3 225-229.

Dahmoune. F, Boulekbache. L, Moussia. K, Aoun. O, Spigno. G, Madan. Kh, (2013), Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction, *Industrial Crops and Products*, 50, 77– 87

Dawson. C. R, Magee. R. J, (1955). Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*. 2: 817-831.

de Guiera senegalensis J. F. Gmel (*Combretaceae*). *Sci & tech, Sciences de la santé*, 32 : 9 -

determination of tannins. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 809-812.

Dicko. M. H, Hilhorst. R, Gruppen. H, Laane. C, Van Berkel. W.J.H, Voragen A.G.J. (2002). Note & Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 306: 336-339.

Djabou. N, Dib. M.E.A, Allali. H, Benderb. A, Kamald. M. A, Ghalem. S, Tabti. B, (2013), Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the phenolic composition of Algerian *Arbutus unedo*-L. roots, *Pharmacognosy Journal*, 5, 275 – 280.

Djeridane A ; Yousfi M ; Nadjemi B ; Boutassouna D ; Stocker P et Vidal N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts phenolic compounds. *Food Chemistry*. (97), p: 654-660

Djeridane. A, Yousfi. M, Nadjemi. B, Boutassouna. D, Stocker. P, Vidal. N, (2006), Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.

Donnet. J. (2001). L'athérosclérose. *Médecine science*, 17(5) ,559-567.

Dutta. S, Padhye. S, Narayanaswamy. R, Persaud. K.C. (2001). An optical biosensor employing tiron-immobilised polypyrrole films for estimating monophenolase activity in apple juice. *Biosensors & Bioelectronics* 16: 287–294.

Elmastaş. M, Gülçin. İ, Işildak. Ö, Küfrevioğlu. Ö.İ, İbaoglu. K, Aboul-Enein. H.Y, (2006), Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 3: 258-266.

Escribano-Bailón. M.T, Santos-Buegla. C, (2001), Polyphenol extraction from foods. In "Method in polyphenol analysis". *Ed. Royal Society of Chemistry*. pp: 1-16.

Espin. J. ., Morales. M, Varon. R, Tudela. J, Garcia. C. F, (1997b). Monophenolase Activity of polyphenol Oxidase from Blanquilla Pear. *Phytochemistry*, Vol. 44, No,1, pp.17-22.

Espin. J. C, Morales. M, Ochoa. M, Tudela. J, Garcia. C. F, (1997c). Monophenolase Activity of Strawberry Polyphenol Oxidase. *Phytochemistry*, Vol. 45, No,4, pp.667-670.

- Espin. J. C, Morales. M, Varon. R, Tudela. J, Garcia. C. F, (1995).**A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple polyphenol Oxidase. *Analytical Biochemistry* 231, 237-246.
- Espin. J. C, Tudela. J, Garcia. C. F, (1997a).** Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Artichoke Heads (*Cynarascolumus*L.). *Lebensm. Wiss. u.-Technol.*, 30, 819–825.
- Espin. J. C, Wichers. H. J. (1999).** Activation of a latent mushroom (*Agaricusbisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3518-3525.
- Espin. J.C, Morales. M, Garcia-Ruiz. P.A, Tudela. J, Garcia-Canovas. F, (1997),**Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chemistry.* 45: 1090-1094.
- Espin. J.C, Morales. M, Varôn. R, (1995).**A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase. *Analytical Biochemistry.* Vol.23 1, 237-246.
- Falleh. H, Ksouri. R, Chaieb. K, Karray-Bouraoui.N, Trabelsi. N, Boulaaba. M, Abdelly. C, (2008),**Phenolic composition of *Cynaracardunculus*L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies,* 331,372–379.
- Fan. Y, Flurkey. W. H.(2004).** Purification and characterization of tyrosinase from gu! tissue of Portabella mushrooms. *Phytochemistry.* 65: 671-8.
- Favier, A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique,* 115.
- Favier. A, (1997).** Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes marqués par le choix d'un marqueur. In *Annales de biologie clinique,* 55(1) :9-16.
- Fernandes. A, Sousa.A, Mateus. N, Cabral. M, de Freitas. V,(2011),** Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercussuber* L by HPLC–DAD/ESI–MS, *Food Chemistry,* 125, 1398–1405.
- Fiorentino. A, Castaldi. S, D'Abrosca. B, Natale. A, Carfora. A, Messere. A, Monaco. P, (2007),** Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland, *Biochem. Syst. Ecol,* 35, 809–811
Fructus lycii. Food Chemistry, **105:** 353-363.
- Gandia-Herrero. F, Jiménez-Atiénzar. M, Cabanes. J, Garcia-Carmona. F, Escribano. J, (2005).** Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* 386: 601-607.
- Ghani. U, Ullah. N, (2010).** New potent inhibitors of tyrosinase: Novel clues to binding of 1,3,4-thiadiazole-2(3*H*)-thiones, 1,3,4-oxadiazole-2(3*H*)-thiones, 4-amino-1,2,4-triazole 5(4*H*)-thiones, and substituted hydrazides to the dicopper active site. *Bioorg.Med. Chem.* 18, 4042-4048.

- Ghasemi. K, Ghasemi. Y, Ebrahimzadeh. M.A, (2009)**,Antioxidant activity,phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(3): 277 - 281.
- Goli. A.H, Barzegar. M, Sahari. M.A, (2005)**, Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistaciavera*) hull extracts. *Food Chem*, 92, 521–525.
- Goudable, J. & Favier, A. (1997)**. Radicaux libres oxygénées et antioxydants. *Nutr Clin Métabol*, 11: 115-20.
- Gouzi. M. H, (2011)**. Etude des propriétés du polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) du champignon de Paris (*Agaricusbisporus* J.E Lange Imbach). Thèse de doctorat. Université Abou BekrBelkaïd-Tlemcen, 79pp.
- Hagerman A.E., Butler L.G, (1978)**. Protein precipitation method for the quantitative
- Hamann. J.N,Rolff. M, Tuzcek. F, (2015)**,Monooxygenation of an appended phenol in a model system of tyrosinase: implications on the enzymatic reaction mechanism. *Dalton Trans.*, 44, 3251-3258
- Hatamnia. A.A,Abbaspour. N, Darvishzadeh. R,(2014)**, Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistaciaatlantica* subsp. *kurdica*) fruits, *Food Chemistry*, 145, 306–311.
- Haudecoeur. R, (2011)**.Pharmacochimie des aurones pour la modulation d’enzymes. Thèse en Cotutelle Internationale. Université de Grenoble ,256pp.
- Hayat. K, Hussain. S, Abbas. S, Farooq. U, Ding. B, Xia. S, Jia. C, Zhang. X, Xia. W, (2009)**,Optimised microwave-assisted extraction of phenolic acids from Citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*. *Sep SciTechnol*, 70, 63-70.
- Hazra B., Biswas S. and Mandal N. (2008)**. Antioxidant and free radical scavenging activity
- Hemalatha S., Lalitha P. and Arulpriya P. (2010)**. Antioxydant activities of the extracts of
- Ilhami. G, Berashvili. D, Gepdiremen. A, (2005)**, Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perillapankinensis*decne. *J Ethnopharmacol*, 101, 287–293. *Inc*, 26:1231-1237
- Isao. K, Ikuyo. K-H, Swapan. K. Ch, Yumi. K, Yolanda. S, Tetsuya. O, (2000)**.Flavonols from Heterothecainuloides: Tyrosinase Inhibitory Activity and Structural Criteriay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 8:1749-1755.
- Ismaya. W. T, Rozeboom. H. J, Weijn. A, Mes. J. J, Fusetti. F, Wicher. H. J, Dijkstra. B. W, (2011)**. Crystal structure of *Agaricusbisporus*mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*.50, 5477-5486.
- Issa. N, (2009)**. Etude de l’oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de *Myceliophthorathermophila* : application à la fonctionnalisation de chitosane. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Laboraine (INPL), Nancy-université, 242pp.

- Jancvitz-Klapp. A. H, Richard. F. C, Goupy. P. M, Nicolas. J. J, (1990).** Inhibition studies on apple polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38: 926-931.
- Janovitz-Klapp. A. H, Richard. F. C, Nicolas. J, (1989).** Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry.* 28: 2903-2907.
- Jeon. H. J, Noda. M, Maruyama. M, Matoba. Y, Kumagai. T, Sugiyama. M,(2006).** Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9827-9833.
- Jo. Y.H, Seo. G.S, Yuk. H.G, Lee. S. Ch, (2012),** Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of methanol extracts from *Magnolia denudata* and *Magnolia denudata* var. *purpurascens* flowers, *Food Research International*, 47, 197–200.
- Jolivet. S, Arpin. N, Wichers. H.J, Pellon. G,(1998).** *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol Res.* 102, 1459-83.
- Joslyn. M. A, Nishira. H, Ito. S,(1968),** Leucoanthocyanins and related phenolic compounds of carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J. Sci. Food Agric.* 19, 543-550.
- Kahn. V, (1985).** Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenylase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sa.* 50, 111-115.
- Kahn. V, Pomerantz. S. H, (1980).** Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, Vol. 19, pp. 379-385.
- Kammoun. B.A, Boudhrioua. M. N, Kechaou. N, (2012),** Moisture sorption isotherms Experimental and mathematical investigations of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. *Food Chem*, 132, 1728-1735.
- Kang. S. M, Heo. S. J, Kim. K.N, Lee SH, Yang H.M, Kim. A.D, Jeon Y.J, (2012).** Molecular docking studies of a phlorotannin, dieckol isolated from *Eckloniacava* with tyrosinase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem.* 20, 311–6.
- Karioti. A, Bilia. A.R, Skaltsa. H, (2010),** *Quercus ilex* L A rich source of polyacylated flavonoid glucosides, *Food Chemistry* 123 131–142.
- Keilin. D, Mann. T, (1938).** Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.* 125: 187-204.
- Khan. A. A, Akhtar. S, Husain. Q, (2006).** Direct immobilization of polyphenol oxidases on Celte 545 from ammonium sulfate fractionated proteins of potato (*Solanum tuberosum*). *J. Mol. Catal B: Enzym.* 40: 58-63.
- Khan. S. B, Azhar-ul-Haq. N, Afza. A, Malik. M. T. H, Khan. M. R, Shah. M. I.(2005).** Choudhary. Tyrosinase-inhibitory long-chain esters from *Amberboa ramosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 53, 86-89.
- Khatib. S, Nerya. O, Musa. R, Shmuel. M, Tamir. S, Vaya. J,(2005).** Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 433-441.

Kim. Y. M, Yun. J, Lee. C. M, Lee. H, Min. K. R, Kim. Y,(2002). Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J.Biol. Chem.* 277, 16340-16344.

Kim. Y.J, Uyama. H,(2005), Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci*, 62, 1707-1723.

Kivçak,Akay. S, (2005), Quantitative Determination Of alpha-Tocopherol In *PistaciaLentiscus*, *PistaciaLentiscus*Var. Chia, and *PistaciaTerebinthus* by Tlc-Densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, 76, 62–66.

Klabund. T, Eicken. C, Sacchettini. J. C, Krebs.B, (1998). Crystal structure of a plant catecholoxidase containing a dicopper center. *Nat. Struc. Biol.* 12.

Klabunde. T, Eicken. C, Sacchettini. J. C, Krebs. B, (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* 5, 1084-1090.

Klenow. S, Gleit. M, (2009), New insight into the influence of carob extract and gallic acid on hemin induced modulation of HT29 cell growth parameters, *Toxicology in Vitro*, Vol. 23, N° 6, pp. 1055-1061.

Koechlin-Ramonatsco. C, (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20 :165-177.

Kouamé, J., Gnoula, C., Palé, E., Bassolé, H., Guissou, I.P., Simporé, J. & Nikiéma, J.B.

Ksouri. R, Megdiche. W, Falleh. H, Trabelsi. N, Boulaaba. M, Smaoui. A, Abdelly. C, (2008), Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C. R. Biol*, 331: 865- 873.

Kubo. I, Kinst-Hori. I, Chaudhuri. S. K, Kubo. Y, Sanchez. Y, Ogura. T, (2000). Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* 8, 1749-1755.

Kubowitz. F, (1938). Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxylase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung*. 299: 32-57.

Kumar, S.V., Saritha, G. & Fareedullah, M.d. (2012). Role of antioxidants and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Fareedullah. Annals of Biological Research.* 1 (3): 158-173.

Kumar. N, Bhandari. P, Singh. B, Shamsher. S, Bari. b, (2009). Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 361–367.

Kumar. N, Bhandari. P, Singh. B, Shamsher. S, Bari. b, (2009), Antioxidant activity and ultra-performance LC-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for phenolics-based fingerprinting of Rose species: *Rosa damascena*, *Rosa bourboniana* and *Rosa brunonii*. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 361–367.

Kumazawa. S, Taniguchi.M, Suzuki. Y, Shimura. M, Kwon. M.S, Nakayama.T, (2002), Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods. *J. Agric.Food Chem.*, Vol.50. N°2, pp. 373–377.

Kuwabara. T,Katoh. Y, (1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenoloxidase. *Plant Cell Physiol.*, 40, 1029-1035.

Lagha-Benamrouche. S, Madani. K, (2013), Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: peels and leaves. *Ind Corp Prod*, 50, 723-730.

Lam. K. W, Syahida. A, Ul-Haq. Z, Rahman. M. B. A, Lajis. N. H,(2010).Synthesis and biological activity of oxadiazole and triazolothiadiazole derivatives as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 3755-3759.

Lax. A. R, Vaughn. K. C, (1991).Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31.

Le, K., Chiu, F. & Ken, N.G. (2007). Identification and quantification of antioxidants in

Lee. O.H, Lee. B.Y,(2010), Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresources and Technology*, 101,(10):3751-3754.

Lerch. K, (1982). Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257, 6414-6419.

Lerch. K, (1995). Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. *In* Enzymatic browning and its prevention. C. Y. Lee, J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600, *American Chemical Society*: 64-80.

Lesgards. J. F, Prast. M, Lehucher-Michel. M.P, (2002). Le stress oxydatif et ses implications. *Suppléments scientifique*, 2(3) ,14-19.

Li. B.B, Smith. B, Hossain. M. d.M, (2006), Extraction of phenolics from citrus peels, I. Solvent extraction method ; *Separation and Purification Technology*, 48, 182-188.

Li. H, Wang. X, Li. Y, Li. P, Wang. H, (2009), Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112, 454–460.

Li. H.B, Wong. C.C, Cheng. K.W, Chen. F, (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Food Sci Technol*, 41, 385-390.

Loizzo. M. R, Tundis. R, Menichini. F, (2012). Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update .*Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 11.

Luigia Longo, Francesca Platini, Anna Scardino, Oscar Alabiso, Giuseppe Vasapollo and Luciana Tessitore (2008). Autophagy inhibition enhances anthocyanin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*, 7, 2476-2485.

- Macheix. J.J, Fleuriet. A, Sarni-Manchado. P. (2005).** Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaire. *Edition Technologie et document*. Paris, 133-141.
- Maeda. K, Fukuda. M, (1991).** *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem*. 42: 361-368.
- Makris. D. P, Kefalas. P, (2004),** Carob Pod as a source of polyphenolic Antioxidants, *Food Technol. Biotechnol.* vol. 42, N° 2, pp. 105–108.
- Males. Z, Plazibat. M, Vundac. V.B, Zuntar. I, (2006),** Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree *Arbutus unedo* L (Ericaceae). *Acta Pharmaceutica*, 56, 245–250.
- Malheiro. R, Sousa. A, Casal. S, Bento. A, Pereira. J.A, (2011),** Cultivar effect on the phenolic composition and antioxidant potential of stoned table olives. *Food Chem. Toxicol.*, 49, 450–457.
- Manner. H. I, Buker. R. S, Smith. V. E, Ward. D, Elevitch. C. R, (2006).** Citrus and Fortunella. *Spices and Profiles for Pacific Island Agroforestry*, pp: 7-29.
- Marfak. A, (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. *Thèse de doctorat de l'université de Limoges*, pp 24-42.
- Marino. S. M, Fogal. S, Bisaglia. M, Moro. S, Scartabelli. G, De Gioia. L, Spada. A, Monzani. E, Casella. L, Mammi. S, Bubacco. L, (2011),** "Investigation of Streptomyces antibiotic styrosinase reactivity toward chlorophenols." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505, 67-74.
- Mario. J, Simirgiotis, Schmeda-Hirschmann. G, (2010),** Determination of phenolic composition and antioxidant activity in fruits, rhizomes and leaves of the white strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD–ESI-MS and free radical quenching techniques *Journal of Food Composition and Analysis*. 23, 545–553.
- Marouf. A, Reynoud. J, (2007).** La botanique de A à Z. *Ed Dunod*, Paris, p :141.
- Marques .A.V, Pereira. H, (2013),** Lignin monomeric composition of corks from the barks of *Betula pendula*, *Quercus suber* and *Quercus cerris* determined by Py–GC–MS/FID, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 100, 88–94.
- Marri .C, Frazzoli. A, Hochkoeppler. A, Poggi. V. (2003).** Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*. 63, 745-752.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie* 5 : 304-315.
- Martinez. M. V, Whitaker. J. R, (1995).** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*. 6, 195-200.

- Mayer. A. M, (1987).** Polyphenoloxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26, 11-20.
- Mayer. A. M, Harel. E, (1991).** Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. *Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science. 373-398.*
- McEvily. A. J, Iyengar. R, Otwell. W. S, (1992).** Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 253-273.
- Mendes. L, Freitas. V, Baptista. P, Carvalho. M, (2011),** Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo*L.) leaf and fruit, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2285–2291.
- Menichini. F, Loizzo. M.R, Bonesi. M, Conferti. F, Luca. D, Statti. G. A, Cindio. B, Menichini. F, Tundis. R, (2011),** Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages ; *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1549-1555.
- Miguel, M. G. (2010).** Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 15: 9252-9287.
- Mohsen. S. M, Ammar. A.S.M, (2009),** Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*, 112, 595–598.
- Mosher. D.B, Pathak. M.A., Fitzpatrick. T.B eds. (1983).** Update: dermatology in general medicine, pp 205-225; McGraw Hill, New York.
- Moure. A, Cruz. J. M, Franco.D, Dominguez. J. M, Sineiro. J, Dominguez. H, Nunez. M.J, Parajo. J.C, (2001),** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Moure.A, Cruz. J. M, Franco. D, Dominguez. J. M, Sineiro. J, Dominguez. H, Nunez. M. J, Parajo. J. C, (2001),** Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Mueller-Harvey. I,(2001),** Analysis of Hydrolysable Tannins. *An. Feed Sci. Tech.*, 91,3-20.
- Naczka. M, Shahidi. F, (2004),** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95–111.
- Nerya. O, Vaya. J, Musa. R., Izrael. S., Ben-Arie. R., Tamir. S, (2003).** Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J. Agric. Food Chem.* 51,1201-1207.
- Nufiez-Deicado. E, Bru. R, Sánchez-Ferrer. A, Garcia-Carmona. F, (1996),** Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. *Journal of Chromatography. B* 680: 105-112.
- of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8 : 63.
- Ohguchi. K, Tanaka. T., Iliya, I. Ito T., Iinuma M., Matsumoto. K., Akao. Y, Nozawa. Y. (2003).** Gnetol as a potent tyrosinase inhibitor from genus *Gnetum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 663-665.

Okombi. S, (2005). Recherche et étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Oliveira. I, Coelho. V, Baltasar. R, Pereira. J. A, Baptista. P, (2009), Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo*L.) leaves on free radicals, *Food and Chemical Toxicology*, 47,1507–1511.

O'Sullivan. W. J. (1969).Stability constants of metal complexes. *In* Data for biochemical research. R. M.C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot,K. M. Joncs. Oxford, England: 423-434.

Oszmianski. J, Lee. C.Y, (1990). Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1892-1895.

Pabuccuoglu. A, Kivcak. B, Bas. M, Mert. T, (2003),Antioxidant activity of *Arbutus unedo*leaves. *Fitoterapia*, 74, 597–599.

Pallauf. K, Rivas-Gonzalo. J. C, Del Castillo. M.D, Cano. M.P, de Pascual-Teresa. S, (2008), Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 273–281.

Papa. G, Pessione. E, Leone. V,Giunta. C. (1994a).*Agaricusbisporus*tyrosinase-I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26, 215-221.

Papa. G,Poulos. M, Wollseifen. H.R, Mellenthin. A, Haber. B, Galensa. R, (2004),Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.)and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn, *J Agric Food Chem.*, Vol.52, N°12,pp.3784-91

Paris. M, Hurabielle. M, (1981). Abrégé de matière médicinale, pharmacognosie.Tome 1. *Ed Masson*, Paris p. 339.

Pastre,J.O.C.(2005).Interet de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Thèse soutenue publiquement en vue de l'obtention du diplôme de docteur veterinaire, Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse.* 120 p.

Patil. S. S, Zucker. M, (1965). Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of.Biological Chemistry.* 240, 3938-3943.

Pérez-Gilabert. M, Morte. A, G-Carmona. F, (2004).Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science.* 166: 365-370.

Pfaffly. J.R, (2001).Diabetic complication, hyperglycemia and free radicals. *University of LONA, Biosciences department*, 1-17.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K. &Defraigne, J.O. (2008). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydantePhysiological action of antioxidantdefences. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 233-239.

Polese. J. M. (2008). La culture des agrumes In *Artemis* (Ed), pp : 93.

- Qiu. L, Chen. Q. H., Zhuang. J. X,(2009).**Inhibitory effects of α -cyano-4 hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chem.* 112: 609-13.
- Quettier-Deleu, C., B. Gressier, J. Vasseur, T. Dine, C. Brunet, M. Luyckx, M. Cazin, J.C. Cazin, F. Bailleul, and F. Trotin.(2000).** "Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour." *Journal of Ethnopharmacology* 72: 35–42.
- Ramful. D, Tarnus. E, Aaruoma. O. I, Bourdon. E, Bahorun. T, (2011),** Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps; *Food Research International*, 44, 2088-2099.
- Ranalli.A, Contento.S, Lucera. L, Di Febo. M, Marchegiani. D, Di Fonzo. V, (2006),** Factors Affecting the Contents of Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.), *J.Agric. Food Chem*, 54,434-440.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggebnte, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999).**
- Rescigno. A, Sollai. F, Pisu. B, Rinaldi. A, Sanjust. E, (2002).**Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 17: 207-218.
- Ribéreau-Gayon. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. *Ed Dunod, Paris*, p : 5-7,10-13, 55-86.
- Rice-Evans. C. A, Miller. N. J, Paganga, G (1996),** "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radical Biology and Medicine* 20(7): 933-956.
- Robb. D. A, (1984).** Tyrosinase. In copper Proteins and Copper Enzymes, ed. R. Lontie. *CRC Press, Boca Raton, Florida.* 207-241.
- Rodríguez-Pérez. C, Quirantes-Piné. R, Amessis-Ouchemoukh. N, Madani. K, Segura-Carretero. A, Fernández-Gutierrez. A, (2013),** A metabolite-profiling approach allows the identification of new compounds from *Pistacia lentiscus* leaves, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 77, 167– 174.
- Ryu. Y. B, Westwood. I. M, Kang. N. S, Kim. H.Y, Kim. J.H, Moon. Y.H, Park. K.H, (2008).**Kurarinol, tyrosinase inhibitor isolated from the root of *Sophora flavescens*. *Phytomedicine*15:612–8.
- Sanchez-Moreno, (1998).** Main methods used in lipid oxidation determination.*Food science and technology international*, 4, 391-399.
- Santos-Buelga.C, Scalbert. A, (2000),**Proanthocyanidins and tannin-like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1094-1117.
- Santos-Gomes.P.C, Seabra. R.M, Andrade. P.B, Fernandes-Ferreira. M, (2003),** Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis*L.), *J. Plant Physiol*, 160, 1025–1032.

Saykova. I, Tylkowski. B, (2009), Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* **4**: 25-39.

Scheehan. N, (2000). La maladie de Parkinson: certitudes et controverses pharmacotherapeutique. Pharmactuel, 398p.

Scherer. R, Godoy. H.T, (2009),Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654–658.

Scherer. R, Godoy. H.T, (2009),Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654–658.

Schurinka. M, Willem. J. H, Berkel. V, Wichers. V.J,Boeriu. C.G, (2007), Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity, peptides, 28, 485–495.

Selinheimo. E., Kruus.K., Buchert. J., Hopia. A, Autio. k, (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *J Cereal Sci.*, 43, 152-9.

Sendovski. M., Kanteev. M., Ben-Yosef. V. S., Adir. N., Fishman. A. (2011). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J. Mol. Biol.*405, 227-237.

Seo. S.Y., Sharma. V.K,Sharma. N, (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chemistry*. 51, 2837-2853.

Sharma. O.P, Bhat. T.K, (2009),DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113,

Shimizu. K, Yasutake. S, Kondo. R,(2003). A new stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Chlorophora excels*. *Chem. Pharm. Bull.* 51, 318-319.

Siegbahn. P.E.M, (2003). The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Bio! Inorg Chem.* 8: 567-576.

Solomon. E. I, Lowery M. D, (1993). Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science*, 259, 1575-1581.

Solomon. E.I,Sundaram. U.M, Machonkin. T. E, (1996).Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.

Sosa. F. S, Marrelli. M, Menichini. F, Statti. G. A, Uzunov. D, Tubaro. A, Menichini. FandDella Loggia R (2008). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of mediterranean dietary plants. *J Ethnopharmacol*, 116, 144–151.

Sousek J; Guedon D; Adam T; Bochorakova H; Taborsrka E; Valka I and Simanek V. (1999). Alkaloids and organic acids content of Eight *Fumaria* species. *Phytochemical analysis.* (10), p: 6-11.

Stevanovic. P.N,Cloutier. T. A, (2009), Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Piceamariana bark* and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*, 113,897–902.

Strothkamp. K. G, Jolley. R. L, Mason. H. S, (1976). Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Commun*, 70, 519-524.

Suhaj. M, (2006), Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 531–537.

Sun. T, Ho. C-H, (2005), Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem*, 90: 743–749.

Tawaha. K, Alali.F.Q, Gharaibeh. M, Mohammad. M, T. El-Elimat,(2007), Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104, 1372–1378.

the aerial roots of *Pothos aurea* (Linden ex Andre). *Der Pharma Chemica*, 2 (6): 84-89.

Topçu. G, Ay. M, Bilici. A, Sarıkurku. C, Ozturk. M, Ulubelen. A, (2007), A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem*, 103, 816–822.

Tranchida. P.Q, Bonaccorsi. I., Dugo P., Mondello L, Dugo G, (2012). Analysis of Citrus essential oils: state of the art and future perspectives. *Rev Flavour Fragr J*, 27: 98-123.

Trebst. A, Depka B, (1995). Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research*. 46, 41-44.

Tsai. S.Y, Wu. T.P, Huang. S.J, Mau. J.L,(2007), Nonvolatile taste components of *Agaricus bisporus* harvested at different stages of maturity. *Food Chemistry*. 103: 1457-1464.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44–84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1–40.

Van den berg. R, Haenen. G.R, Van den Berg, H, Bast. A, (1999), Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem*, 66, 511-517.

Van Gelder. C.W.G., Flurkey. W.H, Whichers. H.J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinase. *Phytochemistry*, 45, 1309-1323.

Van Leeuwen. J, Wichers. H.J, (1999). Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res*. 103: 413-418.

Vanni, A., Gastaldi, D., & Giunata, G. (1990). Kinetic investigations on the double enzymatic activity of the tyrosinase mushroom. *Annali di Chimica*, 80, 35–60.

- Varoquaux.P, (1978).** Contribution à l'étude des propriétés l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricusbisporus*). Thèse doct., Faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'Université de Dijon, 131.
- Vaughn. K, Duke. S. O, (1984).** Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60, 106-112.
- Vémos-Vigyâzô L, (1981).** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Wang. B, Zhang. W.W, Duan. X.J, Li X.M, (2009),** In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomelaconfervoides*(*Rhodomelaceae*). *Food Chemistry*, 113,1101–1105.
- Whitaker. J, Lee. C. Y, (1995).** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker,C. Y. Lee (Eds). *Washington, American Chemical Society: 2-7*.
- Whitaker. J.R, (1995).**Polyphenoloxidase. In *Food Enzyme Structure and Mechanism*, (D.W.S. Wong, ed.), Chapman and Hall, New York. 271-307.
- Wichers. H. J, Gerritsen. Y. A. M, Chapelon. C. G. J, (1996).**Tyrosinase isoforms from 392 the fruitbodies of *Agaricusbisporus*. *Phytochemistry*. 43, 333-337.
- Wise. R.R. Naylor. A.W, (1985).** Calibration and use of a Clark-type oxygen electrode from 5 to 45°C. *Analyt. Biochem.*, 146, 260-264.
- Yagar. H, Sagirolu. A, (2002).** Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *TurkJChem.* 26: 97-103.
- Yemenicioglu. A, Cemeroglu. B, (2003).** Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*PrunusarmeniacaL.*): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem.* 51: 2371-2379.
- Yokozawa. T., Kim. Y. J, (2007).**Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions.*Biol. Pharm. Bull.*, 30, 2007-2011.
- Yoo. K.M, Lee. H.C, Lee. H, Moon. B, Lee. C.Y, (2008),**Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106, 929-936
- Zawistowski. J, Biliaderis. C.G, Eskin. N.A.M, (1991).**Polyphenoloxidase. In *Oxidase enzyme in food*, Robinson, D.S.R. and ESKIN, N.A.M., Eds, Elsevier Appl. Sci., London, Chap.6, 217-273.
- Zhang. X, Hu. A, Hou H, (2009).** Wang. Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 86-90.
- Zheng, Z., Cheng, k., Chao,j., Wu,j., Wang,w. (2008),** Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). *Food Chemistry*, 529–535.

Zheng. Z.P, Cheng. K.W, Chao. J., Wu. J, Wang. M, (2008).Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetiapapyrifera*). *Food Chemistry*.106, 529–535.

Zinkernagel. V, (1986).Untersuchungen zur Anfälligkeit und Resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremialactuae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und Polyphenoloxidaseaktivitäten. *J. Phytopathol.* 115, 257-266.

Ziyan. E, Pekyardimci. S, (2003).Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27, 217-225.

Annexes

Annexe

Annexe 01 : Préparation des solutions et réactifs

a) Dosage des polyphénols totaux

- Folin-ciocalteu à 10% : 10ml du réactif de Folin-ciocalteu dans une fiole graduée de 100ml et compléter au trait de jauge avec l'eau distillée.
- Na₂CO₃ à 7.5% : 7.5g dans 100ml d'eau distillée.
- Solution d'extraits à 1mg/ml : 10mg dans 10ml de méthanol.

b) Dosage des flavonoïdes

- Trichlorure d'aluminium à 2% : 2g d'AlCl₃ dans 100ml d'eau distillée.

c) Dosage des Tannins totaux

- Solution tampon A : 0.02M acide acétique, 0.17M NaCl, pH 4.9
Mélanger : 11.4ml d'acide acétique glacial et 9.86g de NaCl, dissoudre le mélange dans 800ml d'H₂O, ajuster le pH avec du NaOH et Compléter le volume à 1000ml
- La BSA : à 1mg/ml
Dissoudre 1mg de BSA dans la solution tampon 'A'
- Le SDS/TEA : 5% (v/v) Treithanolamine 1% (WW/SDS)
Dissoudre 10g SDS dans 50ml de TEA et ajuster le volume à 1000ml avec l'H₂O
- Le FeCl₃ : 0.01M FeCl₃ dans 0.01M HCl
Diluer 0.83 ml d'HCl centré dans 1000ml d'H₂O (0.83ml+999.17ml), dissoudre 1.62g de FeCl₃, laissé reposer puis filtrer.

d) Le radical DPPH

- Solution de DPPH à 0.1mM : dissoudre 3.49 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.
- Solution d'extrait mère à 1mg/ml : 10mg d'extrait dans 10ml de méthanol.

e) Le radical ABTS

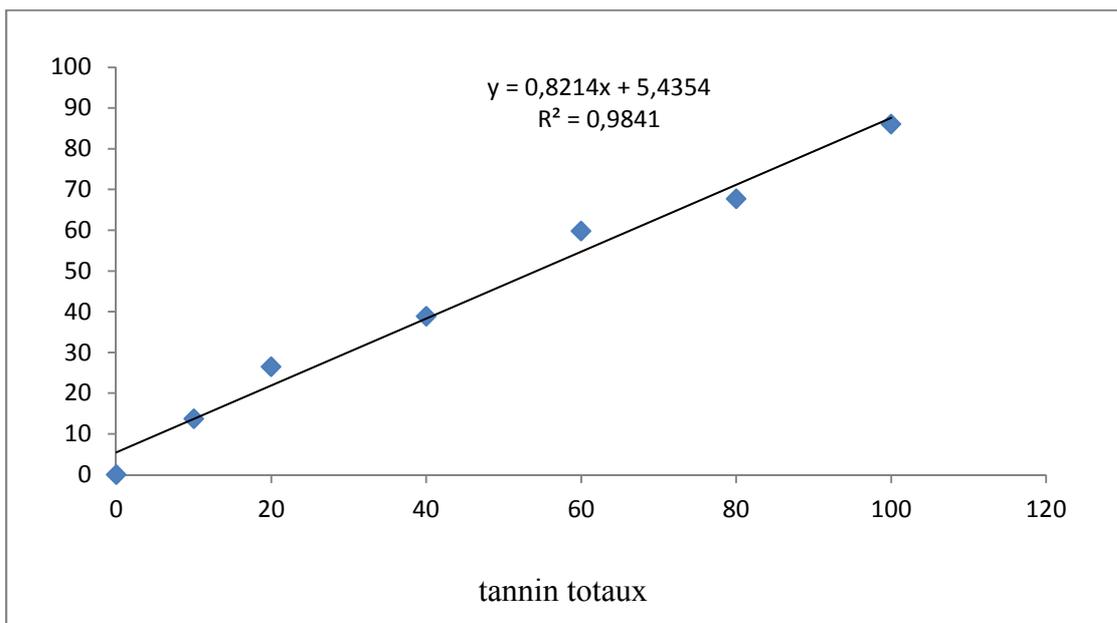
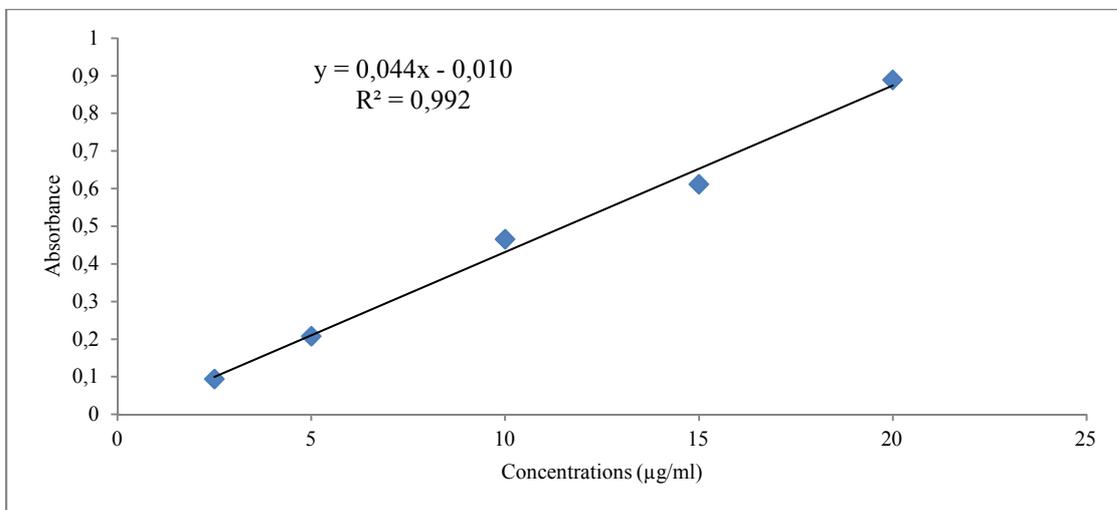
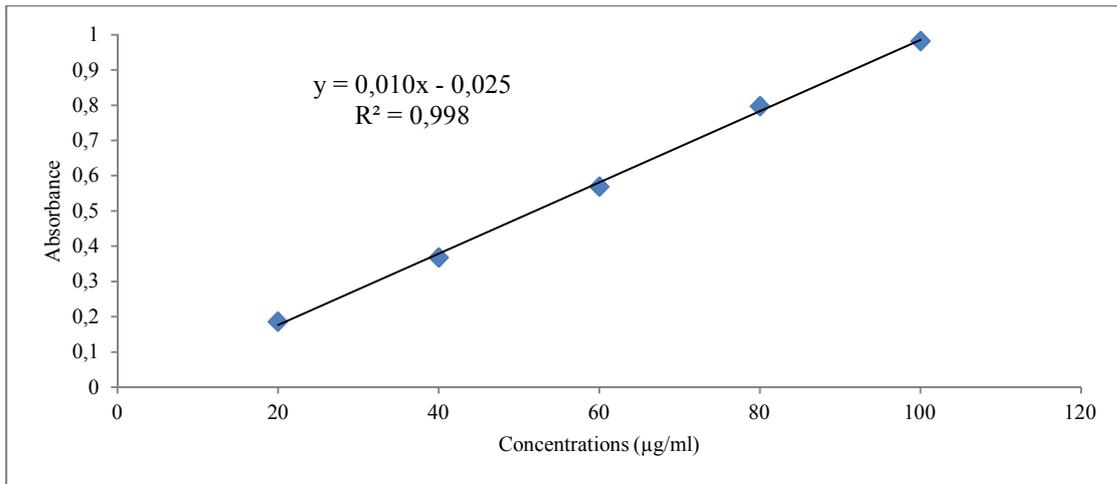
- Solution d'ABTS à 7mM : dissoudre 72 mg d'ABTS dans 20 ml d'eau distillée, ajouter 13.24 mg de persulfate de potassium.
Incuber 12 à 16h à T° ambiante et à l'obscurité puis placer au réfrigérateur pour stopper la réaction.

f) Ferrozine

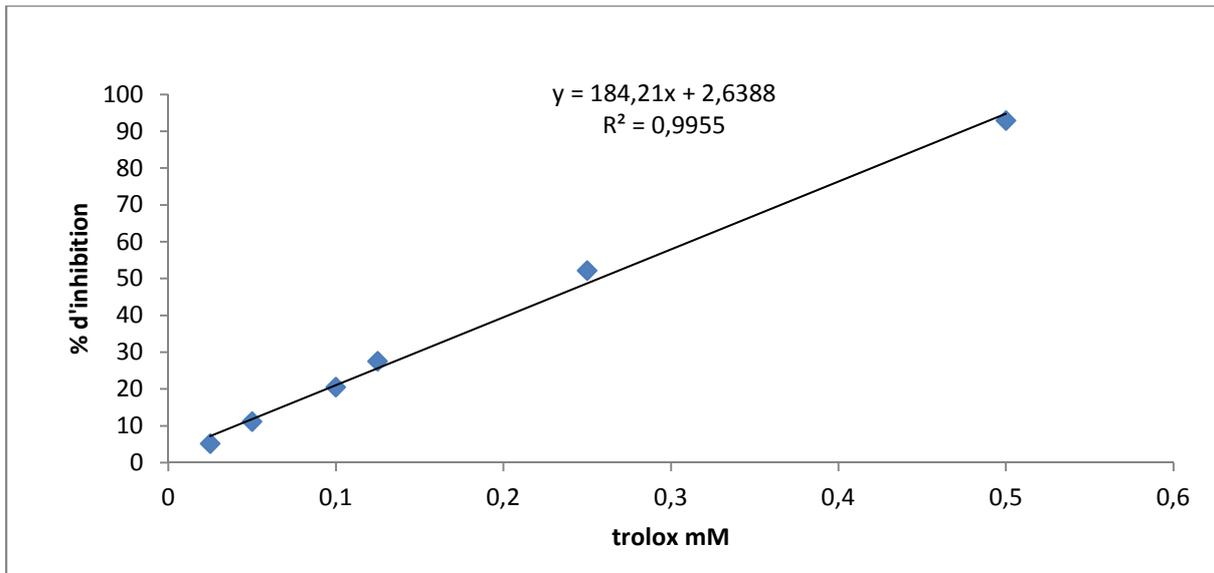
- La solution de ferrozine (5mM) dans le méthanol
- FeCl₂ (0.2 mM) dans l'eau distillée

Annexe

Annexes N0 3 : Courbes d'étalonnage utilisées pour le calcul des teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

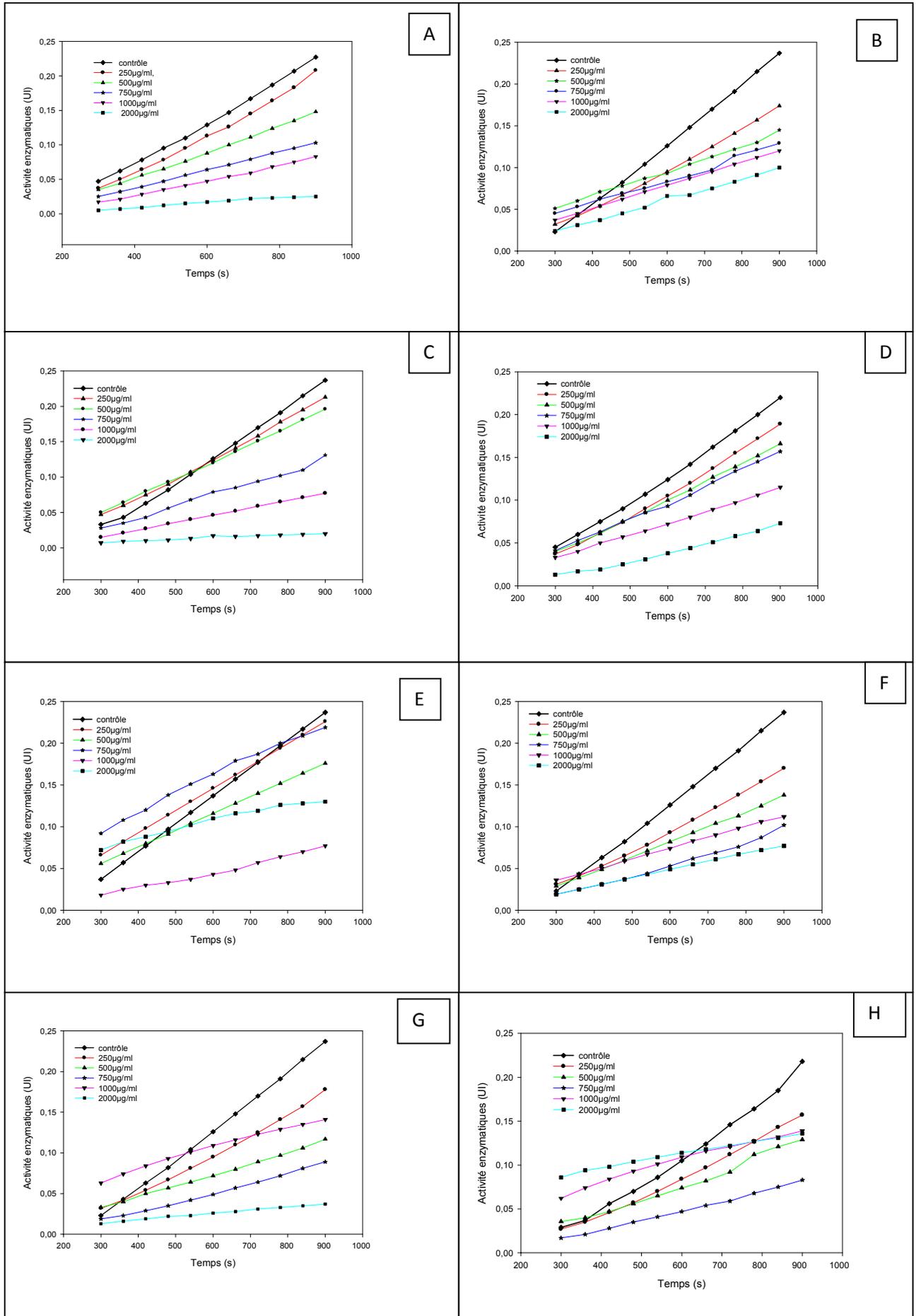


Annexe

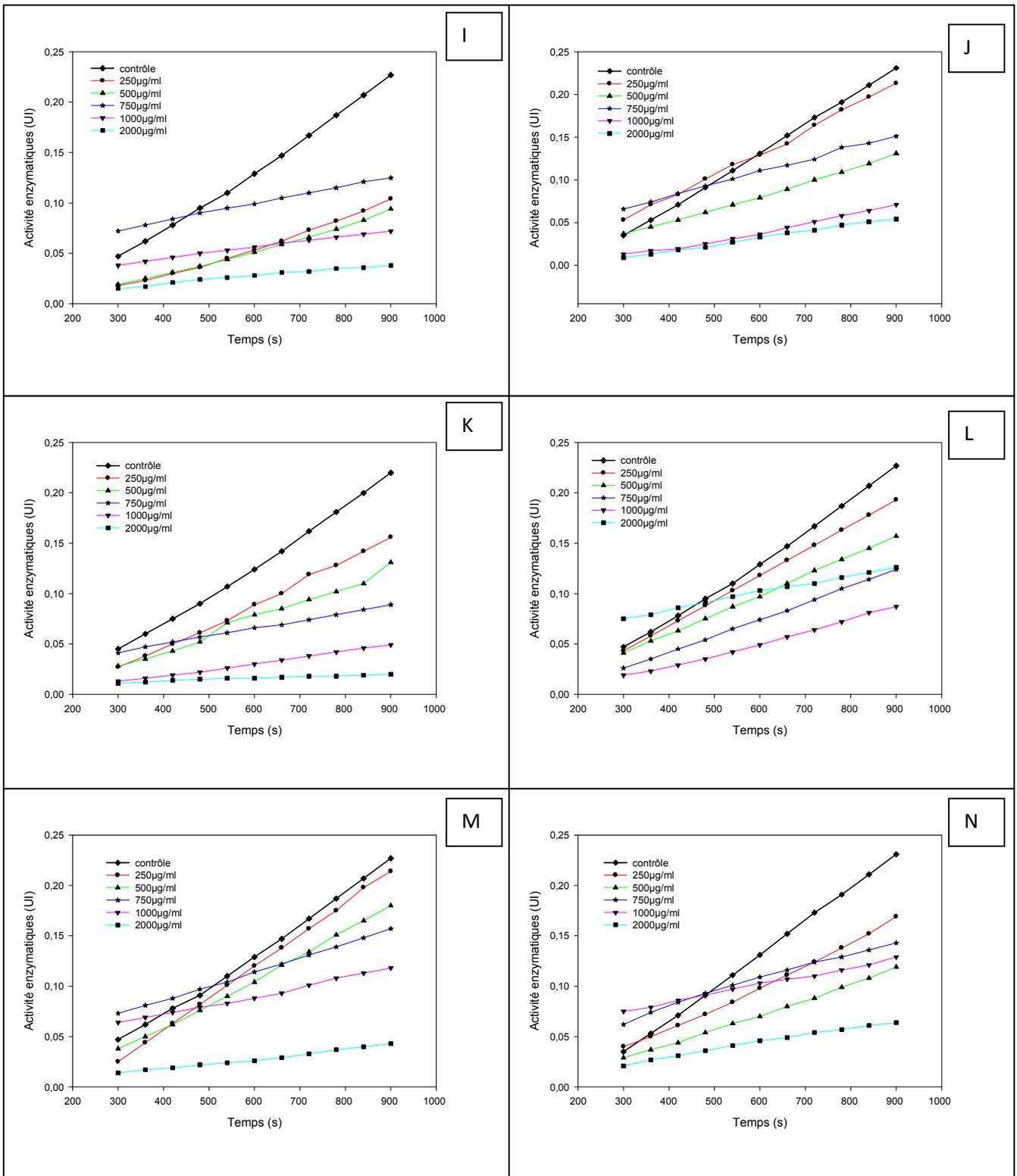


Annexe

Annexe :



Annexe



Evaluation de l'activité inhibitrice de la tyrosinase a différents concentration en fonction de temps (A) : *Thomsone* ; (B) : *Tardive* ; (C) : *Climentine* ; (D) : *Sanguine* ; (E) : *Double fine* ; (F) : *Wilingue*. (G) *Citron* ; (H) *Lime* ; (I) *Pistacia lentiscus* ; (J) *Pistacia atlantica* ; (K) : *Lahlou*; (L) *Tounsi*; (M): *Kachekache*; (N): *A. unedo*

Annexe

Annexe N 02 : Présentation des feuilles de plantes étudiées.

Genre	Espèce	Caractérisations des feuilles	Variété	Photos des feuilles
Citrus	<i>C. sinensis</i>	Les feuilles persistantes, épaisses et lancéolées, à pétiole étroitement ailé avec une couleur verte sombre est une excroissance à leur base sont un peut moins grandes (5 à 5.5 cm de largeur et 12 à 13 cm de longueur avec une La nervure médiane importante et saillante à la face inférieure.	Thomson	
	<i>C. sinensis</i>	Les feuilles persistantes, elliptiques, entier, fine, moyennes à grandes de couleur vert foncé avec une nervation central approfondies, porté par un pétiole assez court, ailé d'un vert claire, mesurant 7 à 10 cm de longueur et 3 à 5 cm de largeur d'un vert foncé a la surface et vert assez claie ce dessous.	Tardive	
	<i>C. sinensis</i>	Feuilles persistantes, entier, épaisses, ovales, pointues d'un vert foncé brillantes, mesures de 6 à 8 cm de longueur et 2 à 4 cm de largeur sont légèrement ailées avec une nervation profond, parfumée, au printemps, porté par un pétiole court d'un vert claire.	Sanguinelli	
	<i>C. sinensis</i>	Le feuilles sont persistant, entières, alternes, pédonculées (pédoncule ailé), épaisses, glabres, luisantes sont ovales à lancéolées et aiguës à l'apex, d'une couleur vert grisâtre de 6 a 9 cm de longueur sur 3à 5 cm de largeur avec une nervation central assez épaisse porté par un étiole très court.	Double fine	

Annexe

	<i>C. reticulata</i>	<p>Feuilles persistantes, oblongues allongées et pointus de 8 à 12 cm de longueur sur 3 à 4 cm de largeur, lancéolées dans leurs porteur, le contour est lâche, la face supérieur d'un vert foncé brillantes, luisant et lancéolées, la face inferieur d'un vert clair. La nervation centrale assez épaisse que les secondaires, le limbe est articulé sur un pétiole court.</p>	Clémentine	
		<p>Les feuilles persistantes, entiers, de grandes tailles luisant, de 5 à 8 cm de longueur et 2 à 3 cm de largeur d'un vert foncé et d'une épaisseur assez importante avec un pétiole court étendu pour formé une nervation centrale importante.</p>	Wilking	
	<i>C- limon</i>	<p>Feuilles persistantes, oblongues lancéolées, entier, larges, alternes, dentelée, ovales et parfumées, de couleur verte pourpre, brillante sur la face supérieure luisantes à <u>limbe</u> nettement articulé avec un pétiole légèrement ailé, de taille très variables de 6 à 11 cm de longueur et 4 cm de largeur.</p>	Citron	
	<i>C. Aurantifolia</i>	<p>Les feuilles simples, persistantes, alterne elliptiques, de forme un peu arrondies, de couleur verte vif très odorante et très rapprochées, elles sont de 4 à 5 cm de largeur et de 11 à 12 cm de longueur légèrement dentelées avec une nervation très apparentes portées par un pétiole très court.</p>	Lime	

Annexe

Quercus	<i>Q. Ilex</i>	Les feuilles sont simple, persistantes, alternes, <u>coriaces</u> , luisantes, mesurant 2 à 9 cm de longueur et 1 à 3 cm de largeur, vertes dessus, grisâtres-poilues dessous, ont une marge dentée ou lisse, parfois à bord enroulé de 8 à 5 paires de nervures secondaire, avec un pétiole court et vert maronné.	<i>Q. Ilex. L</i>	
	<i>Q. suber</i>	Les feuilles sont simples, persistantes alternes de petite taille de 3 à 5 cm de longueur, elles sont coriaces et ovales sont bord peu dentées ou piquant, les nervures secondaire sont bien marqués, leur surface supérieure est vert glauque, la face inférieur est plus claire avec un pétiole très court.	<i>Q. suber. L</i>	
	<i>Q. canariensis</i>	Les feuilles sont alterne, caduques et semi-persistantes, large de forme obovales ou lancéolées et plus ou moins auriculées à la base, mesurent 5 à 20cm en longueur et 4 à 12 cm en largeur, avec 6 à 12 paires de lobes, mucronées, régulières, arrondies ou obtues d'un vert brillant, a nervure principale saillante à la face inférieure, peu profonds, le pétiole est long et rose claire.	<i>Q. canariensis. L</i>	
Olea	<i>O. europaea</i>	Les feuilles persistantes, dur, entier, ovales allongées, porté par un court pétiole, coriaces, enroulé sur les bords, d'un vert foncé luisant sur la face supérieure et d'un vert clair argenté avec une nervure médiane saillante sur la face inférieur, mesurent 3.5 à 7cm de longueur et de 1 à 2 cm de largeur.	Chemlal	
		Les feuilles persistantes, ovales, entiers, allongé et pointue a l'extrémité de couleur vert argenté opaque brillantes au dessus et vert clair blanchâtres au dessous avec une nervation fine porté par un pétiole très courte, mesurant 4 à 6 cm de long et 1 à 1.5 cm de large.	Azzeradj	

Annexe

		Les feuilles sont simple, persistantes, entier, allongés et étroite d'un vert foncé avec une nervation central fine a fine qui s'épaissit vers le pétiole pour former un pétiole court blanc, la face inférieure blanche coutante, mesurer 4 à 7 cm de longueur et 1 à 2 cm de largeur d'une pointe épine.	Avonakar	
		Les feuilles persistantes, entier, ovales, allongé et très dentées à l'extrémité, d'un vert grisâtre et brillantes au dessus et vert clair au dessous avec une médiane approfondi, très étroites, mesurant 4 à 6.5 cm de longueur et 1 cm de largeur portée par un court pétiole.	Amalo	
	<i>O. olester</i>	Les Feuilles portées par un court pétiole, coriaces, persistantes, enroulées sur les bords, d'un vert pâle au-dessus, vert grisâtre au-dessous. La nervure médiane est saillante à la face inférieure, de courtes longueur et largeur moyenne un peut plus arrondies, parfois lancéolées.	Sauvage	
Pistachier	<i>P. lentiscus</i>	Les feuilles persistantes, composées, alternes d'un vert sombre, glabres, coriaces de 2 a 5 cm de largeur, pourvues d'un pétiole ailé, paripennées de 4 à 10 petites folioles elliptiques-obtuses, luisantes en dessus, mates et pâles en dessous d'une nervation central importante.	<i>P. lentiscus</i>	

Annexe

	<i>P. atlantica</i>	Les feuilles sont composées, ovales, d'une couleur verte et nervation central blanchâtre, mince et entière et d'une odeur résineux. La forme de la base de la foliole terminale est atténuée de 3 à 5cm de longueur et 1 à 1,5 cm de largeur caduc, imparipenné (7 à 9 folioles ovales acuminées) porté par un pétiole central assez épaisse que les pétioles secondaire	<i>P. atlantica</i>	
Arbutus	<i>A. unedo</i>	<u>Les feuilles</u> alternes, coriace, elliptique, persistantes, ovales à bordure dentée de 6 a 10 cm de long, 3 a 4 cm de larg, la nervure centrale est plus claire et pennées, la couleur des feuilles est vert foncé brillant, luisant sur le dessus, la dessous verte pale, porté par un pétiole court d'un vert rose.	<i>A. unedo</i>	
Ceratonina		Les feuilles persistantes, entier, épaisse, composées et paripennées compte de 3 à 5 paires de foliole ovoïde, coriace d'un vert sombre luisant au dessus, tirant sur le rouge sur leur face inférieure avec une nervation médiane d'un vert clair, avec un pétiole très court porté sur le pétiole principale, mesurant 4 à 6.5 cm de longueur et 3 à 4.5 cm de largeur.	Lahlou	
	<i>A. siliqua</i>	Les feuilles persistantes, entière, très grandes composées et paripennées compte de 4 à 7 paires de foliole ovoïde, coriace de 10 à 16 cm de longueur et 4 à 7 cm de largeur d'un vert clair brillants avec une nervation central épaisse et approfondi, porté par un pétiole courte sur un pétiole principale assez épaisse.	Tounsi	

Annexe

		Les feuilles persistantes, entier, fine, composées et paripennées compte de 4 à 7 paires de foliole arrondi, coriace d'un vert sombre luisant au dessus, tirant sur le rouge sur leur face inférieure avec une nervation médiane d'un vert sombre, avec un pétiole très court porté sur le pétiole principale, mesurant 3 à 4.5 cm de longueur et 2 à 3 cm de largeur.	Kehekache	
Crataegus	<i>C. monogyna</i>	Feuilles alternes, caduque d'un vert clair, luisantes, les feuilles entières a la base puis divisées à 3, 5 à 7 lobes, sont petites, ovales de 4 a 5 cm de long Elle sont incisées-dentées dès la base et les nervures secondaires se courbent vers l'intérieur du limbe, leur pétiole est long de 1 a 2 cm d'un vert foncé.	<i>C.monogyna</i>	
	<i>C. azarolus</i>	Les feuilles sont caduc, alterne, vert foncé au revers vert grisâtres de forme triangulaire rappelant les pattes d'pies mesurent 3 à 7 cm, entière a la bases puis divisées à 3 parfois à 5 lobes profonds denté a pétiole court et pubescent. La nervation centrale est un peut plus fin de couleur vert clair.	<i>C. azarolus</i>	
	<i>C. monogyna - azarolus</i>	Les feuilles persistantes, alternes, caduques d'un vert clair, entier a la base puis divisées en 3 à 5 lobes profonds, mesurant 3 à 6 cm de longueur à nervation fine, porté par un pétiole court et aussi fine d'un vert clair.	<i>C. monogyna - azarolus</i>	

Glossaire

Glossaire botanique

- ❖ **Dressé (adj.)** : qualifie un élément plus ou moins perpendiculaire au sol.
- ❖ **Akène (nm)** : fruit sec, indéhiscent, formé d'un carpelle qui ne contient qu'une seule graine. Syn. : achène.
- ❖ **Tronc (nm)** : tige âgée des Dicotylédones ligneuses, résultant d'un important développement des tissus secondaires.
- ❖ **Caducue** : Arbre qui perd ses feuilles chaque année.
- ❖ **Capsule** : Fruit sec qui s'ouvre à maturité pour libérer les graines.
- ❖ **Fleur** : Structure reproductrice des angiospermes, une fleur complète comprend le calice, la corolle, l'androcée (étamines) et le gynécée (carpelles) mais toutes les fleurs comprennent au moins une étamine ou un carpelle.
- ❖ **Fruit** : Chez les angiospermes, ovaires (ou groupe d'ovaires) arrivé à maturité et contenant les graines, ainsi que toutes les parties contigües qui peuvent y être fusionnées à maturité, parfois appliqué, à tort, lorsqu'on parle de «fructification» aux structures reproductrices d'autres types d'organismes.
- ❖ **Graine** : Structure provenant de la maturation de l'ovule fécondé chez les spermatophytes.
- ❖ **Arbuste (nm)** : végétal ligneux dont la tige n'est pas ramifiée dès la base et dont la hauteur ne dépasse pas 7 m. Adj. : **arbustif**.
- ❖ **Coriaces (adj.)** : qualifie une feuille tenace, flexible, et plus ou moins épaisse comme le cuir.
- ❖ **Denté (adj.)** : dont le bord présente des saillies pointues et aigües
- ❖ **Sépales (nm)** : un des éléments foliacés, généralement vert, dont l'ensemble compose le calice, protégeant la corolle de la fleur.
- ❖ **Pulpe (nf)** : partie des fruits charnus riche en sucs, souvent sucrée ou/et juteuse. Syn. : **chair**. Adj. : **pulpeux**.
- ❖ **Pétale** : Pièce florale, généralement bien colorée ; partie de la corolle.
- ❖ **Hespéride (nf)** : baie succulente à endocarpe scindé en loges. Syn. : **agrume**
- ❖ **Tomenteux (adj.)** : qualifie un organe couvert de poils cotonneux ayant l'aspect
- ❖ **Foliole (nf)** : chaque division du limbe d'une feuille composée, portée ou pas par un pétiolule.
- ❖ **Pétiole (nm)** : partie rétrécie reliant le limbe d'une feuille à la tige. Adj. : **pétiolé**.

- ❖ **Limbe (nm)** : partie plate et étalée de la feuille prolongeant le pétiole, siège principal de la photosynthèse, de la respiration et de la transpiration du végétal.
- ❖ **Stipules (nf)** : excroissance latérale ou paire de part et d'autre, foliacée ou épineuse, situé à la base d'un pétiole au niveau de sa jonction sur l'axe. Adj.: stipulé, stipuliforme.
- ❖ **Drupe (nf)** : fruit charnu indéhiscent possédant une seule graine enfermée dans un noyau dur.
- ❖ **Glaucque (adj.)** : nuance de couleur imprécise entre le bleuâtre et le verdâtre pale.
- ❖ **Rutacées** : Nom de famille de plantes telles que les agrumes (orange, citron, etc.), la rue, le dictame et le jaborandi. (Les feuilles des rutacées sont ponctuées de glandes transparentes odoriférantes.)
- ❖ **Pédoncule** : Toute pièce allongée ou tige reliant un petit organe terminal à l'ensemble du corps, comme les pédoncules des yeux des crabes, le sporange de la moisissure blanche du pain, etc.
- ❖ **Sessile** : Se dit de tout organe inséré directement sur l'axe et dépourvu de pédoncule.
- ❖ **Polyembryonies** : Formation de deux ou plusieurs embryons par le même ovule à partir de zygotes distincts.
- ❖ **Crevassée** : Creuser quelque chose de crevasses, lézardé, fissurer.
- ❖ **Sclérophylle** : se dit de certaines plantes dont les feuilles dures et épaisses leur permettent de s'adapter à des conditions climatiques arides.
- ❖ **Dioïque** : se dit d'une plante chez laquelle les fleurs mâles et femelles se trouvent sur des pieds séparés.

- ❖ **Anti radicalaire** : neutralise les radicaux libres ayant ainsi un rôle de défense au sein de la membrane et de la cellule
- ❖ **Anti tumorale** : anticancéreux.
- ❖ **Antiallergique** : se dit de ce qui traite les allergies
- ❖ **Antidépresseur** : soulage les symptômes de la dépression et améliore l'humeur du patient
- ❖ **Antidiabétique** : substance, d'origine naturelle ou synthétiques ; utilise contre les infections causées par les bactéries
- ❖ **Anti-inflammatoire** : Soulage des inflammations.
- ❖ **Antimicrobien** : Détruit les microorganismes.
- ❖ **Antioxydant** : Lutte contre le stress oxydatif, protège la cellule d'une oxydation par les radicaux libres et empêche l'altération des composés organiques
- ❖ **Antipyrétique** : médicament utilisé dans le traitement symptomatique de la fièvre.
- ❖ **Antiseptique** : Détruit les micro-organismes responsables des infections.
- ❖ **Antispasmodique** : Calme ou de neutraliser des contractions involontaires des muscles. Ils sont souvent utilisés dans les spasmes digestifs, les douleurs à type de coliques hépatiques ou néphrétiques et les douleurs utérines de la femme.
- ❖ **Antispasmodique** : fait baisser la tension et soulage les spasmes musculaires
- ❖ **Antiviral** : agit contre la multiplication d'un virus
- ❖ **Anxiété** : grande inquiétude, angoisse
- ❖ **Athérosclérose** : sclérose artérielle secondaire à l'athérome.
- ❖ **Cardiotonique** : médicament augmentant la force de contraction du cœur.
- ❖ **Cardiovasculaires** : sont les maladies qui concernent le cœur et la circulation
- ❖ **Cholécystokinétique**: favorise l'évacuation de la vésicule biliaire
- ❖ **Cholérétique** : stimule la sécrétion hépatique de la bile
- ❖ **Colique** : douleur spasmodiques liée à la distension du tube digestif, des canaux glandulaires ou des voies urinaire
- ❖ **Cytotoxique** : se dit des substances nocives pour les cellules, ayant donc la propriété de les détruire
- ❖ **Diurétique** : Stimule la production d'urine.
- ❖ **Eczéma** : syndrome caractérisant plusieurs maladies cutanées, d'origine immunoallergique mais de mécanisme variable, se manifestent, dans sa forme aigue par des lésions rouges, suintantes et très prurigineuses.

- ❖ **Effet antioxydant** : protège l'organisme contre les dommages causés par les radicaux libres et diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.
- ❖ **Fissures anales** : type d'ulcération allongé, en forme de crevasse, siégeant au niveau du canal anal.
- ❖ **Hémorroïdes** : Elargissement des veines d'anus et du rectum.
- ❖ **Hypocholestérolémiant** : sont des médicaments qui visent à diminuer le taux sanguin de cholestérol pour le rapprocher des valeurs normales.
- ❖ **Insomnies** : insuffisance ou absence de sommeil.
- ❖ **Insuffisance rénale** : réduction de la capacité des reins à assurer la filtration et l'élimination des produits de déchet du sang, à contrôler l'équilibre du corps en eau et en sels et à régulariser la pression sanguine.
- ❖ **L'asthme** : affection inflammatoire chronique des bronches.
- ❖ **L'hypertension artérielle** : élévation anormale, permanente ou paroxystique, de la tension artérielle au repos.
- ❖ **La dysenterie** : syndrome infectieux caractérisé par l'émission de selles glaireuses et sanglantes mêlées ou non à des matières fécales.
- ❖ **La tachycardie** : accélération de la fréquence des battements du cœur au-delà de 90 pulsations par minute.
- ❖ **Laxatif** : Favorise l'évacuation des selles.
- ❖ **Sédative** : médicament qui calme l'activité d'un organe ou du psychisme
- ❖ **Stomachique** : qui est bon pour l'estomac.
- ❖ **Stomachiques** : se dit de ce qu'est bon pour l'estomac
- ❖ **Sudorifiques** : se dit de ce qui provoque la sudation
- ❖ **Thrombose** : phénomène pathologique consistant en la formation d'un thrombus dans une artère ou une veine
- ❖ **Tonique** : Fortifie ou stimule l'activité de l'organisme.
- ❖ **Tonique** : Fortifie ou stimule l'activité de l'organisme.
- ❖ **Troubles digestifs** : regroupent un ensemble de symptômes liés au fonctionnement de l'appareil digestif
- ❖ **Tuberculose pulmonaire** : maladie infectieuse due à une bactérie
- ❖ **Varice** : dilatation permanente d'une veine. affection fréquente au niveau des jambes
- ❖ **Veinotonique** : sont des médicaments destinés à traiter les troubles de la circulation veineuse. également phlébotoniques, ils sont administrés par voie orale ou en application cutanée, leur propriété est d'augmenter le tonus de la paroi veineuse
- ❖ **Vermifuge** : qui a la propriété d'expulser les vers intestinaux.

Résumé

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Le but du présent travail est d'évaluer la composition de feuilles de 25 arbres algériennes appartenant à 7 genres (*Citrus*, *Quercus*, *Pistacia*, *Arbutus*, *Crataegus*, *Ceratonia*, *Olea*) en polyphénols et d'étudier leurs activités antioxydants et antityrosinase. Les extraits éthanoliques des feuilles des différentes espèces végétales étudiées montrent que ces feuilles sont riches en substances actives polyphénoliques (flavonoïdes et tannins). Les plus riches sont les feuilles de Pistachier et d'*Arbutus unedo*. Les tests d'activité antioxydants (DPPH, ABTS et chélation des métaux) montrent que les extraits éthanoliques, ont des activités antioxydants qui varient significativement selon le genre et l'espèce végétale. Ainsi, Les IC50 de l'activité de piégeage le radicale DPPH, varient entre 1 µg/ml marqué par les Pistachier jusqu'à 55 µg/ml pour le genre *Citrus* et les IC50 de l'activité anti-radical ABTS varient entre 08 µg/ml pour le genre *Pistacia* à 0.9 mg/ml pour le genre *Citrus*. Les meilleurs pouvoirs de chélation du fer ont été enregistrés par les *Citrus*. Les extraits de feuilles des espèces des genres *Pistacia*, *Arbutus*, *Citrus* et *Ceratonia* présentent des activités inhibitrices de la tyrosinase de champignon de Paris *Agaricus bisporus*; dont la meilleure efficacité est marqué par *Pistacia lentiscus*.

Mots clés: Tyrosinase, plantes médicinales, stress oxydatif, activité antioxydante, activité antityrosinase.

Abstract

The Knowledge and use of medicinal plants are a real heritage of human beings. Their importance in the field of public health is very pronounced in recent years owing to therapeutic that it provide. The objective of this study was to evaluate the composition of leaves of 25 Algerian trees belonging to 7 genera (*Citrus*, *Quercus*, *Pistacia*, *Arbutus*, *Crataegus*, *Ceratonia*, *Olea*) polyphenols and to study their antioxidant and anti-tyrosinase activity. The ethanol extracts of the leaves of different plant species studied show that these leaves are rich in polyphenolic active substances (flavonoids and tannins). The richest are the leaves Pistachio and *Arbutus unedo*. Antioxidant activity tests (DPPH, ABTS and chelation of metals) showed that ethanol extracts have antioxidant activities, which change significantly depending on the type and the plant species. Thus, The IC50 of scavenging activity on DPPH radical, ranging from 1 µg / ml marked by Pistachio up to 55 µg/ml for the *Citrus* gender and IC50 ABTS anti-radical activity fluctuate between 08 µg/ml Pistaciagender and 0.9 mg/ml for the *Citrus*gender. The best iron chelation powers have been recorded by *Citrus*. Leaf extracts of species *Pistacia*, *Arbutus*, *Citrus* and *Ceratonia*gender exhibit inhibitory activities of tyrosinase of *Agaricus bisporus* mushroom Paris, of which, the best efficiency is marked by *Pistacialentiscus*.

Keywords: tyrosinase, medicinal plants, oxydatif stress, antioxydante activity, antityrosinase activity.

ملخص

يعود معرفة واستخدام النباتات الطبية من طرف الإنسان منذ الأزل. وأهميتها في مجال الصحة العامة واضح جدا في السنوات الأخيرة، ويعود ذلك إلى الخصائص الصحية التي تتمتع بها. الغرض من هذه الدراسة تقييم تركيبة أوراق 25 شجرة جزائرية منتمية إلى 7 أصناف (الحمضيات، البلوط، البطم، القطلب، زعرور، سيراتونيا، أوليا) من حيث مادة البوليفينول المضاد للأكسدة ودراسة النشاط المضاد للإنزيم تيروزيناز. أظهرت التقدير الكمي لمستخلصات الإيثانولية لمختلف الأوراق النباتية أنها غنية بمادة البوليفينول. من ناحية الكمية تعتبر أوراق البطم، القطلب من أغنى المستخلصات. كما أظهرت اختبارات النشاط المضادة للأكسدة DPPH, ABTS واختبار فخ المعادن ذات القطبين كالحديد نتائج معتبرة مختلفة باختلاف الأنواع و الأصناف النباتية. كما أظهرت النتائج تركيز كدح % 50 لجذر DPPH ينسب تحول بين 1 µg/ml الذي سجل عند الصنف النباتي البطم إلى 55 µg/ml للحمضيات. نتائج التركيزات لكبح 50 لجذر ABTS أظهرت أيضا قوة فعالية لصنف النباتي البطم 08 µg/ml و تبقى الحمضيات دائما الصنف الذي سجل أدنى فعالية من حيث النشاط الإرجاعي لجذر ABTS. اختلافاً لهذه النتائج سجلت الحمضيات النسب الأعلى من حيث فخ المعادن ذات القطبين. كما أظهرت المستخلصات الإيثانولية للحمضيات، البطم، القطلب والخروب نتائج معتبرة من حيث تثبيط نشاط الإنزيم تيروزيناز لفطر *Agaricus bisporus* والفعالية القصوى قد سجلت من طرف النوع النباتي *Pistacialentiscus*.