

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOU MAMMARI DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologie

Présenté par :

Mr MOUALEK Idir

Sujet :

Activités biologiques de l'extrait aqueux de feuilles
d'*Arbutus unedo* de la région de Tizi-Ouzou.

Devant le jury composé de :

Président : Pr MATI MOULTI Farida (Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou).

Directeur de thèse : Pr HOUALI Karim (Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou).

Co-Directeur de thèse : Pr ZERROUG Mohamed Mihoub (Université Ferhat Abbas de Sétif).

Examineur 1 : Pr NABTI El hafid (Université Abderrahmane Mira de Béjaia).

Examineur 2 : Dr KHENCHOUCHE Abdelhalim (Université Ferhat Abbas de Sétif).

Examineur 3 : Dr BOUAZZA Belaid (Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou).

Soutenu le :

Remerciements

J'exprime mes remerciements et ma gratitude à Monsieur HOUALI K., Professeur en Biochimie Appliquée à l'Université MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou, pour m'avoir guidé et encouragé pendant toute la durée de mon travail, ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de celui-ci.

Je tiens à remercier très chaleureusement Madame MATI MOULTI Farida Professeur à l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou pour avoir accepté de présider le jury.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur NABTI El hafid Professeur à l'Université Abderrahmane Mira de Béjaia pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Monsieur KHENCHOUCHE Abdelhalim Maitre de Conférences A à l'Université Ferhat Abbas de Sétif pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus cordiaux vont aussi à Monsieur BOUAZZA Belaid Maitre de Conférences A l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou pour avoir accepté de juger ce travail.

Ces remerciements ne seraient être complets sans un mot pour mes collègues avec qui de belles amitiés se sont développées.

Je remercie vivement les personnes qui ont apporté leur aide pour la réalisation de ce travail.

Dédicaces

En hommage et à la mémoire de mes grands parents.

A mes parents, pour leur soutien inconditionnel, leur sacrifice, ainsi qu'à l'ensemble de ma famille pour son soutien sans faille.

A ma femme, pour ses encouragements, son dévouement et son appui à toutes mes entreprises.

A mes amis et collègues auxquels j'exprime ma sympathie.

Sommaire

Sommaire

Pages

Introduction

01

1- Synthèse bibliographique

1-1-Les plantes médicinales.....	03
1-2- <i>Arbutus unedo</i>	03
1-3-Répartition géographique.....	05
1-4-Description botanique	06
1-5-Utilisation traditionnelle	08
1-6-Composition	08
1-7-Activités biologiques	09
1-8-Métabolites secondaires	12
1-8-1-Classification.....	13
1-8-1-1-Alcaloïdes	14
1-8-1-2-Terpènes.....	14
1-8-1-3-Les composés phénoliques.....	16
1-8-1-3-1-Activités biologiques.....	19
• Activité antioxydante	19
• Activité anti-inflammatoire.....	23
• Activité antiallergique	23
• Activité anti-ulcère	23
• Effet sur le système cardiovasculaire.....	24
• Activité anticancéreuse	24
• Activité antiparasitaire.....	27
• Activité antibactérienne.....	27

2- Matériel et méthodes

2-1-Matériel	29
2-1-1-Matériel végétal.....	29
2-1-2-Souches bactériennes.....	29
2-1-3-Prélèvements sanguins	29
2-1-4-Prélèvements salivaires.....	30
2-1-5-Prélèvements urinaires.....	30
2-2-Méthodes	30
2-2-1-Préparation de l'extrait.....	30
2-2-2-Détermination de la teneur en polyphénols totaux	30
2-2-3-Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux.....	31
2-2-4-Détermination de la teneur en tanins totaux.....	31
2-2-5-Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	32
2-2-6-Inhibition du blanchiment du β -carotène.....	33
2-2-7-Piégeage du radical hydroxyle.....	34
2-2-8-Piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	34
2-2-9- Réduction du molybdène.....	35
2-2-10-Réduction du fer.....	35
2-2-11-Chélation du fer.....	36
2-2-12-Tests d'hémolyse.....	36

2-2-12-1-Hémolyse induite par une solution hypotonique.....	36
2-2-12-2-Hémolyse induite par la chaleur.....	37
2-2-12-3-Hémolyse induite par un oxydant.....	37
2-2-12-4-Inhibition de la dénaturation thermique de la BSA.....	38
2-2-12-5-Activité thrombolytique.....	38
2-2-12-6-Inhibition de la peroxydation des membranes érythrocytaire.....	39
2-2-12-6-1-Préparation des membranes érythrocytaires.....	39
2-2-12-6-2-Peroxydation des membranes érythrocytaires.....	39
2-2-13-Capacité de liaison aux acides biliaires.....	40
2-2-13-1- Courbe étalon de l'acide cholique	40
2-2-13-2- Inhibition de la diffusion de l'acide cholique	40
2-2-13-3-Capacité d'adsorption de l'acide cholique.....	41
2-2-14-Activité hypocholestérolémiante.....	41
2-2-14-1- Courbe étalon du cholestérol	41
2-2-14-2- Inhibition de la diffusion du cholestérol	41
2-2-14-3-Capacité d'adsorption du cholestérol.....	42
2-2-15-Activité hypoglycémiante.....	42
2-2-15-1- Courbe étalon du glucose	42
2-2-15-2- Inhibition de la diffusion du glucose.....	43
2-2-15-3-Capacité d'adsorption du glucose.....	43
2-2-15-4-Consommation du glucose par les levures.....	44
2-2-15-5-Inhibition de la glycation de la BSA.....	44
2-2-16-Interaction plante-liquides biologiques.....	44
2-2-16-1-Effet sur la réduction du molybdène.....	45
2-2-16-2-Effet sur la réduction du fer.....	45
2-2-17-Activité antibactérienne.....	46
2-2-17-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices.....	47
2-2-18-Activité anti-leishmania.....	47
3- Résultats et discussion	
3-1-Détermination de la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux.....	48
3-2-Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.....	51
3-3-Inhibition du blanchiment du β -carotène.....	52
3-4-Piégeage du radical hydroxyle.....	54
3-5-Piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	55
3-6-Réduction du molybdène.....	56
3-7-Réduction du fer.....	57
3-8-Chélation du fer.....	58
3-9-Effet de l'extrait sur les membranes érythrocytaires.....	59
3-9-1-Innocuité de l'extrait vis-à-vis des cellules érythrocytaires.....	59
3-9-2-Protection des érythrocytes vis-à-vis d'un stress osmotique.....	60
3-9-3-Protection des érythrocytes vis-à-vis de la chaleur.....	61
3-9-4-Protection des érythrocytes vis-à-vis d'un oxydant.....	62
3-9-5-Inhibition de la dénaturation thermique de la BSA.....	63
3-9-6-Activité thrombolytique.....	64
3-9-7-Inhibition de la peroxydation des membranes érythrocytaires.....	65
3-10-Effet hypocholestérolémiant.....	67
3-10-1- Courbe étalon de l'acide cholique	67
3-10-2-Inhibition de la diffusion de l'acide cholique.....	67
3-10-3- Capacité d'adsorption de l'acide cholique	68
3-10-4- Courbe étalon du cholestérol	70

3-10-5-Inhibition de la diffusion du cholestérol.....	70
3-10-6- Capacité d'adsorption du cholestérol	71
3-11-Effet hypoglycémiant.....	73
3-11-1- Courbe étalon du glucose	73
3-11-2-Inhibition de la diffusion du glucose.....	73
3-11-3- Capacité d'adsorption du glucose	75
3-11-4-Inhibition de la consommation du glucose par les levures.....	76
3-11-5-Inhibition de la glycation de la BSA.....	78
3-12- Effet de l'interaction plante-liquides biologiques sur la réduction du molybdène et du fer.....	80
3-12- 1- Combinaison plante-salive	81
3-12- 2- Combinaison plante-BSA	84
3-12- 3- Combinaison plante-plasma sanguin	87
3-12- 4- Combinaison plante-urine	91
3-13- Activité antibactérienne.....	94
3-14- Activité antileishmanienne.....	98
Conclusion.....	101
Références bibliographiques	
Annexe	
Publication 1	
Publication 2	

Liste des abréviations

ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).
AGE	Produits finaux de glycation avancée.
ATCC	Collection de culture type américaine.
BHIB	Bouillon cœur-cerveille.
BHT	Hydroxytoluène butylé.
BSA	Albumine sérique bovine.
CMI	Concentration minimale inhibitrice.
COV	Composés organiques volatils.
COX	Cycloxygénases.
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.
EAG	Equivalent acide gallique.
EAT	Equivalent acide tannique.
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique.
ERO/ROS	Espèces réactives de l'oxygène.
FRAP	Pouvoir antioxydant réducteur de l'ion ferrique.
HSA	Sérum albumine humaine.
IC50	Concentration inhibitrice médiane.
LABAB	Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies.
LOX	Lipoxygénases.
MDA	Malondialdéhyde.
MWCO	Coupe de poids moléculaire.
NNN	Novy, Mc Neal et Nicolle.
OGTT	Test de tolérance au glucose par voie orale.
PAF	Platelet activating factor.
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.
PB	Tampon phosphate.
PBS	Tampon phosphate salin.
PLA ₂	Phospholipases A ₂ .
QE	Equivalent quercitine.
RAGE	Récepteur de produits finaux de glycation avancée.
RNS	Espèces réactives d'azote.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute.
SDS	Dodécyl sulfate de sodium.
TAC	Capacité antioxydante totale.
TBA	Thiobarbiturique.
TBARS	Substances réactives de l'acide thiobarbiturique.
TCA	Acide trichloracétique.
TEA	Triéthanolamine.
TEMED	N,N,N',N' - tetraméthyl-éthylène diamine.
Tris	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane.
UFC	Unité formant colonie.

Liste des figures

Figure	Titre	page
1	Nombre de plantes utilisées pour remédier aux maladies les plus fréquentes.	4
2	Répartition géographique mondiale d' <i>Arbutus unedo</i> L.	6
3	<i>Arbutus unedo</i> L.	7
3A	Ecorce d'Arbousier.	7
3B	Fruits d'Arbousier à différents stades de maturation.	7
3C	Feuille d'Arbousier face inférieure.	7
3D	Feuille d'Arbousier face supérieure.	7
3E	Fleur d'Arbousier.	7
4	Fonctions des métabolites secondaires.	13
5	Effets biologiques des polyphénols.	17
6	Classification des polyphénols.	17
7	Fraction de catéchol du cycle B.	21
8	Liaison 2,3-double en conjugaison avec une 4-oxofonction d'un groupe carbonyle dans le cycle C.	21
9	Groupes hydroxyle en position 3 et 5.	21
10	Groupement hydroxyle en position C3 sur le cycle C.	22
11	Formation des AGE et sites d'inhibition par les flavonoïdes de leur formation (*).	25
12	Représentation schématique représentant le processus de la carcinogenèse et les effets biologiques des polyphénols à chaque étape.	26
13	Courbe étalon de l'acide gallique.	48
14	Courbe étalon de la quercétine.	49
15	Courbe étalon de l'acide tannique.	49
16	Capacité de piégeage du DPPH de l'extrait et de la vitamine C.	52
17	Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène par l'extrait et le BHT.	54
18	Capacité de piégeage du radical hydroxyle de l'extrait et de la vitamine C.	55
19	Capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène de l'extrait et de la vitamine C.	56
20	Capacité de réduction du molybdène par l'extrait et par la vitamine C.	57
21	Capacité de réduction du fer par l'extrait et par la vitamine C.	58
22	Capacité de chélation du fer par l'extrait et L'EDTA.	59
23	Densité optique du test d'hémolyse de l'extrait comparée à la saponine.	60
24	Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis d'un stress osmotique.	61
25	Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis de la chaleur.	62
26	Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis d'un oxydant.	63
27	Pourcentage de protection de la BSA vis-à-vis d'une dénaturation thermique.	64
28	Pourcentage de thrombolyse induit par l'extrait.	65
29	Pourcentage de protection des membranes érythrocytaires vis-à-vis de la peroxydation.	66
30	Courbe étalon de l'acide cholique.	67
31	Concentration en acide cholique diffusée.	68

32	Pourcentage d'adsorption de l'acide cholique.	69
33	Courbe étalon du cholestérol.	70
34	Concentration en cholestérol diffusée.	71
35	Pourcentage d'adsorption du cholestérol.	72
36	Courbe étalon du glucose.	73
37	Concentration en glucose diffusé.	75
38	Pourcentage d'adsorption du glucose.	76
39	Pourcentage d'inhibition de la consommation du glucose par <i>saccharomyces cerevisiae</i> .	77
40	Electrophorégramme de la BSA en PAGE-SDS.	79
41	Pourcentage de réduction du molybdène en fonction du volume de salive.	82
42	Pourcentage de réduction du fer en fonction du volume de salive.	83
43	Pourcentage de réduction du molybdène par la combinaison salive-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.	83
44	Pourcentage de réduction du fer par la combinaison salive-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.	84
45	Pourcentage de réduction du molybdène en fonction de la concentration en BSA.	86
46	Pourcentage de réduction du fer en fonction de la concentration en BSA.	86
47	Pourcentage de réduction du molybdène par la combinaison BSA-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.	87
48	Pourcentage de réduction du fer par la combinaison BSA-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.	87
49	Pourcentage de réduction du molybdène en fonction du volume de plasma sanguin.	90
50	Pourcentage de réduction du fer en fonction du volume de plasma sanguin.	90
51	Pourcentage de réduction du molybdène par la combinaison plasma-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.	91
52	Pourcentage de réduction du fer par la combinaison plasma-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.	91
53	Pourcentage de réduction du molybdène en fonction du volume d'urine.	93
54	Pourcentage de réduction du fer en fonction du volume d'urine.	93
55	Pourcentage de réduction du molybdène par la combinaison urine-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.	94
56	Pourcentage de réduction du fer par la combinaison urine-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.	94
57	Pourcentage de mortalité des promastigotes en fonction de la concentration en extrait.	99
58	Pourcentage de mortalité des promastigotes pour la Fungizon (100mg/ml).	99

Liste des tableaux

Tableau	Titre	pages
1	Classification taxonomique d'<i>Arbutus unedo</i> L.	5
2	Classification des polyphénols.	18
3	Résultats du dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins.	50
4	Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait aqueux en mm.	95
5	CMI de l'extrait vis-à-vis des souches sensibles.	98

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer plusieurs des activités biologiques de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* L, une plante médicinale de la pharmacopée traditionnelle de l'Algérie.

Arbutus unedo est une plante d'intérêt médicinal au regard des nombreuses études rapportées par la littérature spécialisée et de nombreuses molécules bioactives qui rentrent dans la composition des différentes parties de cette plante.

L'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* L, a montré une activité antioxydante appréciable. Sa capacité de piégeage du radical DPPH, du radical OH et du H₂O₂ a été respectivement estimé par une IC₅₀ de 7.956 ± 0.278 µg/ml, 1015.74 ± 46.35 µg/ml et 114.77 ± 16.86 µg/ml. L'extrait a présenté une IC₅₀ pour sa capacité antioxydante totale de 461.67 ± 4.16 µg/ml et de 156.55 ± 17.40 µg/ml pour son pouvoir réducteur de l'ion ferrique.

L'appréciation de la capacité antioxydante de l'extrait a été aussi effectuée par le test d'inhibition du blanchiment du β -carotène où nous avons enregistré une inhibition de 87.04 ± 1.21 % de l'extrait à la concentration de 1mg/ml et le test de chélation des ions ferreux estimée par une IC₅₀ de 1014.30 ± 36.21 µg/ml.

L'extrait aqueux étudié a présenté un effet stabilisateur des membranes érythrocytaires vis-à-vis d'un stress osmotique ($76.46 \pm 1.80\%$), oxydant induit par le HOCL (73.90 ± 2.08 %) et la chaleur (79.66 ± 1.92 %). Il a aussi présenté un effet inhibiteur de la peroxydation des membranes érythrocytaires ($57.8 \pm 3.16\%$) et un effet thrombolytique (23.42 %). De plus, l'extrait protège la BSA vis à vis de la dénaturation thermique ($74.28 \pm 0.86\%$).

Dans le cadre de l'évaluation de l'effet hypoglycémiant et hypocholestérolémiant, l'extrait a montré une activité appréciable qui dépasse les 50 % de chélation et de retardation de diffusion de l'acide cholique, du cholestérol et du glucose. Ainsi qu'une inhibition appréciable à la fois de la consommation du glucose par *Saccharomyces cerevisiae* (28.17 %) et de la glycation de la BSA (91%).

L'étude de l'effet de la combinaison de l'extrait avec la salive, le plasma sanguin, l'urine et la BSA sur sa capacité antioxydante a révélé une synergie importante.

L'étude de l'activité antibactérienne et antiparasitaire de l'extrait végétal a montré une activité relativement importante vis-à-vis de *Bacillus cereus* 10876, *Enterococcus faecalis* 49452, *Listeria monocytogene* 15313, *Proteus mirabelis* 35659, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Salmonella typhimurium* 13311, *Staphylococcus aureus* 43300 et de *Leishmania infantum*.

La somme des résultats obtenus au cours de cette étude montre clairement que l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* possède un potentiel important pour les activités biologiques investiguées. De ce fait, les feuilles *Arbutus unedo* constituent une source potentielle de molécules bioactives et ainsi constituent une alternative thérapeutique au traitement de nombre de pathologies initiées par le stress oxydant.

Mots clés : *Arbutus unedo* L. / antioxydant/ érythrocyte/ hypocholestérolémiant/ hypoglycémiant/ antimicrobien/ *Leishmania infantum*

Abstract

The objective of this study is to evaluate several of the biological activities of the aqueous extract of leaves of *Arbutus unedo* L, a medicinal plant of the traditional pharmacopoeia of Algeria.

Arbutus unedo is a plant of medicinal interest in view of the numerous studies reported by the specialized literature and of numerous bioactive molecules which are part of the different parts of this plant.

The aqueous extract of *Arbutus unedo* L leaves showed appreciable antioxidant activity. Its capacity to trap the DPPH radical, the OH radical and the H₂O₂ was estimated by an IC₅₀ of 7.956 ± 0.278 µg / ml, 1015.74 ± 46.35 µg / ml and 114.77 ± 16.86 µg / ml respectively. The extract showed an IC₅₀ for its total antioxidant capacity of 461.67 ± 4.16 µg / ml and 156.55 ± 17.40 µg / ml for its ferric ion reducing power.

Evaluation of the antioxidant capacity of the extract was also carried out by the β -carotene bleaching inhibition test where we recorded an inhibition of $87.04 \pm 1.21\%$ of the extract at a concentration of 1 mg / ml and the ferrous ion chelation test estimated by an IC 50 of 1014.30 ± 36.21 µg / ml.

The aqueous extract studied showed a stabilizing effect of erythrocyte membranes on osmotic stress ($76.46 \pm 1.80\%$), oxidation induced by HOCL ($73.90 \pm 2.08\%$) and heat ($79.66 \pm 1.92\%$). . It also exhibited an inhibitory effect of peroxidation of erythrocyte membranes ($57.8 \pm 3.16\%$) and a thrombolytic effect (23.42%). In addition, the extract protects the BSA against thermal denaturation ($74.28 \pm 0.86\%$).

As part of the evaluation of the hypoglycaemic and cholesterol-lowering effect, the extract showed an appreciable activity which exceeded 50% chelation and delayed diffusion of cholic acid, cholesterol and glucose. As well as appreciable inhibition of both glucose consumption by *Saccharomyces cerevisiae* (28.17%) and glycation of BSA (91%).

The study of the effect of the interaction of the extract with saliva, blood plasma, urine and BSA on its antioxidant capacity revealed an important synergy.

The study of the antibacterial and antiparasitic activity of the plant extract showed a relatively high activity with respect to *Bacillus cereus* 10876, *Enterococcus faecalis* 49452, *Listeria monocytogenes* 15313, *Proteus mirabilis* 35659, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Salmonella typhimurium* 13311, *Staphylococcus aureus* 43300 and *Leishmania infantum*.

The sum of the results obtained during this study clearly shows that the aqueous extract of *Arbutus unedo* leaves possesses an important potential for the biological activities investigated. As a result, *Arbutus unedo* leaves are a potential source of bioactive molecules and thus constitute a therapeutic alternative to the treatment of many pathologies initiated by oxidative stress.

Key words: *Arbutus unedo* L. / antioxidant / erythrocyte / hypocholesterolemic / hypoglycemic / antimicrobial / *Leishmania infantum*

Introduction

Introduction

Les molécules bioactives issues des végétaux, en raison de leurs multiples activités biologiques, suscitent actuellement un intérêt particulier dans les domaines sanitaire, agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Le regain d'intérêt en thérapeutique pour ces biomolécules est motivé par le fait qu'elles présentent des effets secondaires limités ou inexistants comparativement aux molécules synthétiques qui en plus de causer de nombreux effets secondaires indésirables présentent des limites thérapeutiques. L'exemple le plus marquant est l'émergence de bactéries multi-résistantes en raison de l'utilisation abusive des antibiotiques rendant difficile la maîtrise des infections bactériennes et constitue un problème de santé publique important à l'échelle mondiale. De plus, l'utilisation des antioxydants synthétique particulièrement en agroalimentaire en raison de leur stabilité dans les conditions opératoires de la plupart des procédés industriels augmente l'incidence du cancer.

Face à cette situation alarmante, la recherche scientifique se tourne vers les plantes qui constituent une réserve intarissable en molécules bioactives naturelles.

Les propriétés thérapeutiques de ces plantes dites médicinales sont dues à des molécules bioactives synthétisées par celles-ci et connues sous l'appellation de métabolites secondaires (polyphénols, alcaloïdes, terpènes etc.). De nombreux métabolites secondaires, essentiellement les polyphénols, constituent un système de défense élaboré car ils protègent les plantes contre nombre d'agressions biotiques et abiotiques. Ces molécules sont d'ailleurs synthétisées dans des conditions de stress.

Les polyphénols sont aussi connus pour leurs nombreuses activités biologiques qui influencent directement la santé humaine via l'alimentation. Ils ont plusieurs utilisations dans l'industrie cosmétique, agroalimentaire et pharmaceutique. Toutefois, ils sont plus connus pour leur importante activité antioxydante et peuvent agir directement par le piégeage des ERO (espèces réactives de l'oxygène).

L'Algérie de part sa grande superficie et la variation du climat en partant du nord au sud et de l'est à l'ouest, la diversité des espèces se trouve confronté à des variations de différentes natures ce qui entraîne une variation même au sein d'une même espèce

des lors qu'elle occupe des biotopes différents. Parmi les plantes médicinales qui constituent son couvert végétal, se trouve *Arbutus unedo* communément appelé arbousier. Cette plante est largement représentée au nord du territoire national et plus particulièrement en Kabylie. L'arbousier ou arbre aux fraises, de la famille des Ericacées, est un arbrisseau sauvage au feuillage persistant. Il est utilisé en médecine traditionnelle pour ses nombreuses vertus, sa racine en décoction est utilisée contre l'hypertension artérielle, son écorce comme agent diurétique et ses feuilles comme astringent et antiseptique.

Notre travail de recherche s'inscrit dans l'axe de valorisation des produits naturels, l'un des axes de recherche édifié par le LABAB (Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies). Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'arbousier, une plante médicinale largement utilisée dans la région de Tizi-Ouzou. Connues pour leurs richesses en composés phénoliques, les feuilles d'*Arbutus unedo*, sont la partie de la plante la plus étudiée et la plus documentée dans la littérature scientifique. Ces travaux ont confirmé plusieurs vertus thérapeutiques attribuées par la médecine traditionnelle à cette plante. De plus, ils ont ouvert plusieurs voies de recherche pour de nouvelles pistes thérapeutiques à plusieurs maladies comme les maladies neurodégénératives (EBNER *et al*, 2011), cardiovasculaires (AFKIR *et al*, 2008) et le cancer (TAVARES *et al*, 2010).

Dans cette optique, notre travail porte sur deux aspects des activités biologiques de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* de la région de Tizi-Ouzou :

Le premier est la détermination de l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, hypoglycémiant, hypocholestérolémiant, antiparasitaire et antibactérienne.

Le deuxième, est la détermination de l'activité antioxydante d'un mélange de l'extrait étudié avec la salive, le plasma sanguin, l'urine et la BSA afin d'étudier une possible interaction.

Synthèse
Bibliographique

1-Synthèse bibliographique

1-1-Les plantes médicinales

L'utilisation des plantes médicinales en Algérie est en nette diminution, en raison d'un secteur sanitaire en continuel développement. Elle reste néanmoins fortement implantée dans les zones reculées comme le Hoggar où les touaregs transmettent le secret de cette médication traditionnelle de père en fils (REGUIEG, 2011).

En Kabylie, l'utilisation des plantes médicinales reste très restreinte et est exclusivement du ressort des matriarches, gardiennes de cette tradition.

Avec près de 98 plantes médicinales identifiées, la wilaya de Tizi-Ouzou présente un potentiel d'étude important et prometteur. Les familles de plantes les plus utilisées dans cette région sont les Lamiaceae (avec 13 espèces), Les Asteraceae (avec 12 espèces), les Rosaceae (avec 6 espèces) et les Fabaceae (avec 4 espèces). Ces plantes, utilisées seules ou en combinaison servent à soigner un nombre important de maladies et de symptômes, ceux-ci sont indiqués en figure (1) associés au nombre de plantes pouvant être utilisées (Meddour R et Meddour S, 2015).

L'arbousier ou « Lendj » est une plante connue à Tizi-Ouzou sous le nom de « assinou ». Elle est très répandue en raison de sa tolérance à la sécheresse et sa capacité de régénération particulièrement après un incendie (SANTO *et al*, 2012).

Une étude ethnobotanique récente réalisée par BOUZID *et al* (2016) dans la région de Sidi Bel Abbès a montré que les troubles métaboliques occupent la première place dans l'utilisation de cette plante suivies des affections digestives, des troubles urinaires, des troubles de l'appareil génital et enfin des affections cutanées.

1-2-*Arbutus unedo*

Communément appelé arbre aux fraises, il tire son nom de « arbois » signifiant bois austère et de « unum edo » signifiant un seul fruit. Il appartient à la famille des Ericaceae, couvrant environ 80 genres et plus de 2000 espèces, principalement des arbustes et des buissons verts toute l'année, dont un tiers appartient au genre Erica, qui donne son nom à la famille (Font Quer, 1995). La plus forte densité pour les Ericaceae est localisée sous le climat méditerranéen, et s'accompagne d'une variabilité génétique importante (PRESTON et HILL,

1997). Celle-ci, induit plusieurs chémotypes dont les variations qualitatives et quantitatives peuvent affecter les activités biologiques des métabolites secondaires.

La position taxonomique de cette espèce est représentée dans le tableau (1)

Arbutus avec cinq autres genres (*Arctostaphylos*, *Arctous*, *Comarostaphylis*, *Ornithostaphylos* et *Xylococcus*) est inclus dans la sous-famille des Arbutoideae. Les Arbutoideae sont un groupe de la famille des Ericaceae, dont la distinction est basée sur la morphologie des fruits et des fleurs, ainsi que dans les caractéristiques anatomiques et phytochimiques (HILEMAN *et al*, 2001).

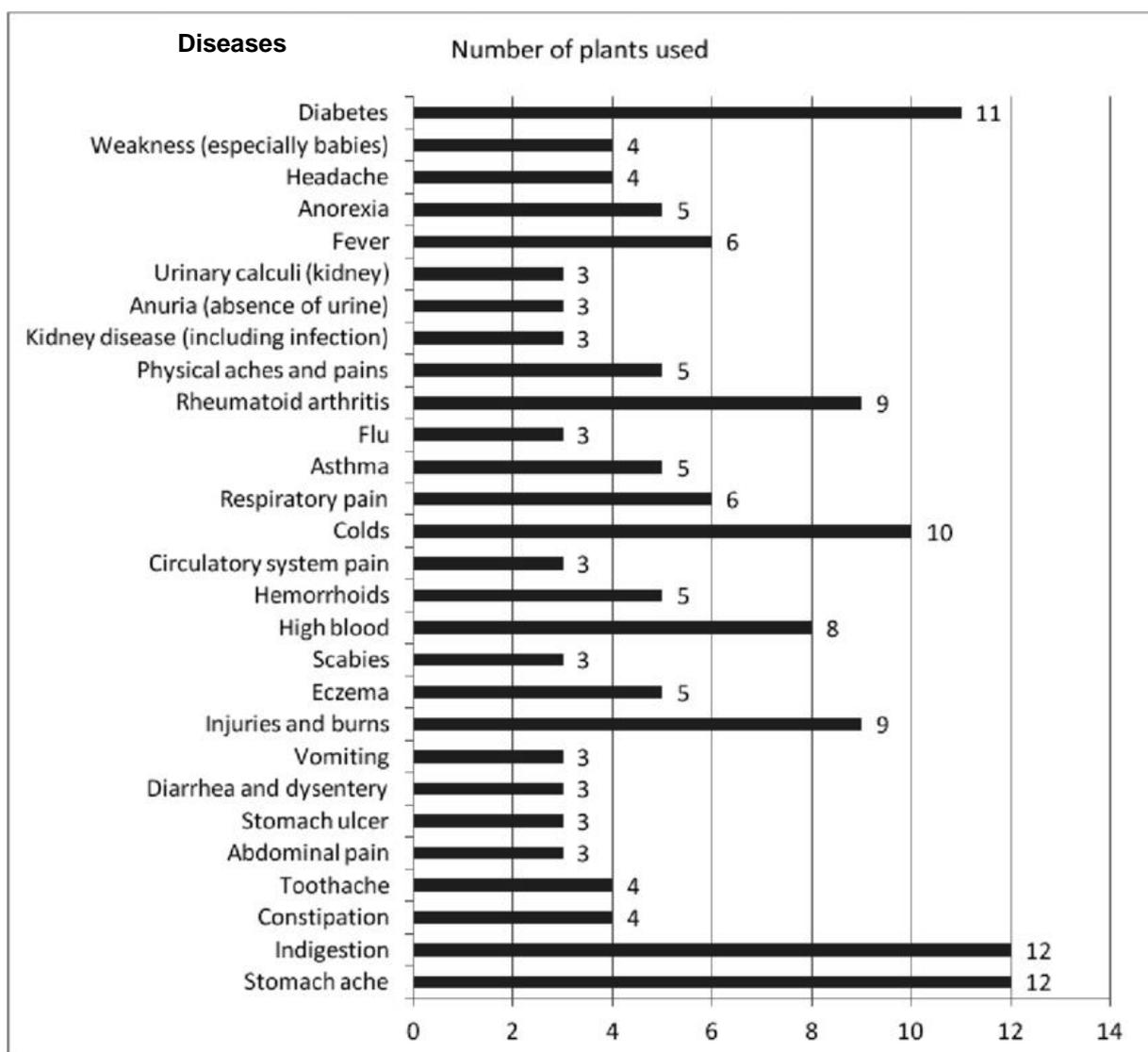


Figure 1 : Nombre de plantes utilisées pour remédier aux maladies les plus fréquentes (Meddour R et Meddour S, 2015).

Tableau 1 : Classification taxonomique d'*Arbutus unedo* L. (JUDD *et al*, 2002).

Règne	végétal
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Ericales
Famille	Ericaceae
<i>Genre</i>	<i>Arbutus</i>
Espèce	<i>Arbutus unedo</i>

1-3-Répartition géographique

Arbutus unedo est l'une des espèces les plus communes de la région méditerranéenne. Ce petit arbuste est principalement limité à la région méditerranéenne et macaronésienne, avec des sites atlantiques en France et en Irlande (RUIZ-RODRIGUEZ *et al*, 2011).

On le retrouve en Europe occidentale, centrale et méridionale, en Afrique du Nord-Est aux îles Canaries et en Asie occidentale. Sa progression dans la zone tempérée d'Europe se situe du nord de la péninsule ibérique, le long de la côte ouest, à la limite la plus septentrionale au nord-ouest de l'île d'Irlande (TORRES *et al*, 2002).

Bien qu'elle pousse dans diverses régions du globe, elle est beaucoup plus fréquente dans les régions à climat non continental, à l'exception de certaines populations isolées situées dans des zones refuges (figure 2).

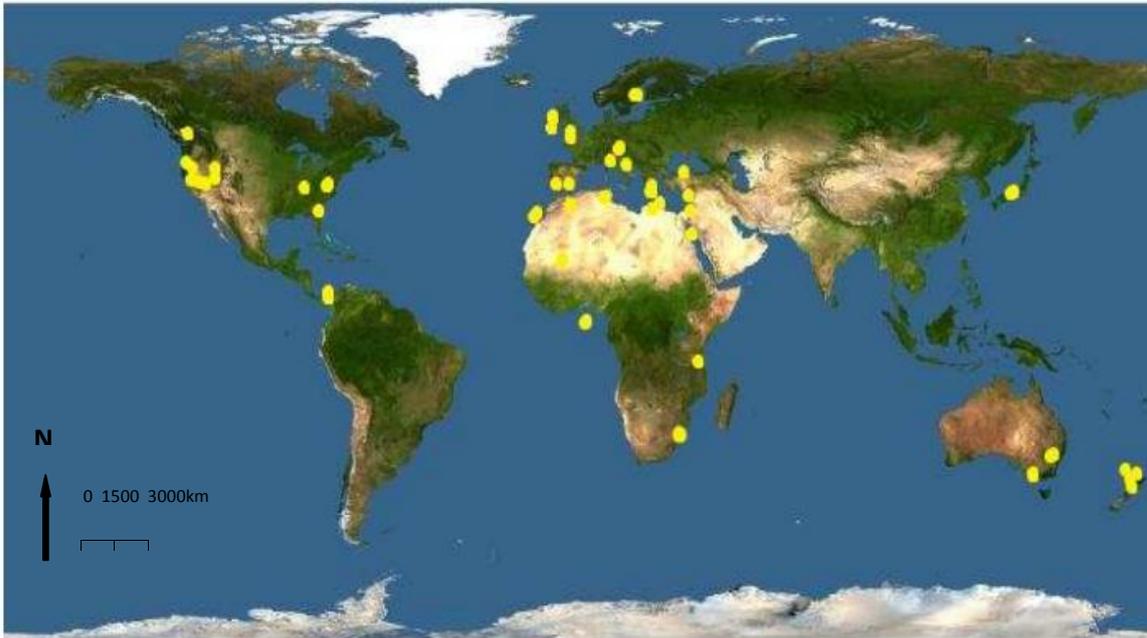


Figure 2 : Répartition géographique mondiale d'*Arbutus unedo* L. (KIRKALDYELLA 2000).

1-4-Description botanique

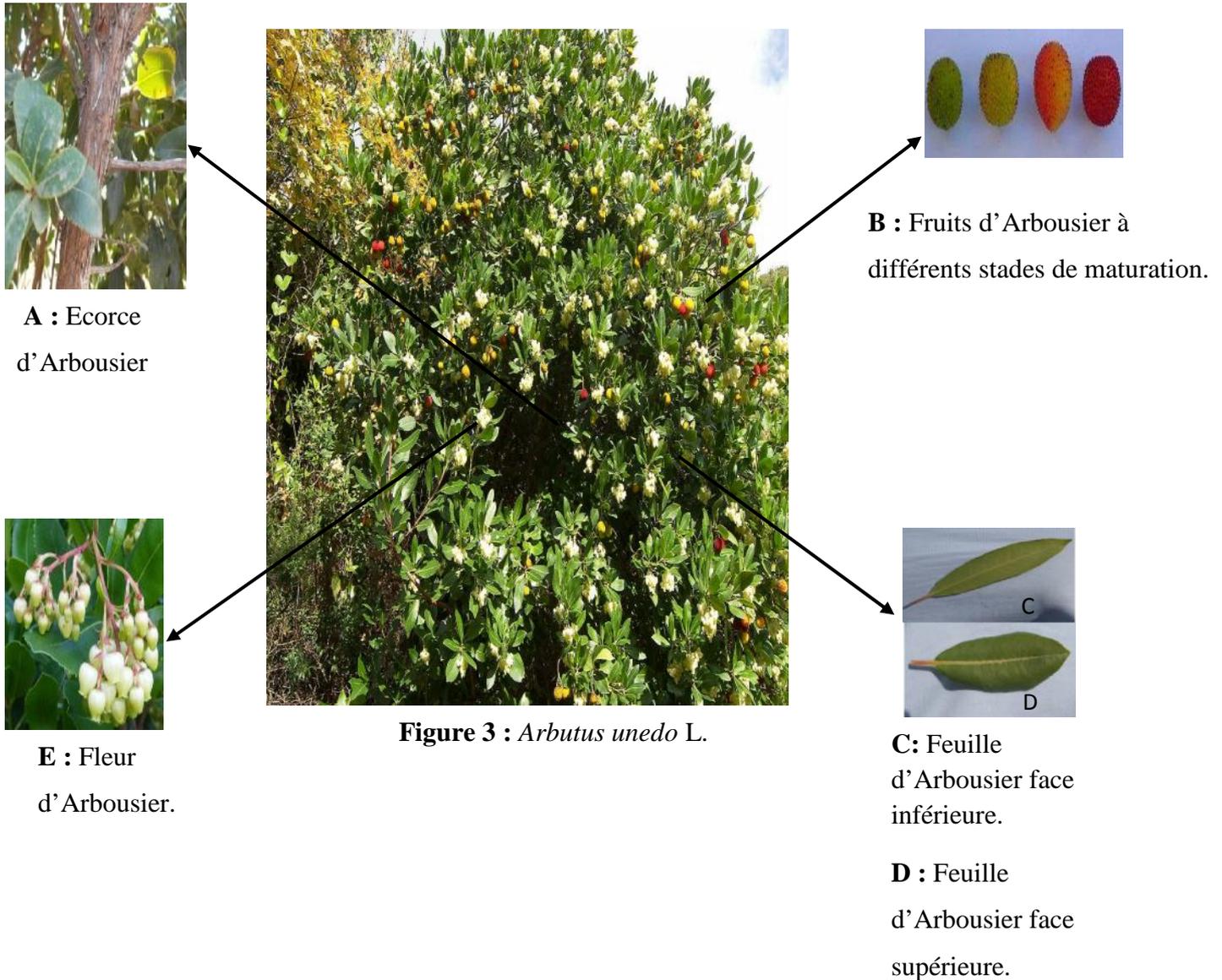
Arbutus unedo, est une espèce à feuilles persistantes, habituellement arbuste ne dépassant pas les 4m, mais certain individus peuvent atteindre les 12m (MERETI *et al*, 2002).

Les feuilles elliptiques de 5 à 10 cm, sont coriaces avec le bord en dents de scie ou légèrement dentelées, d'un vert foncé luisant au-dessus et vert pâle dessous, à court pétiole de 7 à 8 mm, peut atteindre jusqu'à 15 mm (figure 3C et 3D). L'écorce est fissurée et elle se décolle en petits flocons, la plupart du temps d'un brun terne (figure 3A). Les fleurs d'un blanc-verdâtre, en forme de clochettes pendent en grappes et apparaissent en septembre-octobre, en même temps que les fruits (figure 3E) (CELIKEL *et al*, 2008).

Le fruit, une baie ronde de 20 mm de diamètre, est recouvert de papilles coniques, dont la couleur (figure 3B) passe du vert au jaune puis au rouge orangé et enfin au rouge foncé à maturité. Sa chair est molle, un peu farineuse, acidulée et sucrée, et elle contient de nombreux petits pépins (TARDIO *et al*, 2002).

La distribution selon l'altitude d'*Arbutus unedo* varie entre 20 et 1000 m. En ce qui concerne le sol, il préfère les substrats siliceux ou décarbonatés. L'arbre peut pousser sur des sols alcalins et relativement acides (pH 5-7.2) mais avec une certaine préférence pour les sols

acides. *Arbutus unedo* représente rarement des peuplements dominants, on le trouve plus fréquents dans des communautés sauvages ou dans des peuplements naturels dominés par des chênes (GODINHO-FERREIRA *et al*, 2005; CELIKEL *et al*, 2008).



1-5-Utilisation traditionnelle

Cette espèce a été traditionnellement utilisée pour son potentiel nutritionnel, en utilisant les baies d'*Arbutus unedo* dans la production de boissons alcoolisées par distillation ou macération en raison du taux important de sucres fermentescibles contenus dans ses fruits, de confitures, de gelées et de marmelades en raison de sa richesse en pectine (ALARCAO *et al*, 2001 ;TARDIO *et al*, 2006; PALLAUF *et al*, 2008).

En médecine traditionnelle les fruits d'Arbousier sont bien connus pour leurs vertus antiseptique, diurétique et laxatif, tandis que les feuilles sont utilisées pour leurs propriétés astringentes, diurétiques, antiseptiques urinaires, anti-diarrhéiques et dépuratives (ZIYYAT *et al*, 1997 ; ZIYYAT et BOUSSAIRI, 1998 ; AFKIR *et al*, 2008; MARIOTTO *et al*, 2008).

L'utilisation de ce fruit comme antiseptiques, dans le traitement des infections des voies urinaires (ALARCAO *et al*, 2001), peut s'expliquer par sa teneur élevée en acide quinique qui est converti dans le corps humain en acide hippurique, réputé pour son effet antibactérien (AYAZ *et al*, 2000 ; ALARCAO *et al*, 2001).

Les racines et l'écorce, sont également utilisées en médecine traditionnelle, particulièrement dans le traitement des troubles gastro-intestinaux, mais aussi dans le traitement des problèmes urologiques et dermatologiques (NOVAIS *et al*, 2004 ; LEONTI *et al*, 2009).

1-6-Composition

Dans les feuilles de *A. unedo*, différents composés phytochimiques sont présents, tels que les terpénoïdes, l' α -tocophérol, les huiles essentielles et les composés phénoliques.

La fraction phénolique des feuilles comprend une grande variété de composés: les tanins, les flavonoïdes (gallate de catéchine, myricétine, rutine, afzelin, juglanin, avicularin), les glycosides phénoliques (quercitrine, isoquercitrine, hyperoside) et les glucosides iridoïdes (SANJUST *et al*, 2008 ; CARCACHE *et al*, 2006 ; MALES *et al*, 2006). Les composés phénoliques les plus importants de la feuille d'arbousier sont l'arbutin, la catechin et l'ethyl gallate. Les terpénoïdes identifiés dans cette même partie de l'arbre sont: l'acétate d'amine, l'acide bétulinique et le lupéol (Gaspar *et al*, 1997 ; Fiorentino *et al*, 2007).

La composition des baies est relativement mieux connue comparativement à celle des feuilles. Elles contiennent plusieurs molécules bioactives, à savoir les composés phénoliques, comme les anthocyanines, les dérivés d'acide gallique, les tanins et les flavonoïdes, la

vitamine C, la vitamine E et les caroténoïdes (AYAZ *et al*, 2000 ; ALARCAO *et al*, 2001 ; MALES *et al*, 2006 ; PAWLOWSKA *et al*, 2006; PALLAUF et RIVAS-GONZALO, 2008).

Les études phytochimiques des fruits d'*Arbutus unedo* ont révélé la présence de plusieurs sucres, dont le fructose, le glucose, le saccharose et le maltose (AYAZ *et al*, 2000 ; ALARCAO *et al*, 2001 ; MALES *et al*, 2006 ; PAWLOWSKA *et al*, 2006 ; PALLAUF *et al*, 2008)

D'après les résultats obtenus par ALARCAO *et al* (2001), la teneur en glucose et fructose augmente avec la maturation du fruit, tandis que le saccharose reste inchangé. En ce qui concerne les vitamines, dans la phase de maturation il y a une augmentation de la teneur en niacine, du β -carotène, tandis que la vitamine dominante, l'acide ascorbique diminue.

Le goût aigre-doux de ces fruits peut être expliqué par la forte teneur en sucre (42%) additionnée d'une teneur relativement importante en acide (8,62%). D'autre part, le goût astringent du fruit immature peut s'expliquer par la forte teneur en tanins, qui au cours de la maturité, au même titre que les phénols totaux, diminuent fortement (ALARCAO *et al*, 2001).

Il est bien connu que de nombreuses plantes ayant dans leur composition de fortes teneurs en composés phénoliques ont une importante activité antioxydante *in vitro* et peuvent jouer un rôle thérapeutique dans plusieurs pathologies humaines et animales. Compte tenu de la composition chimique de la feuille et du fruit d'*Arbutus unedo*, cette espèce pourrait présenter un potentiel antioxydant considérable (PABUÇCUOGLU *et al*, 2003).

1-7-Activités biologiques

Ces dernières années plusieurs vertus traditionnellement imputés aux feuilles d'arbousier ont été scientifiquement prouvées, démontrant ainsi les avantages pour la santé humaine et le potentiel de ces feuilles. Parmi ces effets nous pouvons citer :

- L'effet antioxydant, corrélé positivement, non seulement quantitativement avec les molécules antioxydantes, mais aussi qualitativement (VINSON *et al*, 2001). L'appréciation de ce potentiel antioxydant est basée sur un nombre important de tests *in vitro* (DPPH, ABTS, FRAP, TAC ... etc). Ainsi, PABUÇCUOGLU *et al* (2003) révèlent l'important pouvoir antioxydant des feuilles d'arbousier, en appliquant le test ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)). L'activité antioxydante est fortement liée au solvant utilisé lors de l'extraction des principes actifs à partir des feuilles d'arbousier. (PABUÇCUOGLU *et al*, 2003 ; OLIVEIRA *et*

- al*, 2009). La variabilité du potentiel antioxydant des extraits de feuilles est aussi liée à la zone de collecte et au génotype de l'arbousier (PAVLOVIC *et al*, 2011).
- L'effet anti-inflammatoire d'une solution aqueuse des feuilles d'*Arbutus unedo* a été mis en évidence par MARIOTTO *et al* (2008) sur l'inflammation pulmonaire aiguë induite chez un rat, par injection intrapleurale de carragénine. Leurs résultats ont montré que les composés biologiques contenus dans les feuilles de cette plante sont capables de réduire considérablement l'inflammation pulmonaire.
 - l'effet vasorelaxant a été étudié sur l'anneau aortique des souris par LEGSSYER *et al* (2004). Les auteurs de ces travaux ont démontrés que les feuilles d'arbousier possèdent une forte activité vasorelaxante et que celle-ci est due à la présence de tanins condensés et de gallate de catéchine. L'action de ces molécules serait due à la réduction de la disponibilité des ions Ca^{2+} (EL HAOUARI *et al*, 2007).
 - Diminution de l'hyper agrégation des plaquettes, ce qui est un facteur important dans la pathogenèse des maladies inflammatoires (LEGSSYER *et al*, 2004 ; MEKHFI *et al*, 2006). MEKHFI *et al* (2006) à montré in vitro, que les extraits de feuilles d'*Arbutus unedo* ont pu inhiber l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine, cette activité étant probablement liée à la présence de tanins dans les feuilles.
 - L'activité antimicrobienne principalement contre les bactéries Gram-positives (ORAK *et al*, 2011 ; HAOUAT *et al*, 2012) et antifongique des extraits des feuilles d'*Arbutus unedo* est largement traitée dans la littérature scientifique. La fraction insaponifiable de ses feuilles a été active pour inhiber la croissance de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans*. (DIBA *et al*, 2010). Les extraits aqueux quant à eux ont donné un effet inhibiteur vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (ORAK *et al*, 2011 ; MALHEIRO *et al*, 2012) *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, et *Staphylococcus epidermis* (MALHEIRO *et al*, 2012).
 - Diminution de la tension artérielle : La co-administration des extraits aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* avec l'ester méthylique de N (G)-nitro-l-arginine a permis de réduire le développement d'une pression artérielle systolique accrue, d'améliorer la réactivité vasculaire et de normaliser la fonction rénale chez le rat (AFKIR *et al*, 2008).
 - l'effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* investigué par le test de tolérance au glucose par voie orale (OGTT) réalisé par (BNOUHAM *et al*, 2007) provoque une diminution significative de la glycémie chez les rats après la prise

de glucose. Selon BNOUHAM *et al* (2010) cet extrait induit une inhibition de 31,6% de l'absorption du glucose jéjunal.

L'explication de ce pouvoir hypoglycémiant réside dans le fait que l'extrait combiné à l'insuline a potentialisé son activité et favorisé l'utilisation du glucose.

- L'effet antiparasitaire de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles d'arbousier s'est révélé être important vis-à-vis de *Trichomonas vaginalis* avec une inhibition totale de sa croissance à la concentration de 500 mg / ml (ERTABAKLAR *et al*, 2009). Une autre étude réalisée par KIVÇAK *et al* (2009) rapporte l'activité de cet extrait aqueux sur les promastigotes de *Leishmania tropica*, mais reste néanmoins modérée comparé à l'effet de l'extrait éthanolique.
- l'effet anti-cancer, étudié par MARIOTTO *et al* (2008) qui a montré que l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* exerce une action inhibitrice sur l'interféron-gamma (IFN-gamma). Cette action suscite l'activation de STAT1 (transducteur de signal et activateur de transcription), une protéine complexe avec des fonctions transcriptionnelles, sur la lignée cellulaire humaine du cancer du sein et les fibroblastes humains.

En médecine traditionnelle, plusieurs propriétés favorables à la santé ont été attribuées aux fruits d'*Arbutus unedo*. Cependant, comparativement aux feuilles peu de travaux ont été réalisés sur cette partie de l'arbre.

Les études effectuées sur le fruit de l'arbousier se sont essentiellement focalisées sur la composition de celui-ci (MIGUEL *et al*, 2014)

Pallauf *et al* (2008) ont identifié et quantifié les composés antioxydants présents dans les fruits de l'arbousier (flavonoïdes, vitamines C et E et caroténoïdes). La teneur élevée en flavonoïde (32,37 mg / 100 g) de ce fruit, ajouté à sa composition riche et variée en composés antioxydants expliquent son puissant pouvoir antioxydant (PALLAUF *et al*, 2008)

En 2005, HEINRICH a étudié différents paramètres des extraits de fruits d'arbousier, effectuant des tests anti-inflammatoires, antiprolifératifs antidiabétiques et d'inhibition enzymatique.

Dans tous les essais réalisés, les fruits ont présenté de faibles activités. Cependant, dans le test portant sur l'effet antiprolifératif, les extraits éthanoliques des fruits ont montré une activité

modérée, démontrant qu'ils possèdent une certaine capacité à inhiber la synthèse de l'ADN et la prolifération cellulaire.

1-8-Métabolites secondaires

le terme métabolite secondaire utilisé pour la première fois en 1891 par Albrecht Kossel qui l'introduisit par opposition à celui de métabolites primaires, pour désigner tous les composés produits par les plantes et pour lesquels aucune influence directe sur la croissance, la reproduction ou l'acquisition des ressources n'était connue (HADACEK, 2002).

Classées en quatre grandes catégories : les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques, ces molécules organiques désignées sous le terme métabolites primaires se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie.

Par opposition, les métabolites secondaires ont une répartition limitée dans l'organisme de la plante et ne sont pas toujours nécessaires à la survie de celle-ci, car elles n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante, comme la croissance ou la reproduction.

Les métabolites secondaires se caractérisent par une très grande diversité structurelle, leur nombre serait compris entre 100 000 (HADACEK, 2002) et 200 000 (HARTMANN, 2007) mais sont produits en faible quantité (NEWMAN et CRAGG, 2012).

De nos jours, il est possible de multiplier par 100 la concentration en molécules d'intérêt chez des plantes sauvages grâce à la culture en conditions contrôlées. Ce type de cultures permet d'appliquer aux végétaux des conditions de stress, afin de produire les métabolites secondaires recherchés. Ces conditions de croissance peuvent correspondre à un milieu nutritif, à la composition minérale, ou encore à l'application d'agents éliciteurs qui vont spécifiquement déclencher la synthèse des substances naturelles.

Les métabolites secondaires imprègnent d'une façon spécifique, une espèce, une famille ou un genre de plante permettant dans certains cas l'établissement d'une taxonomie chimique.

Leur production par les plantes a toujours été associée à une fonction défensive contre les attaques des ravageurs phytophages (BERENBAUM, 1995).

Même si c'est le cas d'un grand nombre d'entre elles, toutes n'interviennent pas dans la défense contre les herbivores ou les pathogènes comme l'indique la figure 4 (HADACEK, 2002; HARTMANN, 2007).

Depuis la découverte des métabolites secondaires et de leurs effets thérapeutiques la recherche de techniques d'extraction à haut rendement ne cesse de se développer. Néanmoins, en raison de préoccupations environnementales, sanitaires et sécuritaires, celles-ci convergent toutes vers la réduction voir la proscription de l'utilisation des solvants organiques dans l'extraction de ces molécules (WANG et WELLER, 2006).

1-8-1-Classification

Les métabolites secondaires sont généralement des molécules de bas poids moléculaire qui peuvent être hydrophiles ou lipophiles. La majorité sont regroupés en trois classes sur la base de leur origine biosynthétique : les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques (CROTEAU *et al*, 2000).

Chacune de ces classes est elle-même subdivisée en plusieurs sous classes renfermant une très grande variété de composés possédant une très large gamme d'activité biologique (ALI *et al*, 2001 ; LI *et al*, 2007).

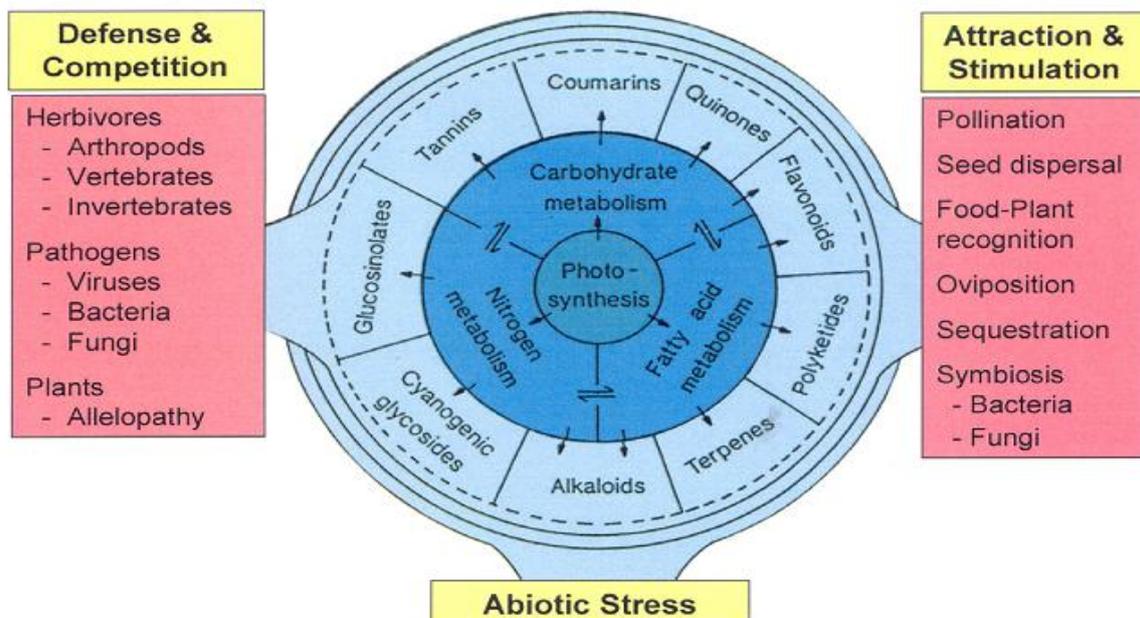


Figure 4 : Fonctions des métabolites secondaires (HARTMANN, 2007).

1-8-1-1-Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques, le plus souvent d'origine végétale. De structure moléculaire hétérocyclique azotée, très complexe à caractère basique (BRUNETON, 1999 ; ZENK et JUENGER, 2007).

On en dénombre près de 12 000 structures différentes et constituent l'une des fractions les plus puissantes des principes actifs issus des plantes médicinales (STÖCKIGT *et al*, 2002 ; ZENK et JUENGER, 2007 ; ROBERTS et WINK, 2013).

L'importance de ces molécules réside dans le fait qu'ils possèdent de puissantes activités biologiques même à faibles doses (BOUCHELTA *et al*, 2005).

Elles sont utilisées par exemple comme antidépresseurs, stimulants, anesthésiques, anti-tumoraux, antipaludiques etc. (BRUNETON, 1999).

On distingue trois classes d'alcaloïdes :

- **alcaloïde vrais** : synthétisé uniquement par les végétaux, ils proviennent biosynthétiquement d'acides aminés.
- **proto-alcaloïde** : ils proviennent d'acides aminés simples dont l'azote n'est pas impliqué dans un cycle.
- **pseudo-alcaloïde** : Ils présentent le plus souvent, toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés (BRUNETON, 1999). Ils peuvent cependant être indirectement liés à la voie des acides aminés par l'intermédiaire d'un de leurs précurseurs.

1-8-1-2-Terpènes

Métabolites secondaires, majoritairement spécifiques du règne végétal, ils se retrouvent chez les organismes marins, les champignons et même les animaux.

Avec un nombre de composés identifiés compris entre 30000 et 40000, les terpènes constituent la famille la plus largement diversifiée du point de vue structural (KAMPRANIS *et al*, 2007 ; DEGENHARDT *et al*, 2009) allant d'une simple chaîne linéaire hydrocarbonées jusqu'à des agencements complexes de cycles carbonés.

Malgré leur variabilité structurale importante, ces composés ont tous en commun le fait qu'ils sont le résultat de l'enchaînement de multiples sous unités d'isoprène (C₅H₈), d'où l'appellation d'isoprénoïdes (LAMARTI *et al.*, 1994 ; BHAT, 2005).

Selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporées dans leurs structures, les terpènes sont subdivisés en : monoterpènes (C₁₀H₁₆), sesquiterpènes (C₁₅H₂₄), diterpènes (C₂₀H₃₂), triterpènes (C₃₀H₄₈), tetraterpènes (C₄₀H₆₄) et polyterpènes (C₅H₈)_n (SATTERFIELD et BRODBELT, 2000 ; CICOLELLA, 2008).

Près de 1% des métabolites secondaires produits par les plantes sont des COV (composés organiques volatils), dont la fraction principale est constituée par les terpènes. Généralement lipophiles et très volatils, ils peuvent ainsi facilement traverser les membranes cellulaires et être relâchés dans l'atmosphère (DUDAREVA *et al.*, 2006).

Comme la majorité des COV (composés organiques volatiles) la diversité qualitative et quantitative des terpènes synthétisés varie selon les espèces et est sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques (PICHERSKY et GERSHENZON, 2002).

Cette synthèse est généralement associée à la présence de structures histologiques spécialisées comme les cellules à essence, les poils sécréteurs, les poches sécrétrices ou alors les canaux sécréteurs (TELEPOVA *et al.*, 1992 ; CHABIR *et al.*, 2009). Les terpènes sont des composants majeurs de l'essence de térébenthine et se trouvent dans beaucoup de produits à usage quotidien, notamment ceux à base d'essences végétale comme les parfums et les désodorisants. Dans l'atmosphère, l'ozone réagit avec ces terpènes, engendrant des radicaux hydroxyles responsables de la formation de près de 70% du formaldéhyde atmosphérique (CICOLELLA, 2008).

Une étude toxicologique effectuée sur le rat a mis en évidence le fait que les composés provenant de la réaction ozone terpènes sont de puissants irritants respiratoires (SUNIL *et al.*, 2007).

Les terpènes possèdent de multiples et différentes activités biologiques, mais ont en commun un large spectre d'action vis-à-vis des bactéries et des champignons. Ils sont utilisés par les plantes pour la colonisation des milieux en limitant la croissance d'autres plantes par des mécanismes d'allélopathie.

L'homme les a depuis toujours indirectement utilisés comme conservateurs et parfums par l'intermédiaire des épices (BAUER *et al.*, 2008).

Ces métabolites sont responsables de la couleur, de l'odeur des plantes et des fonctions écologiques importantes. D'un point de vue écologique, les terpènes sont impliqués en tant que répulsifs des herbivores ou attractifs dans les interactions entre plantes et entre plantes et animaux pollinisateurs (LANGENHEIM, 1994 ; LORIMER *et al*, 1996 ; JUSTICIA *et al*, 2005).

1-8-1-3-Les composés phénoliques

Le terme composés phénoliques ou polyphénols est utilisée indifféremment pour désigner tout produit du métabolisme secondaire des végétaux, dont la structure est caractérisée par la présence d'au moins un noyau aromatique portant au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester ou hétéroside. (LUGASI *et al*, 2003; HENNEBELLE *et al*, 2004). Les composés phénoliques, constituent le groupe le plus représenté et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, (LUGASI *et al*, 2003) avec plus de 9000 structures phénoliques connues (BAHORUN, 1998). Allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (AKOWUAH *et al*, 2005)

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (tableau 2) et sont subdivisés en plusieurs classes (figure 6), les principales sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins et les coumarines (KING et YOUNG, 1999 ; TAPIERO *et al*, 2002 ; BETA *et al*, 2005 ; STALIKAS, 2007).

Nombre d'études ont démontré que les polyphénols sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, fruits (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006)

Ils font ainsi partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002)

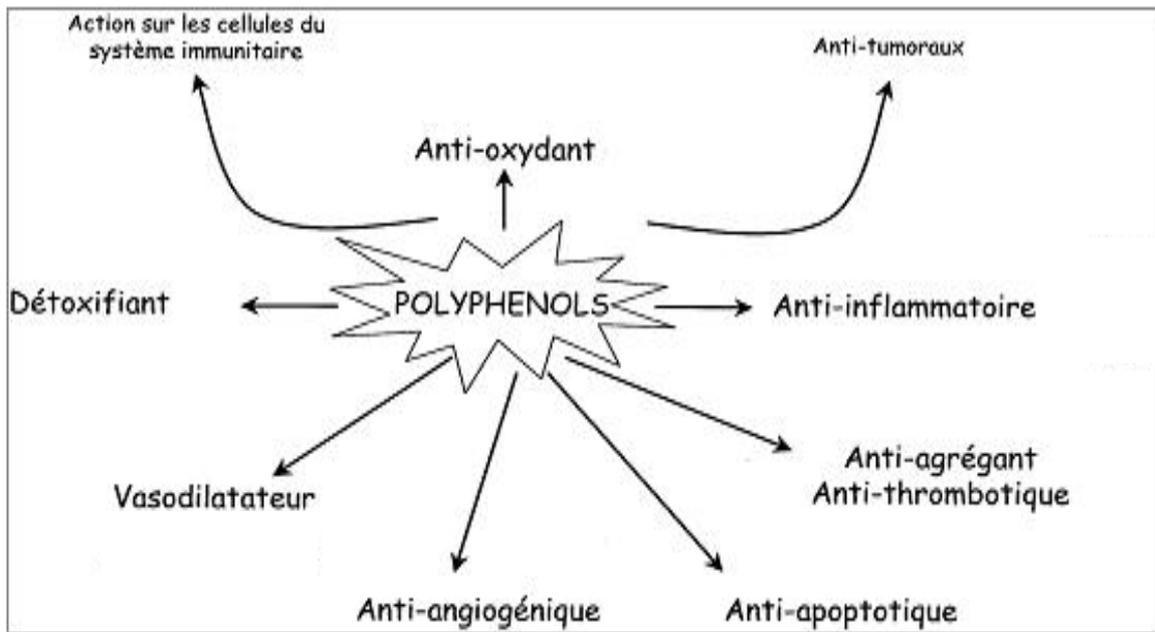


Figure 5: Effets biologiques des polyphénols (MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002).

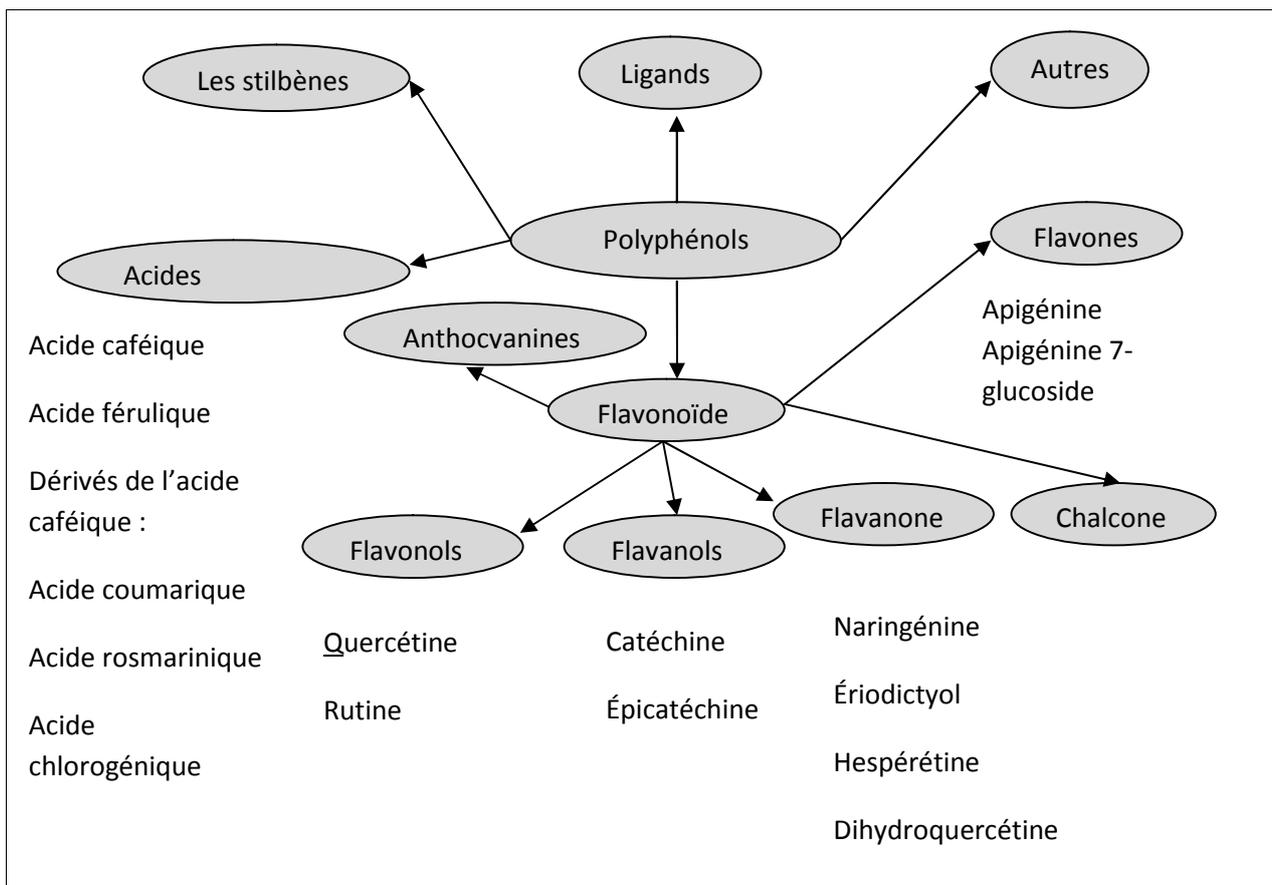
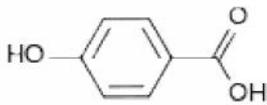
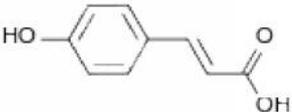
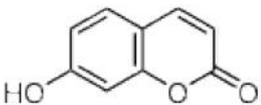
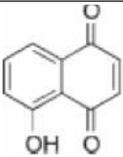
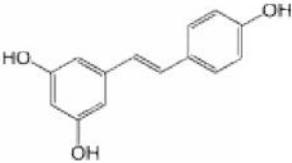


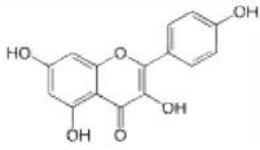
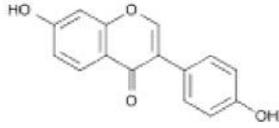
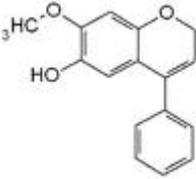
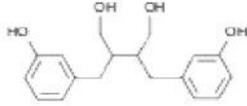
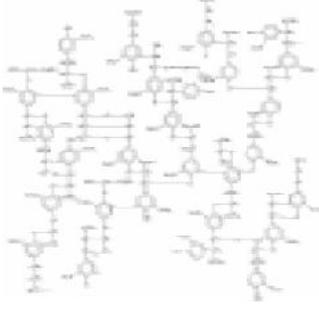
Figure 6 : Classification des polyphénols (BOROS *et al*, 2010).

Les polyphénols sont omniprésents dans le règne végétal. Cependant, ces composés peuvent considérablement varier tant qualitativement que quantitativement d'une plante à une autre (MANACH *et al.*, 2004).

Cette variation est aussi due d'une part à plusieurs facteurs environnementaux, tels que la lumière, le climat et les variations saisonnières (ERDMAN *et al.*, 2007) et d'autre part à des facteurs génétiques (AHERNE *et O'BRIEN*, 2002).

Tableau 2 : Classification des polyphénols (SARNI, 2006 ; BRUNETON, 2009).

Composés phénoliques				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure	Origine
C ₆	Phénols simples	hydroquinone		Busserole
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	acide parahydroxybenzoïque		Épices, fraises
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	acide paracoumarique		Tomates, ail
	Coumarines	ombelliférone		Carottes, coriandre
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	juglon		Noix
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénoides	trans-resvératrol		Raisin

C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <i>lato sensu</i>	kaempférol		Fraises
	Isoflavonoïdes	daidzéine		Graines de soja
	Anthocyanes	dalphiniol		<i>Dalbergia sissoo</i> , petits fruits rouges
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	entérodiol		Bactéries intestinales, lin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines			Bois, fruits à noyaux
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	procyanidine		Raisins, kaki

1-8-1-3-1-Activités biologiques

De nombreuses études expérimentales suggèrent que les polyphénols sont des molécules d'intérêt en raison de leurs nombreuses propriétés, responsables des bienfaits pour la santé et pourraient prévenir de nombreuses pathologies.

- **Activité antioxydante**

Au cours de ces dernières années l'intérêt pour les molécules bioactives d'origine végétale ne cesse d'augmenter, avec un nombre d'études accru. Cet intérêt est particulièrement porté

sur les polyphénols, en raison de leur forte disponibilité dans les aliments et leur important potentiel antioxydant. Les scientifiques, n'ont de cesse d'explorer le monde végétal à la recherche du composé pouvant résoudre les difficultés thérapeutiques rencontrées dans le domaine de la santé humaine. À cet effet, différentes méthodes expérimentales sont développées et représentent la clef pour le développement d'aliments fonctionnels ou la formulation de suppléments alimentaires chimiopréventifs au pouvoir antioxydant accru (ANTOLOVICH *et al*, 2002).

Les antioxydants sont des protecteurs chimiques dont la fonction est d'empêcher les ERO (espèces réactives de l'oxygène) d'atteindre leurs cibles biologiques (ADN, lipides et protéines). Leur efficacité est étroitement liée à leur aptitude à capter les radicaux libres. (GARDES *et al*, 2003)

Les antioxydants sont divisés en deux groupes : les primaires et les secondaires. (GRAMZA, et KORCZAK, 2005). Les polyphénols peuvent d'une part être classés comme antioxydants primaires car ils interrompent la chaîne radicalaire et former un radical stable en cédant un hydrogène ou un électron et d'autre part comme antioxydants secondaires car ils peuvent complexer, piéger ou décomposer diverses molécules impliquées dans la production des radicaux libres (oxygène, ions métalliques, peroxydes).

Selon HU, (2011) les polyphénols peuvent exercer leur pouvoir antioxydant de deux façons :

- Soit directement en piégeant et désactivant les molécules réactives de l'oxygène
- Soit indirectement en influant et améliorant l'expression d'enzymes antioxydantes et de protéines cytoprotectrices.

Les propriétés antioxydantes des polyphénols sont étroitement liées à leurs structures chimiques (RICE *et al*, 1995 ; VAN ACKER *et al*, 1996).

Le type de composé, le degré de méthylation et le nombre de groupes hydroxyle sont quelques-uns des paramètres qui déterminent l'activité antioxydante.

Les caractéristiques structurelles qui ont été associées à l'activité antioxydante sont:

- A) La présence d'une structure ortho-dihydroxy sur le cycle B communément appelé groupe catéchol (figure 7), comme c'est le cas pour la quercétine, ce qui confère une grande stabilité au radical formé après la réaction de capture du radical libre. Il a été clairement établi que le cycle B est le site le plus important pour le transfert des protons et par conséquent pour la capacité antioxydante. Le nombre et la position des H sur ce cycle sont deux facteurs importants dans la détermination de la puissance de l'antioxydant.

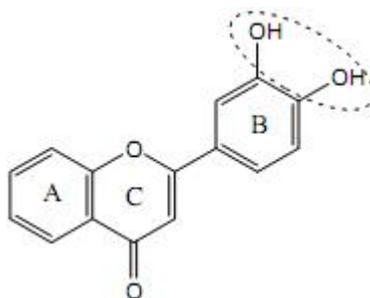


Figure 7 : Fraction de catéchol du cycle B.

B) La liaison 2,3-double en conjugaison avec une 4-oxofonction d'un groupe carbonyle dans le cycle C (figure 8) (VAN ACKER *et al*, 1996).

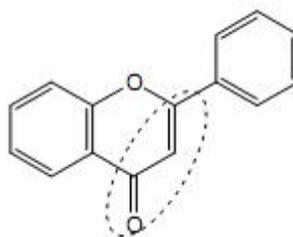


Figure 8 : Liaison 2,3-double en conjugaison avec une 4-oxofonction d'un groupe carbonyle dans le cycle C.

C) la présence de groupes hydroxyles en position 3 et 5 (figure 9) (BOURNE et RICE, 1998).

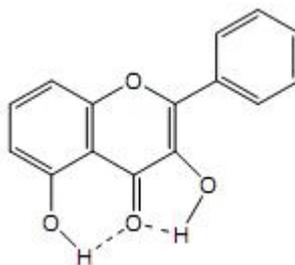


Figure 9 : Groupes hydroxyle en position 3 et 5.

D) La présence d'un groupement hydroxyle en position C3 sur le cycle C (figure 10) est à l'origine d'un puissant pouvoir antioxydant chez les polyphénols comme la rutine (RICE *et al*, 1996).

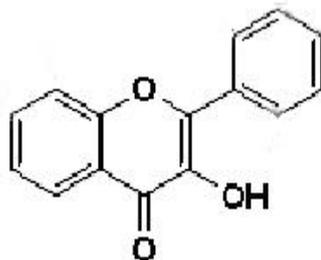


Figure 10 : Groupement hydroxyle en position C3 sur le cycle C.

Les principaux mécanismes antioxydants des polyphénols sont:

- Le piégeage direct ou la réduction des EOR.

Les polyphénols sont connus pour être thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux libres en raison de leur faible potentiel redox (FOTI *et al*, 2004 ; ZHANG et JI, 2006).

L'interaction polyphénols-protéines, est très largement étudiée, celle-ci est impliquée dans l'inhibition de plusieurs enzymes particulièrement par les flavonoïdes (ANDROUTSOPOULOS *et al*, 2010 ; KUHNERT *et al*, 2011). Ce type d'interaction est impliqué dans l'inhibition de la production des ERO par formation d'un complexe inhibiteur-enzyme. L'exemple le plus connu est celui de la xanthine oxydase source de radicaux superoxyde inhibé par les flavonoïdes (ÖZYÜREK *et al*, 2009 ; UMAMAHESWARI *et al*, 2009).

- Chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR.

Le fer et le cuivre sont indispensables à certaines fonctions physiologiques mais restent les principaux responsables de la production de radicaux hydroxyles par la réduction du peroxyde d'hydrogène. Le rôle clé des polyphénols dans l'inhibition de la production de ces radicaux est la chélation de ces métaux. (HIDER *et al*, 2001 ; FRAGA *et al*, 2010).

- **Activité anti-inflammatoire**

L'inflammation est la réponse des tissus vivants à une agression. Celle-ci est un processus normal dont le but est d'éliminer le pathogène et de réparer les dommages tissulaires causés par ce dernier. Néanmoins, elle peut avoir des effets négatifs en raison de l'agressivité du pathogène, de sa persistance, du site inflammatoire, par dérégulation du processus inflammatoire ou par altération quantitative ou qualitative des cellules impliquées dans l'inflammation.

Il est désormais admis que l'effet des polyphénols ne se limite pas à leurs propriétés antioxydantes. Parmi ces nombreuses autres activités, l'effet anti-inflammatoire reste très étudié. Divers mécanismes d'action cellulaires pour expliquer cet effet anti-inflammatoire *in vivo* ont été proposés.

L'acide arachidonique est libéré des membranes cellulaires par la PLA₂ (Phospholipases A₂). Sous l'action de la cycloxygénase et la lipoxygénase, il est métabolisé respectivement en prostaglandines et leucotriènes largement impliqués dans les phénomènes inflammatoires (KIM *et al*, 2004).

Le premier niveau d'action anti-inflammatoire des polyphénols réside dans l'inhibition de la PLA₂. Le deuxième quant à lui réside dans l'inhibition des cycloxygénases (COX) et des lipoxygénases (LOX) (HONG *et al*, 2001 ; CHANDRASEKHARAN *et al*, 2002).

- **Activité antiallergique**

L'allergie est un phénomène d'exagération pathologique de la réponse immunitaire, en particulier la réaction inflammatoire. Certains flavonoïdes (quercétine, myricétine), exercent une activité antiallergique grâce à leur aptitude à l'inhibition d'enzymes impliquées dans les processus de stress oxydant et inflammatoire (LANDOLFI *et al*, 1984). Les flavonoïdes exercent aussi cette activité par l'inhibition de l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca²⁺-dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles (DI CARLO *et al*, 1999).

Activité anti-ulcère

L'ulcère gastroduodéal est une maladie chronique. Il résulte d'un déséquilibre entre des facteurs d'agression (sécrétions acides) et des facteurs de défense (mucus, épithélium de surface).

Il se traduit par la perte de substance du revêtement épithélial cutané ou muqueux gastrique ou duodénale sans tendance à la cicatrisation spontanée.

Certains polyphénols tels que la quercétine, la naringénine, la rutine et le kaempférol présentent un effet anti-ulcère grâce à leur inhibition du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un facteur ulcérogène (SOBHANI *et al*, 1995 ; IZZO, 1996). D'autre part, la quercétine est connue pour son effet protecteur des cellules gastriques par un mécanisme complexe alliant sécrétion de mucus, piégeage des radicaux libres et l'inhibition de la production des leucotriènes (DI CARLO *et al*, 1999).

- **Effet sur le système cardiovasculaire**

L'effet protecteur des polyphénols sur le système cardiovasculaire est en grande partie attribué aux flavonoïdes. Ces derniers exercent cet effet protecteur en jouant un rôle positif dans la progression de l'athérosclérose et cela en évitant la formation de thrombus, en améliorant la fonction endothéliale, en régulant les taux lipidiques et en diminuant l'oxydation des LDL (DUCHNOWICZ *et al*, 2012 ; SIASOS *et al*, 2013). Les flavonoïdes impactent positivement la santé cardiovasculaire en réduisant l'hypertension artérielle, d'une part en rétablissant la fonction endothéliale (CLARK *et al*, 2015) et d'autre part en diminuant le stress oxydatif (BARADARAN *et al*, 2014). Pour ce qui est de l'infarctus myocardique, les flavonoïdes agiraient en réduisant les ROS ainsi qu'en inhibant l'agrégation plaquettaire par interaction avec les récepteurs aux thromboxanes (LIU *et al*, 2012 ; CHANG *et al*, 2014).

- **Activité anticancéreuse**

Le cancer est largement déterminé par les facteurs environnementaux, l'alimentation étant un facteur majeur. Les habitudes alimentaires et les constituants alimentaires synthétiques consommés quotidiennement sont étroitement associés au risque de développer un cancer (MANSON, 2003).

De nos jours, les polyphénols alimentaires sont au centre de beaucoup d'attention pour leurs propriétés anticancéreuses.

Les polyphénols peuvent exercer leurs effets anticancéreux par divers mécanismes (figure 12) tels que l'élimination des agents cancérigènes, la modulation de la signalisation des cellules cancéreuses, l'activation d'enzymes antioxydantes, l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (RAMOS, 2008 ; SURH, 2008).

Un autre aspect de l'effet anti-tumoral des polyphénols est leur capacité à inhiber la formation d'AGEs (Produits finaux de glycation avancée) (figure 11) qui sont réputées pour être des molécules à fort impact sur le processus de carcinogenèse (BENGMARK, 2007 ; SANG *et al*, 2007).

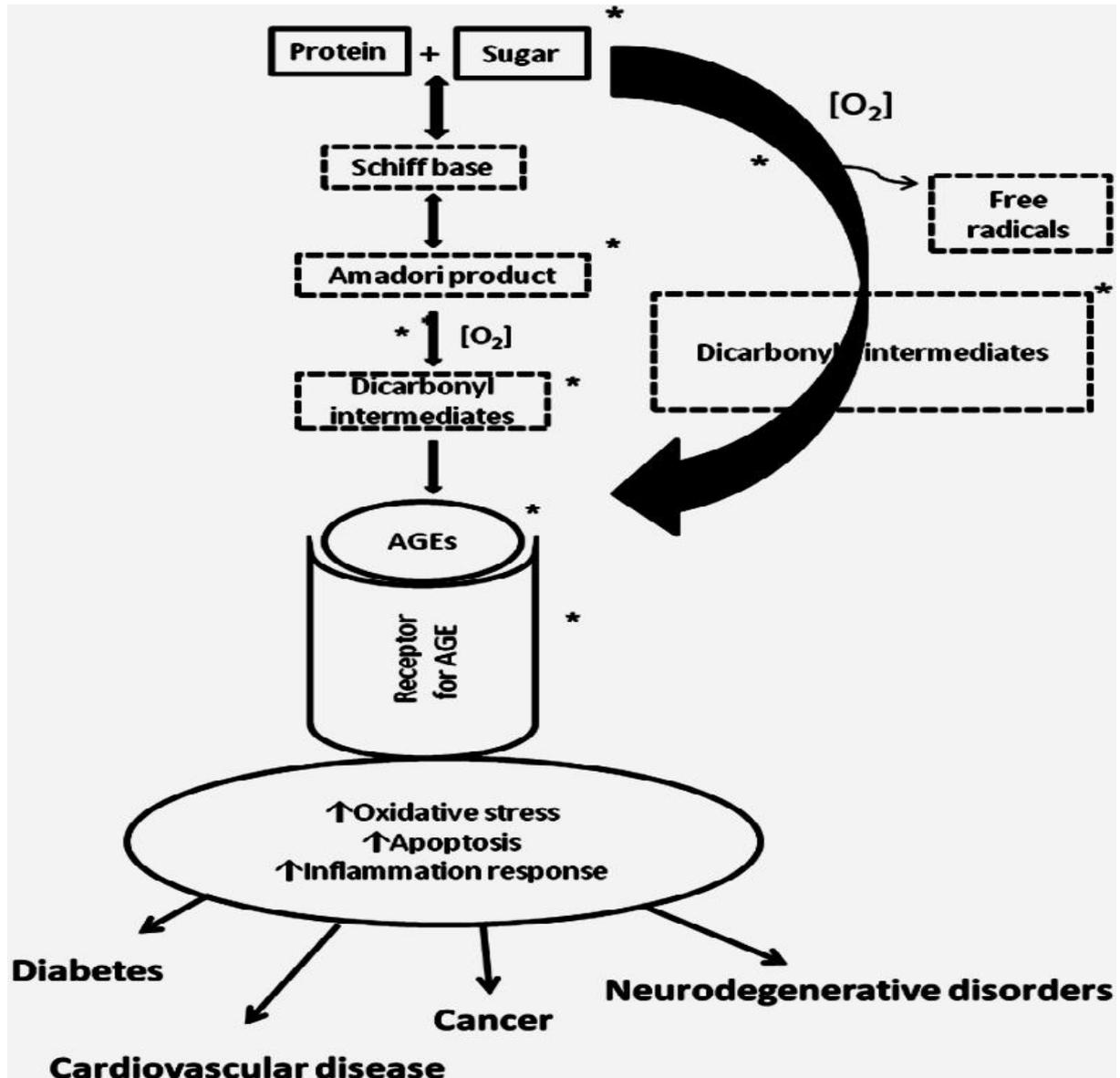


Figure 11 : Formation des AGE et sites d'inhibition par les flavonoïdes de leur formation (*) (VAUZOUR *et al*, 2010).

Les cellules cancéreuses se caractérisent généralement d'une part par des niveaux élevés d'absorption et de métabolisation du glucose, ce qui joue un rôle important dans la croissance tumorale, d'autre part, elles induisent une vascularisation importante du tissu tumoral.

Ainsi selon une étude sur le cancer du sein, l'effet antiprolifératif de l'hespétine, serait probablement due à l'entrave dans le processus d'absorption du glucose par les cellules cancéreuses (YANG *et al*, 2013).

D'autres études impliquent les polyphénols dans l'arrêt de la prolifération tumorale via l'arrêt du processus d'angiogenèse et de métastase (BAGLI *et al*, 2004) par l'inhibition des effecteurs de ces deux processus clef de la prolifération tumorale (ADHAMI *et al*, 2004).

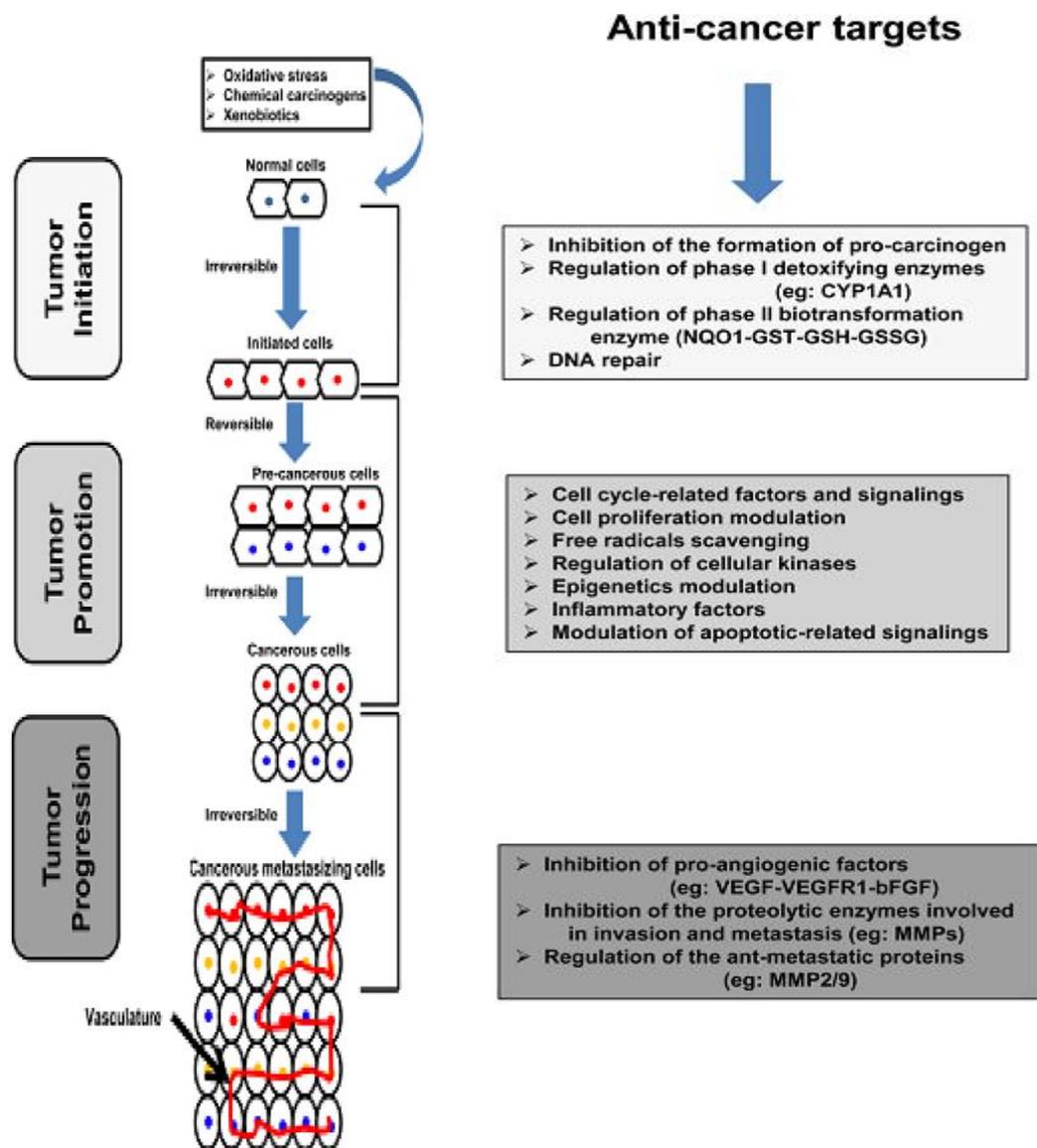


Figure 12 : Représentation schématique représentant le processus de la carcinogenèse et les cibles biologiques des polyphénols à chaque étape (ABDAL DAYEM *et al*, 2016).

- **Activité antiparasitaire**

Plusieurs études rapportent que les composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes manifestent des activités contre un large spectre de parasites :

- **Le genre *Leishmania* :**

Les flavonoïdes en particulier les chalcones ont été identifiés comme de puissants inhibiteurs de différentes fonctions mitochondriales, essentielles à la vitalité du parasite (ZHAI *et al*, 1995).

- **Le genre *Trypanosoma* :**

Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur effet inhibiteur de transporteurs de type glycoprotéine P (PEREZ *et al*, 1999). De plus ils agiraient aussi en modulant l'activité des protéines de phosphorylation sur la protéine kinase SPK89 (GALE *et al*, 1994).

- **Le genre *plasmodium* :**

En raison d'analogies structurales, les auronnes présentent le même mode d'action antiparasitaire que les chalcones vis-à-vis du genre *plasmodium* (KAYSER *et al*, 2001). De plus, les flavonoïdes inhibent l'influx de L-glutamine et de myoinositol dans les érythrocytes infectés, ce qui entrave le développement du parasite (KAUR *et al*, 2009 ; MAGADULA *et al*, 2009).

- **Activité antibactérienne**

Les antibiotiques ont permis de faire reculer considérablement la mortalité due aux maladies infectieuses. Néanmoins, leur utilisation abusive et fréquente a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à ces médicaments. Pour palier à ce problème la recherche scientifique s'est tournée vers les extraits végétaux riches en biomolécules potentiellement antibactériennes.

Les mécanismes par lesquels les extraits végétaux exercent leur activité antimicrobienne ne sont pas clairs. Certains auteurs supposent que les biomolécules présentes dans ces extraits tels que les polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes agissent sur la membrane cytoplasmique ou la paroi cellulaire bactérienne, causant des dommages structurels et fonctionnels (DIXON *et al*, 2005 ; KOSALEC *et al*, 2005 ; SCAZZOCCHIO *et al*, 2006 ; HEINONEN, 2007).

En réalité, l'effet antibactérien des polyphénols ne se limite pas aux seuls effets de perturbation de la membrane cytoplasmique ou la dégradation de la paroi bactérienne. Multiples sont les modes d'actions mis en œuvre, tels que l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien et l'influence sur la synthèse de l'ADN et de l'ARN, des protéines et des lipides (MILANE, 2004 ; PIEBOJI, 2007 ; ZHANG *et al*, 2009 ; LUIS *et al*, 2014).

L'influence sur la synthèse de l'ADN des polyphénols particulièrement de la quercétine est attribuée à l'inhibition de l'ADN gyrase. Concrètement, la quercétine se lie à la sous-unité GyrB de l'ADN gyrase et inhibe son activité ATPase (PLAPER *et al*, 2003)

Cette biomolécules comme les autres flavonols, sont capables en raison de leur hydrophobicité de pénétrer les membranes phospholipidiques cellulaires, pouvant ainsi exercer leur activité antibactérienne également à l'intérieur de la cellule (ALVESALO *et al*, 2006)

Les polyphénols semblent avoir une plus grande activité contre les bactéries Gram-positives par rapport aux Gram-négatives en raison du rôle de barrière que joue le lipopolysaccharide chez ces dernières (IKIGAI *et al*, 1993).

Matériel

et

Méthodes

2-Matériel et méthodes

Les différents protocoles réalisés dans cette étude ont été menés au niveau du laboratoire de recherche en biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

2-1-Matériel

2-1-1-Matériel végétal

Les feuilles d'*Arbutus unedo* ont été collectées en décembre 2014 dans la région de Larbaâ Nath Irathen (36° 38 12 nord, 4° 12 24 est). Le choix de la zone d'échantillonnage est motivé par son éloignement de la route et de toute exploitation agricole. Dix arbres sains sont sélectionnés et échantillonnés aux quatre expositions de la couronne. Les feuilles sont prélevées au milieu du rameau et transportées dans des filets. Une fois triées et lavées à l'eau distillée, celles-ci sont séchées à température ambiante et à l'abri de la lumière puis broyées.

2-1-2-Souches bactériennes

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* est évaluée sur les souches suivantes :

Bacillus cereus ATCC 10876, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Listeria monocytogene* ATCC 15313, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Le choix de ces souches est motivé par leur large impact pathologique dû à leur pouvoir pathogène. Celles-ci proviennent de la collection de l'unité de microbiologie appliquée du laboratoire de recherche en biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

2-1-3-Prélèvements sanguins

Un prélèvement de sang veineux est effectué sur des volontaires sains, non fumeurs et ne suivant aucune médication. Les échantillons sont récupérés dans des tubes héparinés puis conservés à 4°C.

2-1-4-Prélèvements salivaires

Le prélèvement salivaire, s'effectue au repos à l'aide de canules stériles sur des volontaires sains non fumeurs, non chiqueurs et ne présentant aucune lésion ni pathologie. Les échantillons sont recueillis dans des tubes falcon stériles puis conservés à 4°C.

2-1-5-Prélèvements urinaires

Les prélèvements urinaires sont effectués sur des volontaires sains, suivant les recommandations pour la réalisation de l'examen cytbactériologique des urines (ECBU). Celles-ci consistent à faire une toilette soignée du méat urinaire à l'aide de lingettes désinfectantes, éliminer le premier jet puis remplir le flacon ECBU qui est conservé à 4°C.

2-2-Méthodes

2-2-1-Préparation de l'extrait

20 g de feuilles en poudre sont macérés sous agitation à 100 rpm à température ambiante dans 200 ml d'eau distillée pendant 24 h. Le macérât est filtré une première fois sur une passoire afin d'éliminer le maximum de matière végétale puis une deuxième fois sur laine de verre jusqu'à obtenir un liquide limpide et homogène. Le filtrat obtenu est congelé pendant 24h à -80°C en fines couches à raison de 20 ml par plateau de 15 cm de diamètre, puis disposé dans un lyophilisateur christ alpha1-2. Une fois le lyophilisat collecté, celui-ci est reparti dans des flacons en verre teinté, hermétiquement scellés et conservés au réfrigérateur à 4°C.

2-2-2-Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est effectué selon la méthode utilisant le réactif Folin-Ciocalteu (LI *et al*, 2008).

Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique, qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006). L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques contenus dans l'échantillon analysé.

200 µl d'extrait dissout dans de l'eau distillée à la concentration de 40µg/ml sont mélangés à 1 ml du réactif Folin-Ciocalteu (dilué au dixième) et 800 µl d'une solution de carbonate de sodium à 75mg / ml. Le mélange est incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 45 minutes. L'absorbance est mesurée à 760 nm (spectrophotomètre UV-visible

MEDLINE MD 2000) et les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g) en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique réalisée aux concentrations allant de 10 à 100 µg/ml.

Les solutions d'extrait ainsi que la gamme d'étalonnage sont préparés le même jour dans les mêmes conditions opératoires.

Le blanc est préparé en mélangeant 200 µl d'eau distillée avec 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au dixième) et 800 µl de solution de carbonate de sodium.

2-2-3-Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

L'analyse quantitative des flavonoïdes totaux est effectuée par une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium qui forme un complexe jaune avec les flavonoïdes (AKROUT *et al.*, 2011).

1 ml de l'extrait à 10 mg/ml est mélangé avec le même volume d'une solution méthanolique à 2% de trichlorure d'aluminium.

Après 10 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance du mélange est lue à 430 nm (spectrophotomètre UV-visible MEDLINE MD 2000).

Dans les mêmes conditions, une courbe d'étalonnage de la quercitine aux concentrations comprises entre 10 et 190 µg/ml est réalisée et les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercitine par gramme d'extrait (mg QE/g).

Les solutions d'extrait ainsi que la gamme d'étalonnage sont préparés le même jour dans les mêmes conditions opératoires et pour le blanc l'extrait est substitué par 1ml d'eau distillée.

2-2-4-Détermination de la teneur en tanins totaux

L'estimation de la teneur en tanins totaux contenus dans l'extrait est réalisée par la méthode de HAGERMAN et BUTLER (1978). La sérum albumine bovine (BSA) sépare les tanins, réputés pour leur capacité de complexation aux protéines, des autres polyphénols présents dans l'extrait. Le chlorure ferrique (FeCl₃) réagit avec les tannins en milieu alcalin (SDS/TEA) pour former des chélates chromogènes.

1ml d'extrait à 400 µg/ml est additionné à 2 ml d'une solution de BSA à 1mg/ml préparée dans le tampon acétate (0,4M, pH= 6). Après incubation à l'abri de la lumière (24h à 4°C), le mélange est centrifugé à 3000 g à 4°C pendant 15 minutes. Le précipité obtenu est dissous dans 4ml de dodécylsulfate de sodium/ triéthanolamine (SDS/TEA) (1%/5%), additionné de

1ml de FeCl_3 (0,01M), dissous dans une solution d'HCl à 0.01M, puis incubé 15 minutes à l'obscurité.

L'absorbance est mesurée à 510 nm (spectrophotomètre UV-visible MEDLINE MD 2000) contre un blanc contenant 1 ml de FeCl_3 (0,01M) et 4 ml du SDS/TEA (1%/5%) et les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide tannique par gramme d'extrait (mg EAT/g) en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide tannique réalisée pour les concentrations allant de 10 à 190 $\mu\text{g/ml}$.

Les solutions d'extrait ainsi que la gamme d'étalonnage sont préparés dans les mêmes conditions opératoires.

2-2-5-Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Pour l'étude de l'activité anti-radicalaire de l'extrait, nous avons suivi la méthode de SANTOS *et al* (2010), qui utilise le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).

Le test au DPPH mesure l'activité donatrice d'un atome d'hydrogène (ou d'un électron) et fournit ainsi une mesure de l'activité antioxydante par le piégeage des radicaux libres.

Le DPPH est un radical libre stable de couleur pourpre, il est réduit en diphényl picrylhydrazine de couleur jaune (PRIOR *et al*, 2005). L'intensité de la couleur observée est inversement proportionnelle au potentiel antioxydant de l'extrait étudié (SANCHEZ-MORENO, 2002).

250 μl d'une solution méthanolique de DPPH à 0.8 mM est mélangée avec 3.75 ml de l'extrait aux concentrations de 1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25 et 7.5 $\mu\text{g/ml}$. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 517nm.

Le pourcentage de piégeage du radical DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Piégeage du DPPH (\%)} = [(AC - AE) / AC] \times 100$$

AC : Absorbance du contrôle.

AE : Absorbance de l'échantillon.

2-2-6-Inhibition du blanchiment du β -carotène

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres peroxydes, qui par la suite oxydent le bêta-carotène (molécule hautement insaturée), dont la couleur rouge disparaît proportionnellement à la disparition des insaturations. Le pouvoir antioxydant de l'extrait végétal correspond à sa capacité à neutraliser les radicaux libres générés, empêchant ainsi l'oxydation et le blanchiment du β -carotène (PANDA, 2012).

L'inhibition du blanchiment du β -carotène est évaluée suivant le protocole de KABOUCHE *et al* (2007), qui consiste en la préparation d'une émulsion composée d'un mélange de 1 ml de chloroforme, 0.5mg β -carotène, 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40.

Une fois le chloroforme évaporé dans un évaporateur rotatif à 40 °C, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés au résidu sec et la solution est vigoureusement agitée. 350 μ l d'une solution éthanolique de l'échantillon (200, 400, 600, 800 et 1000 μ g/ml) sont ajoutés à 2.5 ml de ce mélange.

Dès que la solution émulsionnée est ajoutée aux tubes, l'absorbance est mesurée (t=0 mn) à 490 nm. Après, 120 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, cette absorbance est de nouveau mesurée (t=120 mn).

L'activité antioxydante est calculée en pourcentage d'inhibition (I %) par rapport au témoin en utilisant l'équation suivante:

$$I\% = [1 - (As - As_{120}) / (Ac - Ac_{120})]$$

As : Absorbance initiale de l'échantillon.

As₁₂₀: Absorbance de l'échantillon à 120 mn.

Ac : Absorbance initiale du contrôle.

Ac₁₂₀: Absorbance du contrôle à 120 mn.

2-2-7-Piégeage du radical hydroxyle

La capacité de piégeage du radical hydroxyle est mesurée selon la méthode décrite par RAJAMANIKANDAN *et al* (2011).

Cette méthode révèle la capacité de compétition de l'extrait avec l'acide salicylique vis-à-vis des radicaux hydroxyles (KUTLU *et al*, 2014).

Pour un volume total de 2.5 ml, le milieu réactionnel est composé de 500 µl d'extrait à différentes concentrations (de 100 à 2000 µg/ml), 1ml de FeSO₄ (1.5 mM), 0.7 ml de peroxyde d'hydrogène (6 mM) et 0.3 ml de salicylate de sodium (20 mM).

L'acide ascorbique est utilisé comme standard.

L'absorbance du complexe salicylate hydroxylé est mesurée à 560 nm après 1 h d'incubation à 37 °C.

L'appréciation de la capacité de piégeage du radical hydroxyle par l'extrait et le standard est effectuée par le calcul de l'IC₅₀.

2-2-8-Piégeage du peroxyde d'hydrogène

La capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène est mesurée selon la méthode décrite par SERTESER *et al* (2009).

L'évaluation de cette activité exprimée par l'extrait végétal est basée sur le suivi de la variation de l'absorption du H₂O₂ dans l'UV. Piégé par l'extrait, la concentration en peroxyde d'hydrogène diminue et avec lui son absorbance à 230 nm.

Un volume de 3,4 ml de l'extrait (tampon phosphate 0,1M, pH = 7,4) à différentes concentrations (80 à 600 µg/ml) est mélangé à 600 µl de peroxyde d'hydrogène à 40Mm (tampon phosphate 0,1M, pH = 7,4). Dans les mêmes conditions opératoires l'acide ascorbique est utilisé comme référent.

L'absorbance est mesurée à 230 nm après 10 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Le pourcentage de piégeage est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Piégeage H}_2\text{O}_2 (\%) = 1 - \text{As}/\text{Ac} \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle (sans l'extrait)

As : Absorbance du test.

2-2-9- Réduction du molybdène

La technique utilisée est celle décrite par PRIETO *et al* (1999). Elle est basée sur la réduction du molybdate Mo (VI) en molybdène Mo (V) en présence d'un antioxydant avec la formation d'un complexe vert (phosphate/ Mo (V)) à pH acide.

0.1 ml d'extrait aux concentrations comprises entre 100 et 500 µg/ml est mélangé à 1ml de réactif composé d'acide sulfurique (0.6 M), de phosphate de sodium (Na₃PO₄, 28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 mn. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm.

L'appréciation du pouvoir réducteur de l'extrait et du standard est effectuée par le calcul de l'IC₅₀.

2-2-10-Réduction du fer

La méthode utilisée est celle décrite par OYAIZU (1986).

Le test de l'activité réductrice de l'ion ferrique est basé sur la capacité des phénols à réduire le Fe³⁺ en Fe²⁺. Cette réduction conduit à la formation d'un complexe bleu prussien (GÜLÇIN, 2011).

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction du fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

Cette méthode consiste à mélanger 1.25ml de l'extrait à différentes concentrations (5 à 200 µg/ml) avec 1.25 ml de tampon phosphate (0.2 M à pH 6.6) et 1.25 ml d'une solution de K₃Fe(CN)₆ à 1% (m/v).

Le mélange obtenu est incubé pendant 20 minutes à 50°C, puis 1.25 ml d'acide trichloracétique (CCl₃COOH) à 10% est ajouté. Le mélange est centrifugé à 3000 g pendant 10 mn. 1.25 ml du surnageant sont prélevés et sont additionnés de 1.25 ml d'eau distillée et 0.5 ml de chlorure de fer (FeCl₃) à 0.1%. La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm. L'appréciation du pouvoir réducteur de l'extrait et du standard est effectuée par le calcul de l'IC₅₀.

2-2-11-Chélation du fer

Pour évaluer le pouvoir chélateur d'un extrait végétal donné, le composé le plus utilisé est la ferrozine (figure 24) (ZHAO *et al*, 2006). En effet, la ferrozine forme avec le fer libre, présent dans un milieu réactionnel, un complexe ferrozine-Fe²⁺ de couleur violette. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie dans un milieu de concentration connue en fer, renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité de l'extrait à chélater cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important. La méthode utilisée pour l'évaluation du pouvoir chélateur de l'extrait étudié est celle décrite par DINIS *et al* (1994).

100 µl d'extrait à différentes concentrations est ajoutée à 50 µl de Chlorure de fer (FeCl₂, 4H₂O, 2 mM). Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 minutes, 100 µl de ferrozine (5 mM) sont ajoutés, suivis de 2.75 ml d'eau distillée. Le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 562 nm.

L'appréciation du pouvoir chélateur de l'extrait et du standard est effectuée par le calcul de l'IC50.

2-2-12-Tests d'hémolyse

Les tests d'hémolyse sont réalisés *in cellulo* sur des érythrocytes humains. L'activité de stabilisation membranaire de l'extrait est évaluée en utilisant une hémolyse érythrocytaire induite par une solution hypotonique, par la chaleur et par le HOCl.

L'exposition des érythrocytes à une concentration saline hypotonique, à la chaleur et à un oxydant conduit à la rupture de leurs membranes plasmiques avec libération du contenu cellulaire (hémoglobine). L'intensité de l'hémolyse est estimée par la mesure de l'absorbance de l'hémoglobine libérée après hémolyse.

2-2-12-1-Hémolyse induite par une solution hypotonique

Le protocole réalisé pour l'étude de l'effet protecteur de l'extrait vis-à-vis de solutions hypotonique est celui décrit par FREITAS *et al* (2008).

Le sang de volontaires sains est collecté dans des tubes contenant de l'héparine. Les globules rouges sont séparés du plasma par centrifugation de 3 ml de sang à 300 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot obtenu est lavé trois fois avec 3 ml de tampon phosphate (pH 7.4, NaCl 0.9%).

40 µl de la suspension érythrocytaire sont mélangés à 1 ml de tampon phosphate (pH 7,4) à concentrations variables en NaCl (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9%) où chaque concentration en NaCl est combinée à des concentrations variables de l'extrait (250, 500, 750, 1000, 1250 et 1500 µg/ml).

Le mélange est incubé 30 minutes à 37 °C sous agitation douce puis centrifugé à 300 g pendant 10 minutes à 4°C. L'absorbance du surnageant est mesurée à 540 nm et le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Inhibition de l'hémolyse (\%)} = (\text{DO1} - \text{DO2} / \text{DO1}) \times 100$$

DO1 = Densité optique de la solution hypotonique de globules rouges sans la plante

DO2 = Densité optique de la solution hypotonique de globules rouges avec la plante

2-2-12-2-Hémolyse induite par la chaleur

L'activité protectrice de l'extrait vis-à-vis de l'hémolyse induite par la chaleur est réalisée *in vitro* par la méthode spectrophotométrique décrite par SAKAT *et al* (2010).

1ml de différentes concentrations d'extrait (25 à 500µg/ml) dissoutes dans un tampon phosphate (pH 7.4, NaCl 0.9%) est mélangé avec 1 ml de globules rouges (2%). Le mélange réactionnel est incubé dans un bain-marie à 56°C pendant 30 mn. Après incubation, les tubes sont refroidis à l'eau du robinet, puis centrifugés à 300 g pendant 10 minutes à 4°C et l'absorbance du surnageant est estimé à 560 nm.

Le pourcentage de protection contre l'hémolyse induite par la chaleur est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Protection (\%)} = 100 - (\text{DO échantillon} / \text{DO contrôle}) \times 100$$

2-2-12-3-Hémolyse induite par un oxydant

La résistance des érythrocytes traités par l'extrait de feuilles d'*Arbutus unedo* à une oxydation induite par HOCl (acide hypochloreux) est évaluée selon le protocole décrit par SUWALSKY *et al* (2007).

1 ml d'une suspension de globules rouges (5%) solubilisé dans du PBS (pH 7.4) est mis en incubation pendant 15 mn à 37°C avec 1 ml de l'extrait à différentes concentrations. Après incubation, on centrifuge le mélange à 300 g pendant 10 mn à 4 °C, le surnageant est éliminé et le culot remis en suspension avec 0.5 mM de HOCl dans du PBS. Ensuite, l'incubation est réalisée comme décrit précédemment et l'absorbance déterminée à 540 nm. Le pourcentage de protection est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Protection (\%)} = 100 - (\text{DO échantillon} / \text{DO contrôle}) \times 100$$

2-2-12-4-Inhibition de la dénaturation thermique de la BSA

L'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine est évaluée par la méthode de KARTHIK *et al* (2013).

50 µl d'extrait à différentes concentrations (50 à 500 µg/ml) sont mélangés à 5 ml d'ovalbumine à 0,2%, préalablement préparée dans du PBS (pH6.4, NaCl 0.9%) Les tubes sont chauffés à 72°C pendant 5 minutes. Une fois refroidi nous lisons l'absorbance de chaque tube à 660 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation thermique de la BSA est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Protection (\%)} = 100 - (\text{DO échantillon} / \text{DO contrôle}) \times 100$$

2-2-12-5-Activité thrombolytique

L'inhibition de la thrombolyse est étudiée par la méthode décrite par PRASAD *et al* (2006).

Les échantillons de sang prélevés sur tube sec sont distribués à raisons de 1.5ml par tubes à hémolyse sec, puis incubés 90 minutes à 37°C. Une fois le caillot formé, le sérum est aspiré et les tubes sont pesés. 300 µl d'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à chaque tube et 300 µl d'eau distillée stérile est ajoutée au tube témoin (contrôle négatif) puis l'ensemble incubé pendant 90 minutes à 37°C. Le liquide obtenu après incubation est aspiré délicatement, puis les tubes sont pesés. La différence des pesées avant et après la lyse du caillot est comparée au témoin négatif et exprimée en pourcentage de lyse du caillot.

2-2-12-6-Inhibition de la peroxydation des membranes érythrocytaires

La peroxydation lipidique est évaluée par le dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS : thiobarbituric acid reactive substances) d'après la méthode de SANGEETHA *et al* (2010) avec quelques modifications.

Les composés carbonylés à l'instar du malondialdéhyde (MDA) réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour donner des chromophores de couleur rose absorbant à 532 nm. Le chromophore est obtenu lorsqu'une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de TBA.

En présence d'un inhibiteur (extrait ou BHT), la densité optique diminue et le pourcentage de protection vis-à-vis de la peroxydation est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Protection (\%)} = 100 - (\text{DO échantillon} / \text{DO contrôle}) \times 100$$

2-2-12-6-1-Préparation des membranes érythrocytaires

Le sang de volontaires est collecté dans des tubes héparinés, puis les globules rouges sont séparés du plasma par centrifugation de 3 ml de sang à 300 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot obtenu est lavé trois fois avec 3 ml de tampon phosphate (pH 7.4, NaCl 0.9%). Les globules rouges ainsi isolés sont lysés par 3 ml d'une solution hypotonique de tampon phosphate (pH 7.4, NaCl 0%). L'élimination de l'hémoglobine est effectuée par centrifugation à 3000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les membranes résultant (culot), sont lavées trois fois avec 3 ml d'eau distillée. A la fin de cette procédure, les membranes des érythrocytes concentrées de couleur blanchâtre sont obtenues puis resolubilisées dans 3 ml d'eau distillée.

2-2-12-6-2-Peroxydation des membranes érythrocytaires

Le mélange réactionnel contenant 500µl de membranes érythrocytaire, 500µl extrait (200 à 1000 µg/ml) et 500µl FeSO₄ 0.1 mM/H₂O₂ 1 mM puis incubé 1heure à 37°C. A la fin de l'incubation 0.5 ml d'éthanol à 70% est ajouté puis 1 ml d'acide thiobarbiturique puis incubé 20 minutes à 100°C. Refroidir les tubes et les centrifugés 10 minutes à température ambiante à 500g. L'absorbance du surnageant est mesurée à 535 nm. Le pourcentage de protection de

l'extrait est calculé par rapport à la densité optique du témoin positif qui correspond à 100% de peroxydation.

2-2-13-Capacité de liaison aux acides biliaires

2-2-13-1- Courbe étalon de l'acide cholique

Le suivi de la quantité d'acide cholique diffusant lors des divers protocoles mis en œuvre, passe par la construction d'une courbe d'étalonnage de l'acide cholique. Celle-ci est réalisée comme suit :

0.2 ml d'acide cholique à différentes concentrations est mélangé à 1 ml d'acide sulfurique à 70%. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 1 ml d'une solution de furfural à 0.25% est ajouté et l'absorbance est mesurée à 510 nm. Le facteur qui provoque la réaction colorée dans cette méthode est la solution aqueuse de furfural qui développe une coloration rose (GORECKA *et al*, 2003).

2-2-13-2- Inhibition de la diffusion de l'acide cholique

Le retardement de la diffusion de l'acide cholique est étudié suivant la méthode décrite par YOO *et al* (2005).

Les membranes de dialyse (MWCO sup 12000) sont immergées 24 h dans une solution d'azide de sodium à 0.1%. L'extrait est dissout à différentes concentrations (200 à 1000 µg/ml) dans une solution constituée, d'acide cholique (7.5mg/ml), Tris (0.1M, pH7) et d'azide de sodium à 0.1%, puis dialysé contre le même tampon.

Par intervalle de temps régulier la quantité d'acide cholique diffusant dans le dialysat est suivie par prélèvement de 0.2 ml du dialysat qui sont mélangés à 1 ml d'acide sulfurique à 70%. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 1 ml d'une solution de furfural à 0.25% est ajouté et l'absorbance est mesurée à 510 nm.

Le pourcentage de retard de dialyse de l'acide cholique (RAC) est calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{RAC}(\%) = \left[\frac{\text{Concentration en Acide cholique du test}}{\text{Concentration en Acide cholique du contrôle}} \right] \times 100$$

2-2-13-3-Capacité d'adsorption de l'acide cholique

La capacité de fixation de l'acide cholique est étudiée suivant la méthode décrite par ADISAKWATTANA *et al* (2012).

Les deux solutions utilisées (extrait et acide cholique) sont préalablement filtrées sur membrane à 0.2µm.

L'extrait à différentes concentration (200 à 1000 µg/ml) est incubé avec l'acide cholique (7.5 mg/ml) dans un tampon tris (0.1 M pH7) à 37°C pendant 90 minutes. Une fois refroidies les solutions sont filtrées (membrane à 0.2µm). 0.2 ml du filtrat est mélangé à 1 ml d'acide sulfurique à 70%. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 1 ml d'une solution de furfural à 0.25% est ajouté et l'absorbance est mesurée à 510 nm.

L'appréciation de la capacité d'adsorption de l'acide cholique par l'extrait est effectuée par rapport au témoin sans extrait.

2-2-14-Activité hypocholestérolémiant

2-2-14-1- Courbe étalon du cholestérol

Le dosage du cholestérol est effectué par spectrophotométrie grâce à un kit de dosage et une courbe d'étalonnage du cholestérol est réalisée comme suit :

10µl de cholestérol (0.2mg/ml) sont ajoutés à 1ml de la solution enzymatique du kit (spinreact). Le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 505 nm.

2-2-14-2- Inhibition de la diffusion du cholestérol

Le retardement de la diffusion du cholestérol est étudié suivant la méthode décrite par TIPPAYAKUL *et al* (2005).

Les membranes de dialyse (MWCO sup 12000) sont immergées 24 h dans une solution d'azide de sodium à 0.1%. L'extrait est dissout à différentes concentrations dans une solution constituée de cholestérol (2g/l) et d'azide de sodium à 0.1%, puis dialysé contre de l'eau distillée additionnée de 0.1% d'azide de sodium et de Triton X-100 (1%).

Par intervalle de temps régulier (1h) la quantité de cholestérol diffusant dans le dialysat est suivie par prélèvement de 10µl de dialysat qui sont ajoutés à 1ml de la solution enzymatique du kit (spinreact). Le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 505 nm.

Le pourcentage de retard de dialyse du cholestérol (RC) est calculé en utilisant la formule suivante:

$$RC(\%)=100-\left[\frac{\text{Concentration en cholestérol du test}}{\text{Concentration en cholestérol du contrôle}}\right]\times 100$$

2-2-14-3-Capacité d'adsorption du cholestérol

La capacité de fixation du cholestérol est étudiée suivant la méthode décrite par ADISAKWATTANA *et al* (2012).

L'extrait à différentes concentration est incubé avec du cholestérol (2g/l) sous agitation à 37°C pendant 2 heures. Une fois refroidies les solutions sont filtrées (membrane à 0.2µm) et 10µl du filtrat sont ajoutés à 1 ml du réactif (kit spinreact) (incubés 20 minutes à température ambiante, Do : 505 nm).

Les deux solutions utilisées (extrait et cholestérol) sont préalablement filtrées sur membrane à 0.2µm.

L'appréciation de la capacité d'adsorption du cholestérol par l'extrait est effectuée par rapport au témoin sans extrait.

2-2-15-Activité hypoglycémiante

2-2-15-1- Courbe étalon du glucose

Le dosage spectrophotométrique du glucose est effectué avec un kit de dosage spinreact. Cette étape a pour objectif la réalisation d'une courbe d'étalonnage du glucose qui nous permettra d'exprimer les résultats obtenus en termes de concentration en glucose.

10 µl de glucose à différentes concentrations sont ajoutés à 1ml de la solution enzymatique du kit (spinreact). Le mélange est incubé 20 minutes à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 505 nm.

2-2-15-2- Inhibition de la diffusion du glucose

Le retardement de la diffusion du glucose est étudié suivant la méthode décrite par OU *et al* (2001).

Les membranes de dialyse (MWCO sup 12000) sont immergées 24 h dans une solution d'azide de sodium à 0.1%. L'extrait est dissout à différentes concentrations dans une solution constituée de glucose (1g/l) et d'azide de sodium à 0.1%, puis dialysé contre de l'eau distillée additionnée de 0.1% d'azide de sodium.

Par intervalle de temps régulier (1h) la quantité de glucose diffusant dans le dialysat est suivie à une densité optique de 505nm.

Le pourcentage de retard de dialyse du glucose (RG) est calculé en utilisant la formule suivante:

$$RG(\%)= 100- \left[\frac{\text{Concentration en glucose du test}}{\text{Concentration en glucose du contrôle}} \right] \times 100)$$

2-2-15-3-Capacité d'adsorption du glucose

La capacité de fixation du glucose est étudiée suivant la méthode décrite par AHMED *et al* (2011).

5 ml de l'extrait à différentes concentration (1000 à 6000 µg/ml) est incubé avec du glucose (1g/l) à 37°C pendant 6 heures. Une fois refroidies les solutions sont centrifugées à 4000 g pendant 10 minutes. 10µl du surnageant sont ajoutés à 1 ml du réactif (kit spinreact) (incubés 20 minutes à température ambiante) puis l'absorbance est mesurée à 505 nm.

Le pourcentage d'adsorption du glucose par l'extrait est calculé par rapport à la concentration du surnageant du témoin sans extrait.

Les deux solutions utilisées (extrait et glucose) sont préalablement centrifugées à 4000g pendant 10 minutes pour l'utilisation du surnageant.

2-2-15-4-Consommation du glucose par les levures

L'effet de l'extrait aqueux sur la consommation du glucose par les levures est déterminé par la méthode décrite par BHUTKAR et BHISE (2013).

1ml d'extrait à différentes concentrations (1000 à 6000 µg/ml) est mélangé à 1 ml de glucose (1g/l), incubé 10 minutes à 37°C, puis additionné de 100µl de levures à 10% (obtenues après 3 lavages au PBS stérile à 300 g /5mn à 4°C). Après une heure d'incubation à 37°C les tubes sont centrifugés à 300 g /5mn à 4°C. La concentration en glucose du surnageant est mesurée à 505 nm.

Le pourcentage de glucose absorbé par les cellules est calculé par la formule suivante.

$$\text{Consommation de glucose (\%)} = \frac{Ac-Ae}{Ac}$$

Ac : Absorbance du contrôle sans l'extrait

Ae : Absorbance de l'échantillon

2-2-15-5-Inhibition de la glycation de la BSA

L'inhibition de la glycation de la sérum albumine bovine par l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* est étudiée par la méthode décrite par LEDESMA-OSUNA *et al* (2008). Ce test nous renseigne sur la capacité de l'extrait végétal à inhiber la glycation de la BSA et ainsi la formation des AGEs (Produits finaux de glycation avancée).

1 ml d'extrait, 1 ml de BSA (6mg/ml) et 1 ml de glucose (1g/l) sont mélangés, puis incubés une heure à 60°C. Une fois refroidi un contrôle électrophorétique en PAGE SDS est effectué, (gel de concentration [(T=4% et C= 2.7%) TRIS-HCl pH 6.8], gel de séparation [(T=15% et C= 2.7%) TRIS-HCl pH 8.8]).

Le pourcentage d'inhibition de la glycation de la BSA est apprécié par rapport au niveau de migration de la bande correspondant au témoin sans extrait.

2-2-16-Interaction plante-liquides biologiques

L'application pharmacologique de l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* passe par la détermination des paramètres pharmacocinétiques qui nous renseignent sur les interactions

entre les molécules bioactives et celles de l'organisme lors de leur parcours. Dans cette optique nous étudions l'effet de la salive, du sang et de l'urine sur l'effet antioxydant de l'extrait.

Ce volet de notre étude prend son inspiration des travaux de BENNICK (2002) sur l'interaction des polyphénols avec les protéines salivaires. Sur cette base, nous nous sommes intéressés à l'interaction de l'extrait d'arbousier avec différents liquides biologiques (salive, sang et urine).

2-2-16-1-Effet sur la réduction du molybdène

La technique utilisée est celle décrite par PRIETO *et al* (1999).

Dans un premier temps, nous optimisons le volume ou la concentration de chaque substance biologique induisant une capacité réductrice maximale comme suit :

- Pour la salive, cette détermination est effectuée sur 4 volumes (25, 50, 75, 100 μ l).
- Pour le sang, le plasma est séparé des globules rouges par centrifugation de 3 ml de sang à 300 g pendant 10 minutes à 4°C. Par la suite 4 volumes de plasma (25, 50, 75, 100 μ l), sont testés.
- Pour la BSA, 5 concentrations sont utilisées (5, 10, 15, 20, 25 μ g/ml)
- Pour l'urine, 5 volumes sont testés (5, 10, 15, 20, 25 μ l)

En deuxième lieu, nous étudions l'effet des concentrations précédemment déterminées sur la capacité de l'extrait à différentes concentrations à réduire le molybdène. Pour cela nous réalisons une solution mère pour chaque composé étudié (sang, salive, BSA et urine).

A partir de cette dernière, plusieurs dilutions sont effectuées. Un volume déterminé, ayant donné une activité réductrice maximale est respectivement prélevé de chaque dilution de salive, de sang, de BSA et d'urine, pour la réalisation du test.

2-2-16-2-Effet sur la réduction du fer

La méthode utilisée est celle décrite par OYAIKU (1986).

En premier lieu, nous optimisons le volume ou la concentration de chaque substance biologique étudiée comme suit :

- Pour la salive, la détermination du volume induisant un pouvoir réducteur de l'ion ferrique important est effectuée sur 8 volumes (de 50 à 400 μ l).

- Pour le sang, le plasma est séparé des globules rouges par centrifugation de 3 ml de sang à 300 g pendant 10 minutes à 4°C. Par la suite 5 volumes (50, 100, 200, 300 et 400 µl)
- Pour la BSA, 11 concentrations sont utilisées (de 10 à 210 µg /ml)
- Pour l'urine, 13 volumes sont réalisés (de 1 à 45 µl)

En deuxième lieu, nous étudions l'effet des concentrations optimales précédemment déterminées sur le pouvoir réducteur de l'extrait à différentes concentrations. Pour cela nous réalisons une solution mère pour chaque composé étudié (sang, salive, BSA et urine).

A partir de cette dernière, plusieurs dilutions sont effectuées. Un volume déterminé, ayant donné une activité réductrice maximale est respectivement prélevé de chaque dilution de salive, de sang, de BSA et d'urine, pour la réalisation du test.

2-2-17-Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo* est évaluée par la méthode décrite par FALLEH *et al* (2008) vis-à-vis de dix souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogene* ATCC 15313, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Citrobacter freundii* ATCC 8090

Les souches bactériennes sont préalablement revivifiées en milieu BHIB (24h à 37°C), isolées en colonies par la méthode des stries sur milieu Mueller Hinton, puis réincubées à 37°C pendant 24 h sur le même milieu.

Une ou plusieurs colonies sont prélevées pour réaliser une suspension standardisée dans l'eau physiologique ($10^6 - 10^8$ UFC/ml, à 620 nm, $D_{0.1} = 0,08$ à 0,1).

De nouvelles boîtes sontensemencées à partir de cet inoculum par écouvillonnage.

Des disques de papier Whatman n° 1 de 6 mm de diamètre, stériles, sont déposés à la surface du milieu Mueller Hinton puis chargés de 15 µl des extraits aqueux à la concentration de 50mg/ml.

Les disques des contrôles négatifs (imprégnés d'eau distillée) et des contrôles positifs (antibiotique de référence gentamicine 10µg/disque) sont placés à la surface de ces boîtes

puis le tout est préincubé 30 minutes sur paillasse à température ambiante puis incubé à 37°C pendant 24h.

Les résultats correspondants aux diamètres des zones d'inhibition produites autour des disques sont exprimés en millimètre.

2-2-17-1- Détermination des concentrations minimales inhibitrices

La détermination des concentrations minimales inhibitrices est réalisée sur milieu solide (Mueller Hinton) (DZOMBA et MUCHANYEREYI, 2012), pour les souches bactériennes ayant exprimé une susceptibilité vis-à-vis de l'extrait.

Une série de dilutions de l'extrait est réalisée dans de l'eau distillée stérile. Parallèlement, l'inoculum bactérien est réalisé dans de l'eau physiologique stérile (10^6 - 10^8 UFC/ml, à 620 nm, Do= 0,08 à 0,1).

Une série de disques imbibés par différentes concentrations d'extrait (15µl/disque), sont disposés à la surface des boîtes de pétri préalablementensemencées par l'inoculum bactérien, laissés 15 minutes sur la paillasse pour une prédiffusion de l'extrait, puis incubé 24 heures à 37°C.

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus petite concentration d'extrait qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après incubation.

2-2-18-Activité anti-leishmania

La détermination de l'effet leishmanicide de l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* est réalisée suivant le protocole de GOMES *et al* (2002).

Les promastigotes de *Leishmania infantum* fourni par l'institut Pasteur d'Alger sous la référence (MON-1/DZ/01/LIPA1227/01) cultivé sur milieu NNN (7 jours à 25°C). Les cultures sont centrifugées 10 minutes à 300 g à 4°C puis subissent 3 lavages à l'eau physiologique et transférées sur milieu RPMI 1640 supplémenté de 10% de sérum de veau foetal.

La suspension parasitaire est ajustée à 10^6 cellules /ml est additionnée de l'extrait aux concentrations finales de (12.5, 25, 50 et 100 µg/ml), suivi d'une incubation de 72 heures à 25°C. Le pourcentage de viabilité des promastigotes est estimé par la méthode colorimétrique à l'iodure de propidium.

Résultats
et
Discussion

3- Résultats et discussion

3-1-Détermination de la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux

L'extrait brut obtenu par macération dans de l'eau distillée a subi une analyse quantitative par dosage spectrophotométrie de la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins.

- La quantité en polyphénols, en flavonoïdes et en tanins sont calculées respectivement en se référant aux courbes d'étalonnage (figure 13, 14 et 15) de l'acide gallique, de la quercétine et de l'acide tannique et les résultats obtenus sont exprimés respectivement en équivalent acide gallique par gramme d'extrait, en équivalent quercétine par gramme d'extrait et en équivalent d'acide tannique par gramme d'extrait.

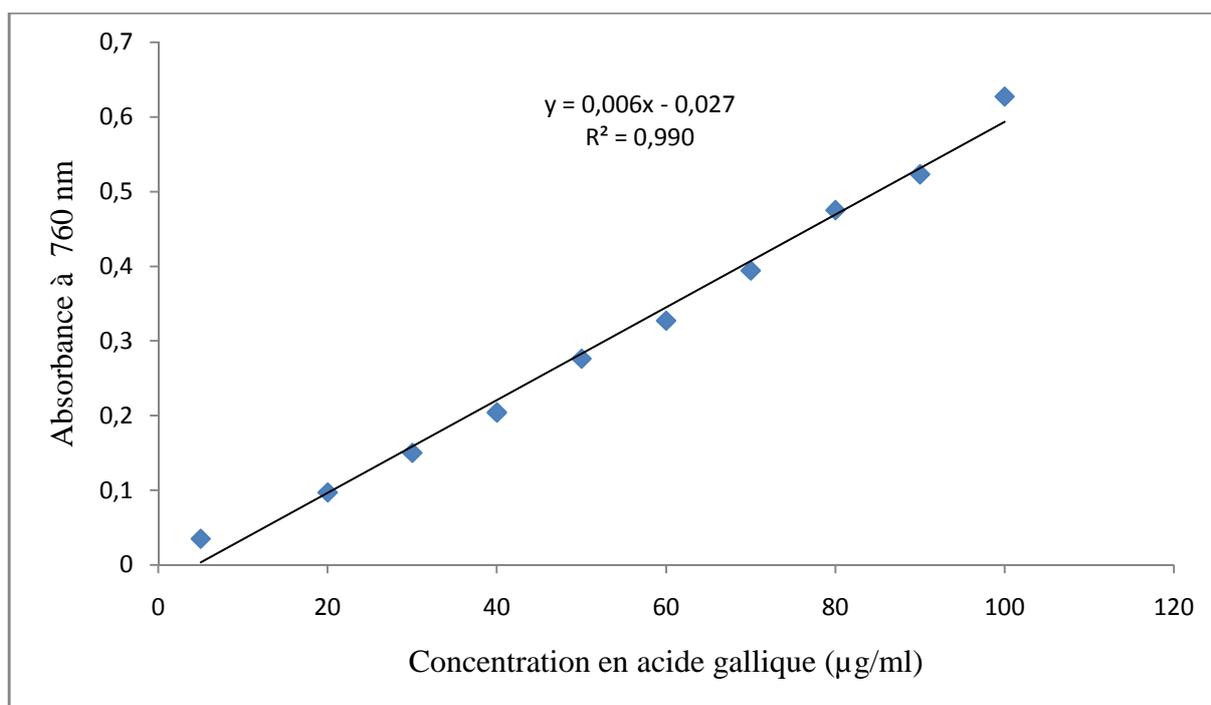


Figure 13: Courbe étalon de l'acide gallique.

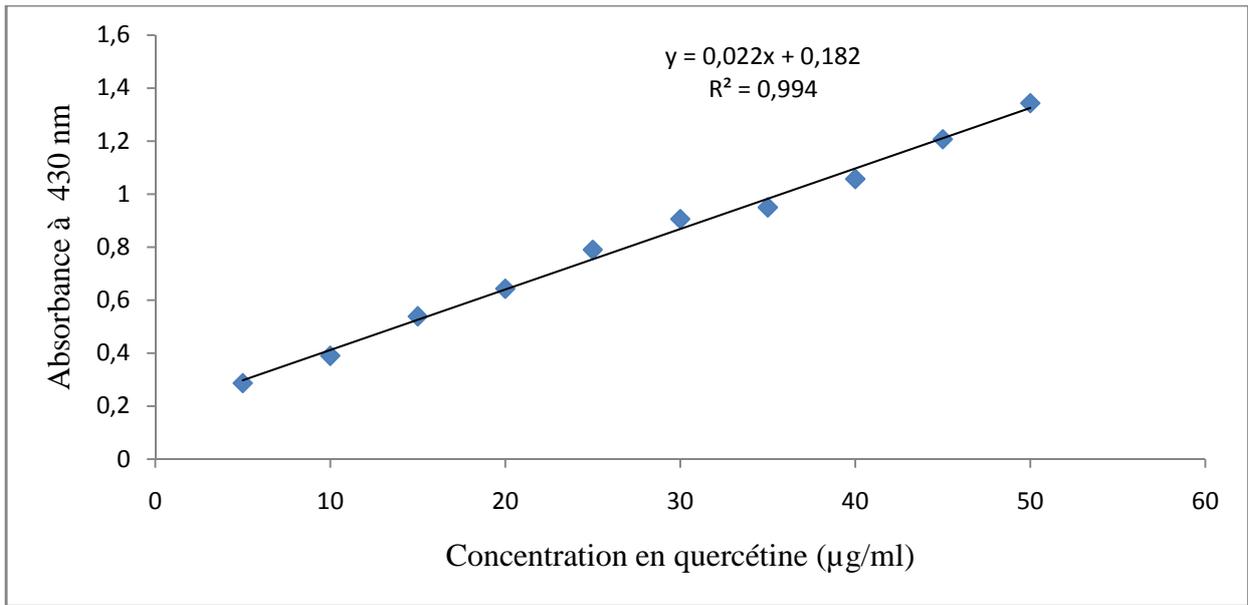


Figure 14 : Courbe étalon de la quercétine.

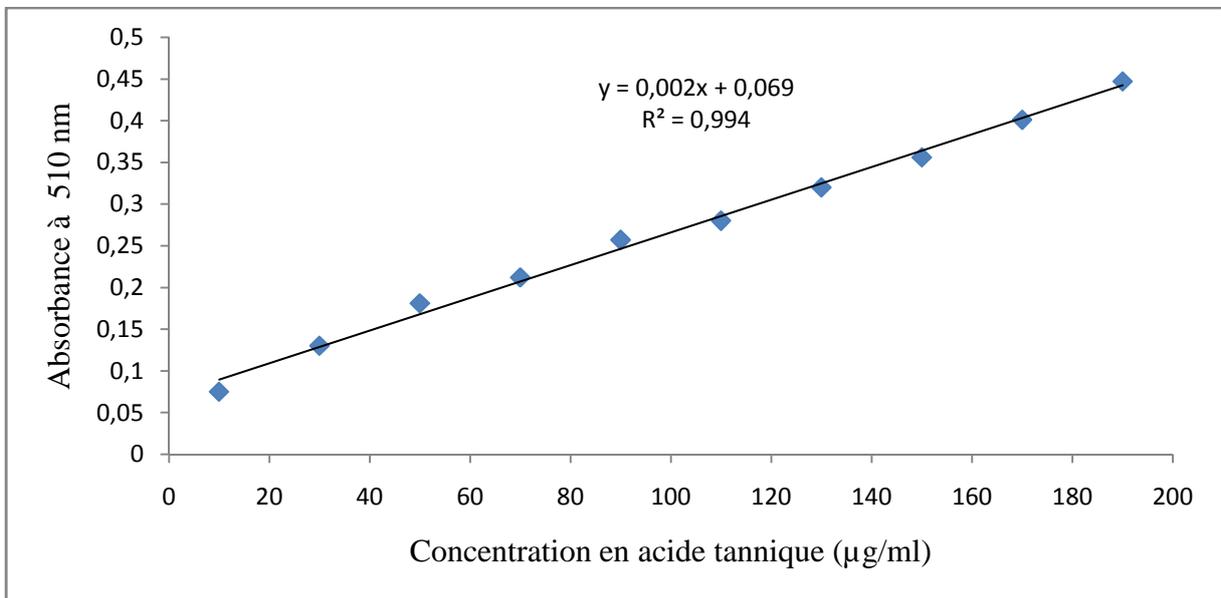


Figure 15 : Courbe étalon de l'acide tannique.

Tableau 3: Résultats du dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins.

Fraction	Concentration
Polyphénols	207.84 ± 15.03 mg EAG/g d'extrait
Flavonoïdes	13.070 ± 0.096 mg EQ/g d'extrait
Tanins	10.42 ± 1.91mg EAT/g d'extrait

Les résultats obtenus (tableau 3) montrent que la teneur moyenne en polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux de l'extrait aqueux d'*Arbutus Unedo* sont respectivement de 207.84 ± 15.03 mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait, 13.070 ± 0.096 mg équivalent quercétine par gramme d'extrait et 10.42 ± 1.91 mg équivalent acide tannique par gramme d'extrait.

Diverses variations des paramètres inhérents aux conditions d'extraction et aux proportions (solvant / soluté) utilisés rendent difficile la comparaison de ces résultats à la littérature.

Néanmoins, dans une étude comparative réalisée par ORAK *et al* (2011) sur des extraits d'*Arbutus unedo* obtenus par macération éthanolique et méthanolique (5g de feuilles dans 250 ml de solvant), montre que le rendement en polyphénols totaux est plus important dans le cas de la macération méthanolique. Dans la même étude, la macération aqueuse réalisée dans les mêmes proportions que celles adoptées dans notre étude donne une teneur en polyphénols totaux (394.32 ± 1.43 mg EAG/g d'extrait) plus importante que celle que nous avons enregistrés. Ces variations pourraient s'expliquer par la nature du sol, la saison etc.

Un nombre important d'études rapportent l'utilisation de différents solvants tels que le méthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle ainsi que leurs combinaisons avec différentes proportions d'eau, pour l'extraction des composés phénoliques à partir de matières végétales. Malgré l'efficacité de ces solvants, en raison de leur potentiel toxique, les extraits en résultant ne sont pas sûrs pour la consommation humaine (NAWAZ *et al*, 2006), contrairement à l'extrait aqueux qui offre la possibilité de l'incorporer dans la composition des produits alimentaires et pharmaceutiques.

Les extraits végétaux possèdent un large éventail d'activités biologiques, celles-ci sont étroitement liées à la teneur et à la composition en polyphénols (CABRAL *et al*, 2012). L'objectif visé par plusieurs recherches est d'augmenter la richesse et la variété en polyphénols des extraits étudiés. Sachant que ces teneurs varient nettement selon le solvant utilisés ceux-ci peuvent être classés par ordre décroissant de capacité d'extraction des polyphénols et comme suit (BOURGOU *et al*, 2016):

Eau > éthanol 70% > acétone 70% > méthanol absolu > éthanol absolu > méthanol 70% > acétone absolu et par ordre décroissant de capacité d'extraction des flavonoïdes : éthanol 70% > méthanol absolu > eau > éthanol absolu > acétone absolu > acétone 70% > méthanol 70%.

Comparativement aux autres solvants l'extraction aqueuse est la moins efficace pour l'extraction des tanins (BALDOSANO *et al*, 2015), ce qui explique le faible taux obtenu dans cette étude.

L'amélioration de l'extraction passe par l'optimisation, d'une part du système de solvant et d'autre part des paramètres tels la température et le temps d'extraction. L'augmentation de la température et du temps d'extraction, augmentent la libération du contenu végétal dans le milieu (RAJBHAR *et al*, 2015). Néanmoins, une élévation importante de la température (au-delà de 100°C) aboutit à la dégradation des polyphénols (SOLYOM *et al*, 2014 ; VERGARA *et al*, 2012).

La mise au point d'un solvant standard approprié à l'extraction de différents métabolites antioxydants à partir de la matrice végétale est impossible jusqu'à l'heure actuelle. Ainsi, le processus de criblage est important pour identifier le meilleur solvant approprié à une extraction spécifique et ainsi approcher un potentiel antioxydant optimal de l'échantillon étudié (ADDAI *et al*, 2013).

3-2-Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

Les profils de l'activité antiradicalaire obtenus (figure 16) révèlent que l'extrait et le standard possèdent une activité dose dépendante. L'acide ascorbique ($IC_{50} = 2.359 \pm 0.091 \mu\text{g/ml}$) montre une activité antiradicalaire plus importante que l'extrait d'arbousier ($7.956 \pm 0.278 \mu\text{g/ml}$).

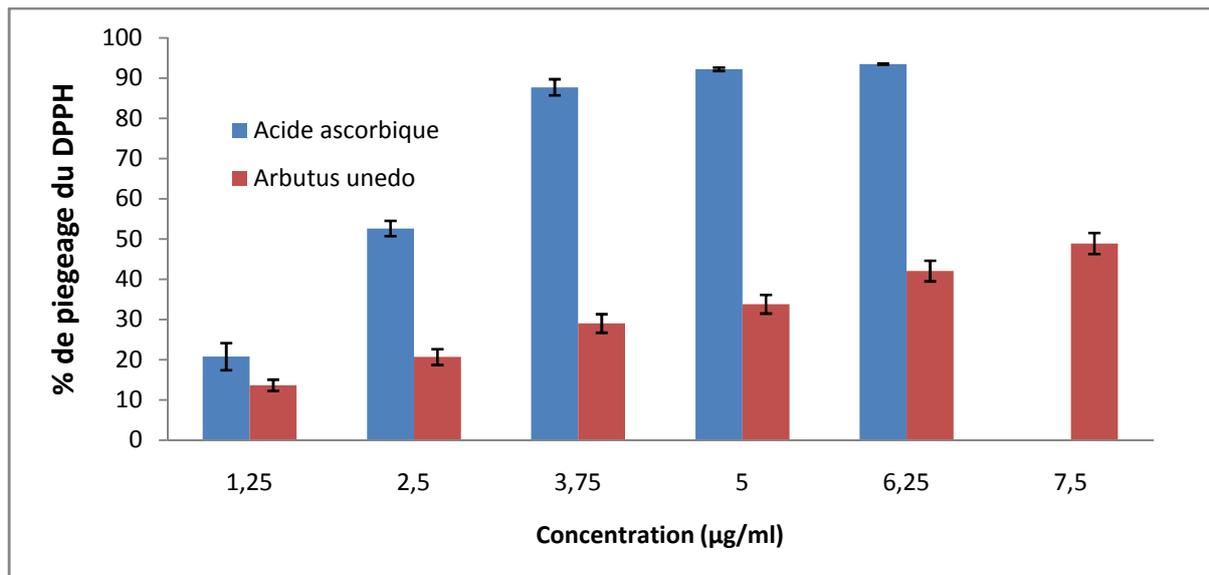


Figure 16 : Capacité de piégeage du DPPH de l'extrait et de la vitamine C.

Le potentiel antiradicalaire de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* s'avère être plus important ($7.956 \pm 0.278 \mu\text{g/ml}$) comparativement aux valeurs d'IC50 rapportées par OLIVEIRA *et al* (2009) ($73.7 \pm 6.3 \mu\text{g/ml}$), MENDES *et al* (2011) ($87 \pm 7 \mu\text{g/ml}$) et ORAK *et al* (2011) ($487,2 \mu\text{g/ml}$), pour le même extrait végétal.

Cette différence marquée du potentiel antiradicalaire, s'explique d'une part par une variabilité des teneurs en polyphénols totaux (KILICGUN et ALTINER, 2010) et d'autre part par la variabilité de la composition de ces derniers, particulièrement en flavonoïdes (FARASAT *et al*, 2014).

Les flavonoïdes grâce à leur forte tendance à céder des atomes d'hydrogène portés par les groupements hydroxyle, sont de puissants agents antiradicalaires (SANDHAR *et al*, 2011). Une des caractéristiques structurales des flavonoïdes est la variabilité du taux d'hydroxylation des cycles phénoliques suivant le flavonoïde considéré. Cette caractéristique influence directement sur la capacité donatrice en hydrogène et donc sur le potentiel antiradicalaire (LE *et al*, 2007).

3-3-Inhibition du blanchiment du β -carotène

Il est admis depuis longtemps que le β -carotène réagit avec le radical peroxyde pour produire des époxydes de β -carotène. Cette caractéristique en fait un excellent piègeur de radicaux libres et lui a valu une attention particulière en recherche scientifique (TSUCHIHASHI *et al*, 1995).

L'inhibition du blanchiment du β -carotène dans une oxydation couplée avec l'acide linoléique est une méthode largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante (LI *et al*, 2016). L'acide linoléique forme un radical peroxyde en présence d'espèces réactives d'oxygène. Ce radical peroxyde réagit avec le β -carotène et entraîne une décoloration rapide de celui-ci. Le rôle de l'antioxydant est de réduire le blanchiment du β -carotène ce qui en traduit l'efficacité à inhiber la peroxydation des lipides (TAKADA *et al*, 2006).

L'oxydation des lipides est un problème majeur pour la santé humaine ainsi que pour la stabilité des produits alimentaires (GAO *et al*, 2000), ce qui fait de la recherche d'agents bioactifs contre la dégradation des lipides un axe important où s'inscrit notre étude. La capacité d'inhibition du blanchiment du β -carotène par l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* illustré en figure 17, s'avère être très importante. Comparativement au BHT utilisé comme référent ($96.88 \pm 0.34\%$ à $1000 \mu\text{g/ml}$), l'extrait étudié révèle une inhibition relativement proche ($87.04 \pm 1.21\%$ à $1000 \mu\text{g/ml}$).

Ces résultats s'avèrent être proches de ceux rapportés par ORAK *et al* (2011) (75.8% à $1000\mu\text{g/ml}$) et confirment ainsi le potentiel antioxydant des composés extraits.

L'effet inhibiteur de l'extrait étudié serait dû aux composés polyphénoliques le constituant, qui entraveraient le blanchiment du β -carotène en neutralisant les radicaux libres issus de l'oxydation de l'acide linoléique. Les polyphénols, retardent l'oxydation des lipides grâce à leur capacité de piéger les radicaux libres. Celle-ci est proportionnelle au nombre de groupement hydroxyles constituant ces composés (GAO *et al*, 2000). Ainsi, l'activité inhibitrice du blanchiment du β -carotène par l'extrait d'Arbousier pourrait être attribuée à son contenu élevé en composés hydroxylés.

La polarité et la solubilité des antioxydants déterminent leur concentration en différents endroits d'un système multiphasique. Leur activité antioxydante est affectée par leurs taux de diffusion, leur stabilité et leur degré de dissociation, qui peuvent changer avec leur emplacement dans ce système (HUANG *et al*, 1996).

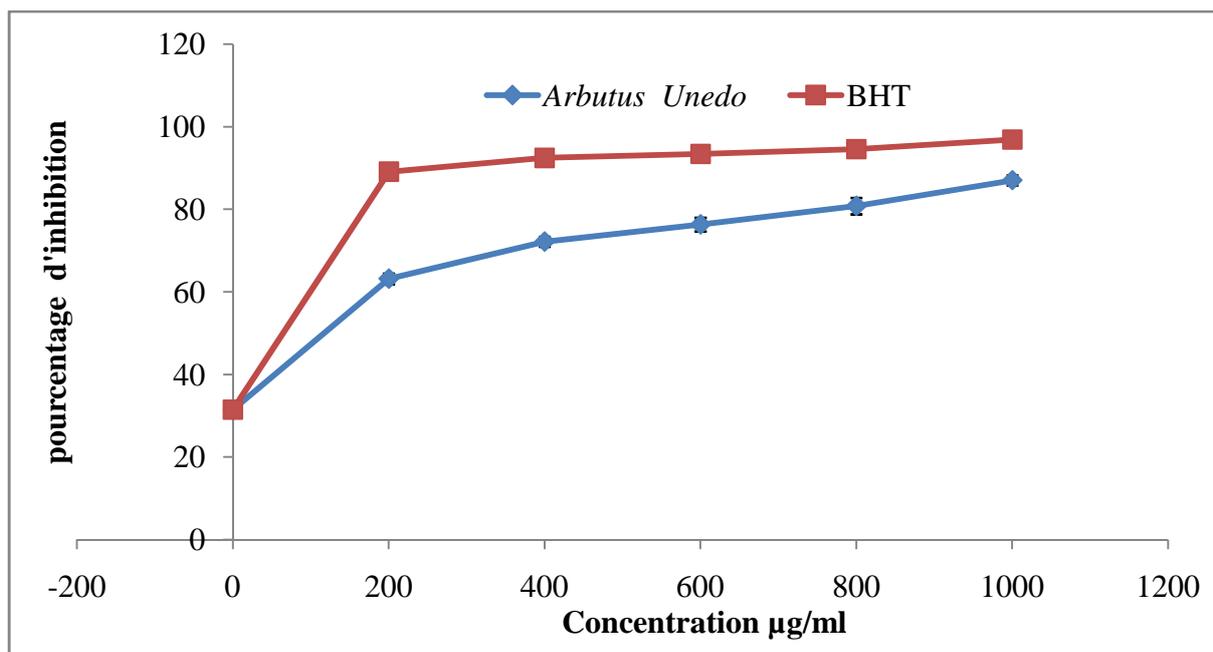


Figure 17 : Pourcentages d'inhibition du blanchiment du β -carotène par l'extrait et le BHT.

3-4-Piégeage du radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est le plus toxique des radicaux libres. Il est le principal responsable des dommages causés aux molécules biologiques (GARDES *et al*, 2003). La recherche de biomolécules ayant le potentiel de réagir avec les radicaux libres et en atténuer les dommages reste un enjeu majeur.

L'activité de l'extrait d'arbousier sur le radical hydroxyle est illustrée en figure 18. Cet extrait présente une activité de piégeage dose dépendante vis-à-vis des radicaux hydroxyles.

Comparativement au standard dont l'IC 50 est de $758.83 \pm 7.40 \mu\text{g/ml}$, notre extrait avec une IC50 de $1015.74 \pm 46.35 \mu\text{g/ml}$ est relativement moins efficace vis-à-vis des radicaux hydroxyles. Ces résultats font état d'une activité de piégeage du radical hydroxyle de l'extrait supérieur à l'extrait aqueux de *Kedrostis foetidissima* où l'on retrouve une IC50 de $6000\mu\text{g/ml}$ (KALAISEZHAYEN et SASIKUMAR, 2015).

Selon PHILIPS *et al* (2010), le potentiel antiradicalaire de l'extrait peut s'expliquer par sa forte capacité à donner un hydrogène ou à inhiber les réactions d'initiation radicalaires par la chélation des métaux comme le fer et le cuivre.

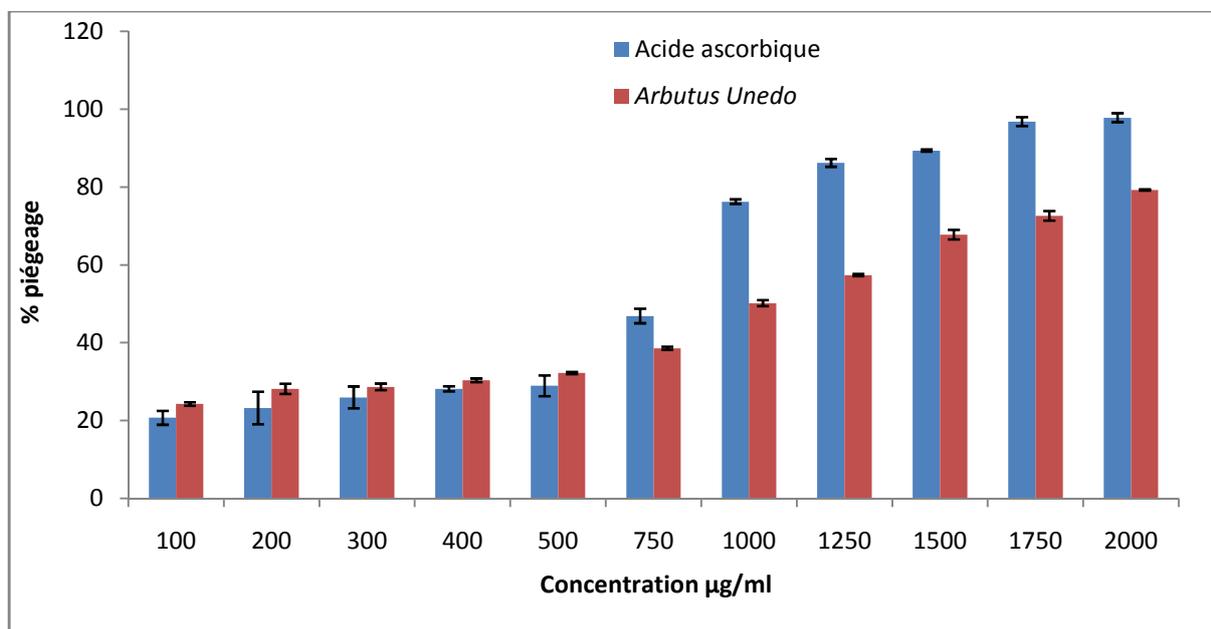


Figure 18: Capacité de piégeage du radical hydroxyle de l'extrait et de la vitamine C.

3-5-Piégeage du peroxyde d'hydrogène

Nous avons étudié l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* par le suivi de la diminution de l'absorbance de cette molécule (H_2O_2) à 230 nm. Les résultats obtenus sont rapportés dans la figure 19.

L'extrait végétal étudié se caractérise par une activité de piégeage du H_2O_2 dose dépendante. Cette activité est estimée par une IC₅₀ de $114.77 \pm 16.86 \mu\text{g/ml}$, nettement plus faible comparativement au standard dont l'IC 50 est de $49.19 \pm 2.70 \mu\text{g/ml}$.

Avec une IC₅₀ de $200.23\mu\text{g/ml}$ enregistré pour *Kyllinga nemoralis*, notre extrait présente une activité relativement plus importante (SINDHU *et al.*, 2014).

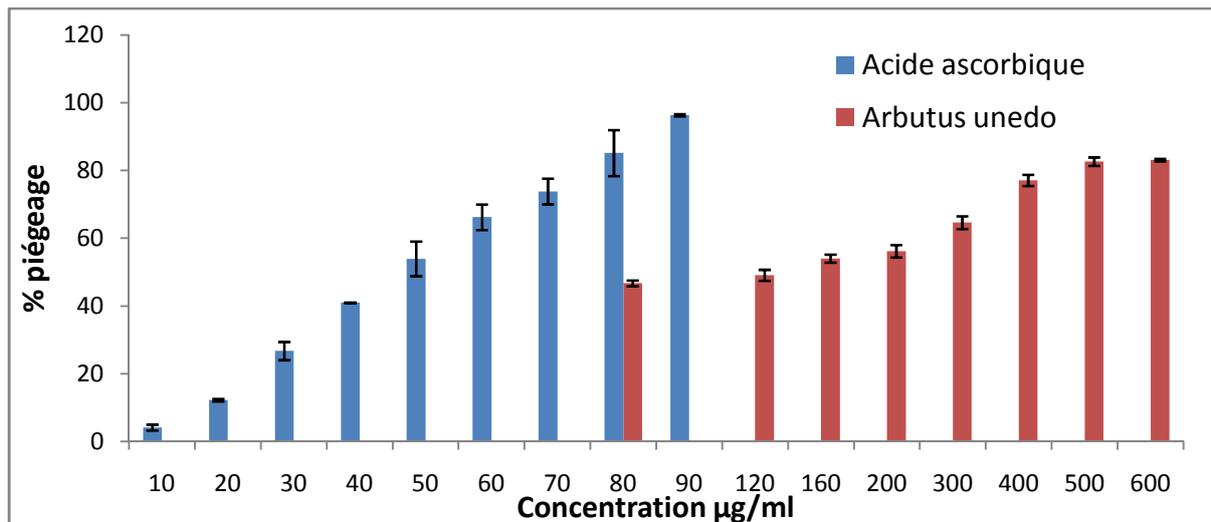


Figure 19 : Capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène de l'extrait et de la vitamine C.

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas considéré comme un radical libre (GARDES *et al*, 2003). Néanmoins, sa diffusion rapide à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique (BIENERT *et al*, 2006) ajouté au fait qu'il peut générer le radical hydroxyle en présence d'ions métalliques (POSPISIL, 2009) fait qu'il joue un rôle majeur dans l'altération des biomolécules.

La neutralisation du H_2O_2 par les polyphénols s'explique par leur capacité à céder des électrons, ce qui accélère la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau (BENDARY *et al*, 2013).

L'activité antiradicalaire des polyphénols s'exprime par la conversion d'un radical très réactif en un radical plus stable par des réactions de transfert d'atomes d'hydrogènes et/ou d'électrons (DI MEO *et al*, 2013). Cette capacité à céder un atome H est associé à l'énergie de dissociation de la liaison O-H. Plus celle-ci est faible, plus fort est le caractère donneur du polyphénol (LEOPOLDINI *et al*, 2011).

3-6-Réduction du molybdène

La capacité réductrice du molybdène par l'extrait aqueux d'arbousier ainsi que par la vitamine C sont rapportés en figure 20. Nous constatons à partir de ces résultats qu'il y a une proportionnalité entre la concentration de l'extrait et du standard avec leur capacité à réduire le molybdène.

Notre extrait avec une IC_{50} de 461.67 ± 4.16 µg/ml présente un effet réducteur modéré comparativement à la vitamine C dont l' IC_{50} est de 292 ± 7.54 µg/ml. Néanmoins cette

activité est nettement plus faible comparativement à l'IC50 enregistré pour les feuilles de *Ficus Benghalensis* ($31.48 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$) (YADAV *et al*, 2011).

A notre connaissance et selon les articles consultés, aucune étude n'a été réalisée sur l'activité antioxydante totale de l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo*. Pour cela, il est difficile de comparer nos résultats.

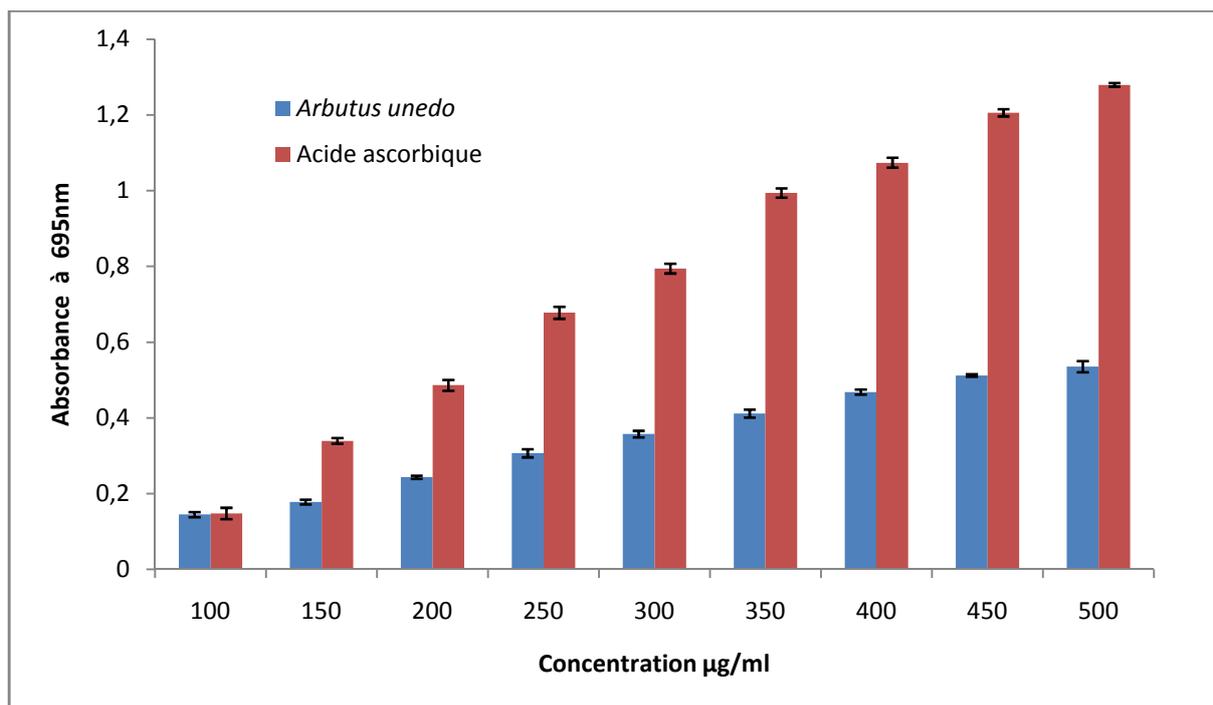


Figure 20: Capacité de réduction du molybdène par l'extrait et par la vitamine C.

3-7-Réduction du fer

L'une des techniques les plus utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits végétaux est la réduction de l'ion ferrique (GÜLÇİN *et al*, 2005).

Le pouvoir réducteur déterminé pour l'extrait comparé au standard, illustré en figure 21, indique une évolution dose dépendante. L'extrait aqueux ($IC_{50} = 156.55 \pm 17.40 \mu\text{g/ml}$) se révèle avoir une activité réductrice nettement plus faible que celle enregistrée pour la vitamine C ($IC_{50} = 56.72 \pm 2.79 \mu\text{g/ml}$). Comparé aux IC_{50} rapporté par EL JEMLI *et al* (2016) pour *Juniperus thurifera* (35.83 ± 0.37) et *Tetraclinis articulata* (47.12 ± 0.15), l'activité réductrice de l'extrait d'*Arbutus unedo* est nettement inférieure.

Dans ce test, le sel ferrique est utilisé comme oxydant et l'effet antioxydant de l'extrait s'exprime par la réduction des ions ferriques par transfert d'électrons (GÜLÇİN *et al*, 2003).

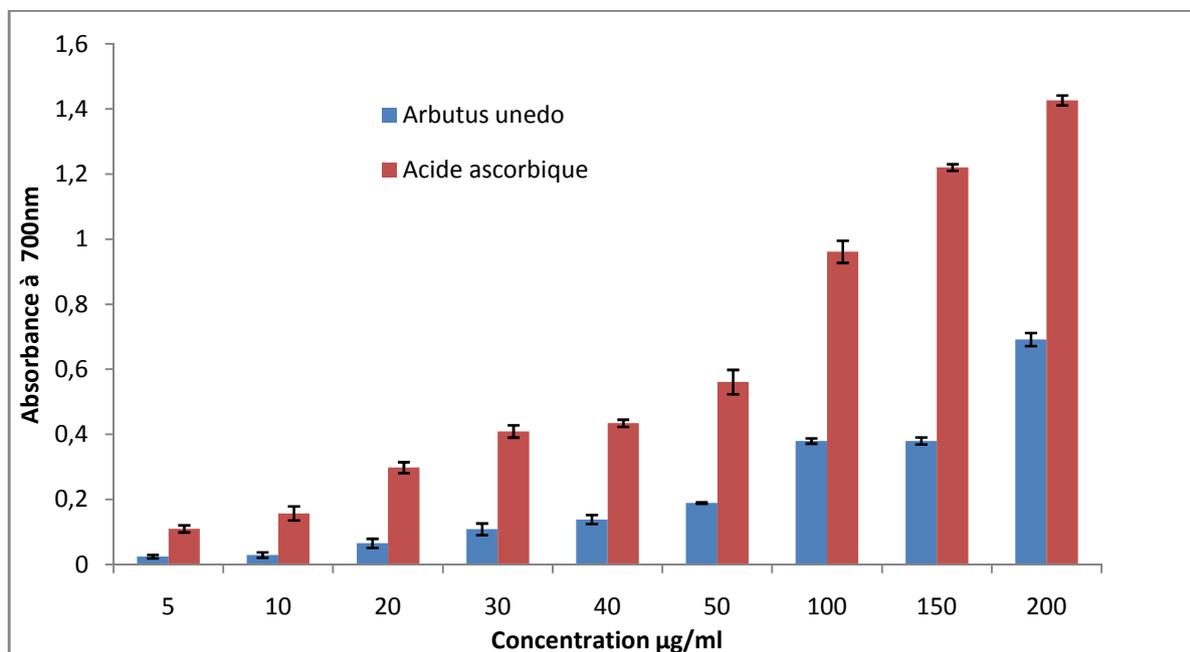


Figure 21 : Capacité de réduction du fer par l'extrait et par la vitamine C.

3-8-Chélation du fer

Dans cette étude l'activité chélatrice du fer ferreux a été mesurée par inhibition de la formation du complexe ferrozine-Fe²⁺. L'effet chélateur de l'extrait et du standard sur le fer ferreux augmente en fonction de la concentration comme l'indique la figure 22.

L'extrait aqueux d'arbousier présente avec une IC₅₀ de 1014.30 ± 36.21 µg/ml une activité chélatrice très faible comparée à l'EDTA qui présente une IC₅₀ de 57.21 ± 0.44 µg/ml. De plus ce faible pouvoir chélateur est confirmé par comparaison à l'IC₅₀ de 54.46±0.55 µg/ml enregistrée par ROBU *et al* (2012) pour *Lavandula angustifolia* ssp. *Angustifolia*.

La capacité chélatrice d'un extrait est très importante du fait que celle-ci diminue la concentration en Fe²⁺ connu pour être un puissant pro-oxydant (GÜLÇİN *et al*, 2010). Il est d'autant plus dangereux qu'il peut contribuer à générer des radicaux hydroxyles par réaction de Fenton (ENAMI *et al*, 2014).

Selon HIDER *et al* (2001), les polyphénols grâce à leur groupement phénoxydes jouent le rôle de puissants ligands et favorisent l'interaction avec des cations à forte densité de charge

(Fe³⁺, Fe²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺). Néanmoins, cette capacité chélatrice est perdue lors de la glycosylation du polyphénol du fait de son incapacité à se déprotoner.

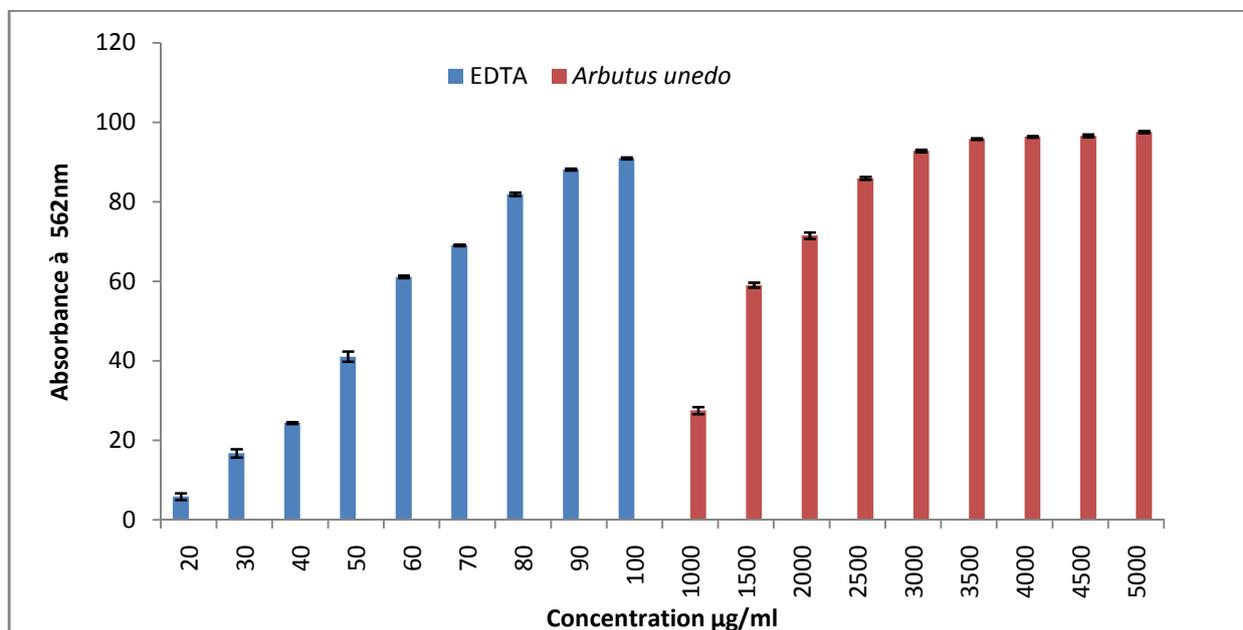


Figure 22 : Capacité de chélation du fer par l'extrait et L'EDTA.

3-9-Effet de l'extrait sur les membranes érythrocytaires

3-9-1-Innocuité de l'extrait vis-à-vis des cellules érythrocytaires

Avant l'étude de l'activité protectrice de l'extrait aqueux d'arbousier nous nous sommes intéressés à son effet hémolytique sur les globules rouges comparé à la saponine.

La saponine est hémolytique par interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire entraînant la libération de l'hémoglobine (BAUMANN *et al*, 2000).

Cette propriété a conduit à la mise en place de tests d'hémolyse permettant la détection de saponines dans les extraits de plantes (SPARG *et al*, 2004).

Le test d'hémolyse a été réalisé pour une gamme de concentrations allant de 50 à 500 µg/ml. La Figure 23, présente les courbes d'hémolyse obtenues pour l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo* et de la saponine.

Les résultats indiquent clairement que l'extrait étudié ne présente pas d'effet hémolytique aux concentrations utilisées. Les densités optiques enregistrées restent proches de celles du tube témoin (sans extrait) et très inférieure à celles de la saponine.

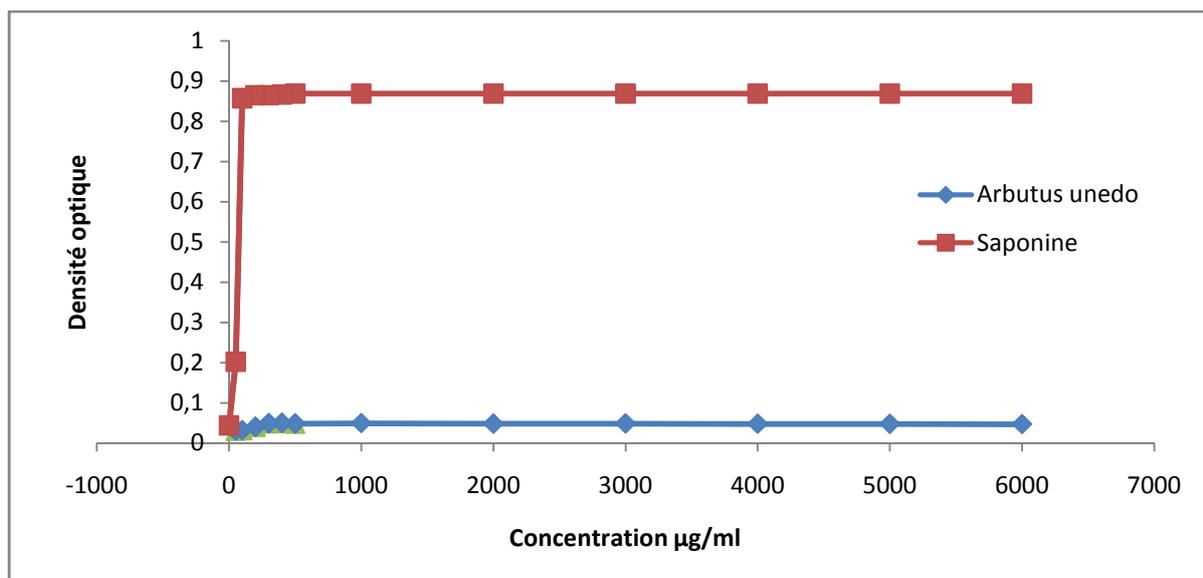


Figure 23 : Densité optique du test d'hémolyse de l'extrait comparée à la saponine.

Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très important pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits végétaux. Cette activité peut être évaluée par l'inhibition de l'hémolyse induite par une solution hypotonique et la chaleur (SHINDE *et al*, 1999).

3-9-2-Protection des érythrocytes vis-à-vis d'un stress osmotique

Les résultats obtenus, reportés en figure 24, sont exprimés en pourcentage d'hémolyse.

Nous notons une proportionnalité entre la concentration en extrait et le pourcentage de protection pour toutes les concentrations salines utilisées.

L'effet protecteur maximal enregistré à une concentration de 1500 µg/ml de l'extrait est respectivement de 46.15 ± 0.70 , 79.53 ± 0.43 , 70.78 ± 1.38 , 71.95 ± 2.26 , $76.46 \pm 1.80\%$ pour des concentrations en NaCl de 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% et 0.9%.

Ces résultats restent nettement supérieurs au pourcentage maximal de 40.3 enregistré pour l'extrait aqueux de *Chenopodium opulifolium* (AJAYI *et al*, 2017).

La lyse osmotique est due à la perte osmotique d'électrolytes intracellulaires. L'inhibition de la lyse induite par l'hypotonicité implique clairement des processus qui empêchent la migration de ces composants intracellulaires vers l'extérieur de la cellule. De plus, il a été démontré que la déformabilité cellulaire et les volumes cellulaires d'érythrocytes sont étroitement liés à leur teneur intracellulaire en calcium. Ainsi, l'effet de stabilisation de la membrane par ces agents pourrait être dû à une altération de l'afflux de calcium dans les érythrocytes (OMALE et OKAFOR, 2008). Le mécanisme précis pour ces effets reste à élucider.

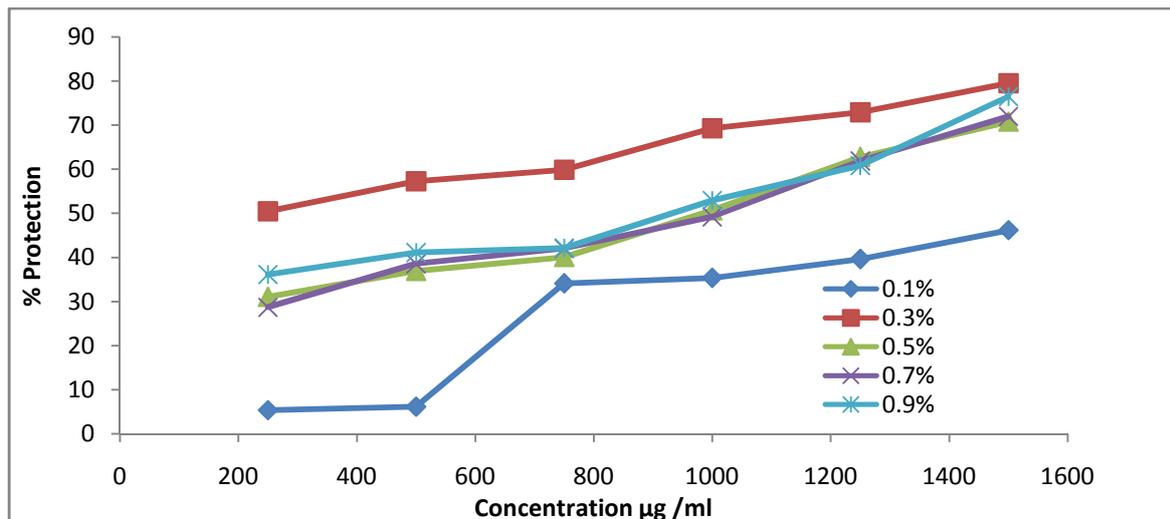


Figure 24 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis d'un stress osmotique.

3-9-3-Protection des érythrocytes vis-à-vis de la chaleur

Les données recueillies lors du test d'hémolyse induite par la chaleur sont consignées en figure 25. Celles-ci indiquent clairement que la protection des globules rouges par l'extrait aqueux vis-à-vis de la chaleur est dose dépendante.

Pour des concentrations allant de 0.025 à 0.500 mg/ml, l'extrait montre une bonne protection des hématies humaines avec un pourcentage variant entre 45.70 ± 1.30 et 79.66 ± 1.92 . Comparativement à l'aspirine qui pour les mêmes concentrations induit une protection allant de 25.65 ± 1.57 à $58.49 \pm 1.23\%$, l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* est nettement plus efficace. Cette efficacité est aussi retrouvée en comparant nos résultats à ceux de AJAYI *et al* (2017) qui a enregistré pour l'extrait aqueux de *Chenopodium opulifolium* un pourcentage maximal de protection de 49.6.

La protection des globules rouges vis-à-vis de la lyse induite par la chaleur peut s'expliquer par l'interaction de l'extrait avec des protéines membranaires inhibant ainsi leur dénaturation (LEPOCK *et al*, 1989).

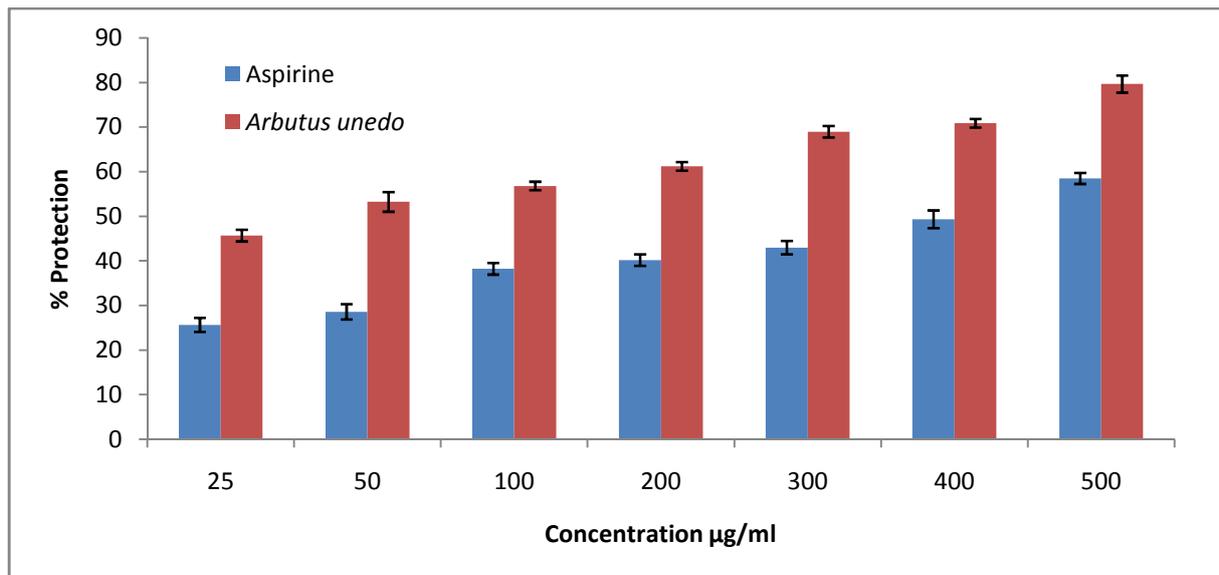


Figure 25 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis de la chaleur.

3-9-4-Protection des érythrocytes vis-à-vis d'un oxydant

L'étude de l'effet protecteur de l'extrait contre l'hémolyse oxydative induite par HOCl présente un effet dose dépendant, comme l'illustre la figure 26. Le pourcentage de protection enregistré est de l'ordre de $73.90 \pm 2.08\%$ à la concentration de 1 mg /ml de la plante.

A travers la littérature *Camellia sinensis* reste la plante qui présente l'activité protectrice la plus élevée des membranes érythrocytaires vis-à-vis de HOCl avec une protection de 50% à la concentration de 1.6 µg/ml (CAMARGO *et al*, 2016).

En raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en hémoglobine, ces cellules sont extrêmement susceptibles aux dommages oxydatifs (ARBOS *et al*, 2008).

HOCl est un oxydant extrêmement toxique qui peut réagir avec une variété importante de composants cellulaires (HAWKINS et DAVIES, 1998). Il induit d'une part l'oxydation des phospholipides (VISSERS *et al*, 1994) et d'autre part celle des groupes SH ainsi que la formation de chloramine à partir des protéines membranaires (ZAVODNIK *et al*, 2001).

L'altération de l'élasticité membranaire ainsi que la dénaturation des protéines membranaires conduit à la formation de pores hémolytiques dans la membrane érythrocytaire (ZAVODNIK *et al*, 2002 ; ABTTISTELLI *et al*, 2005).

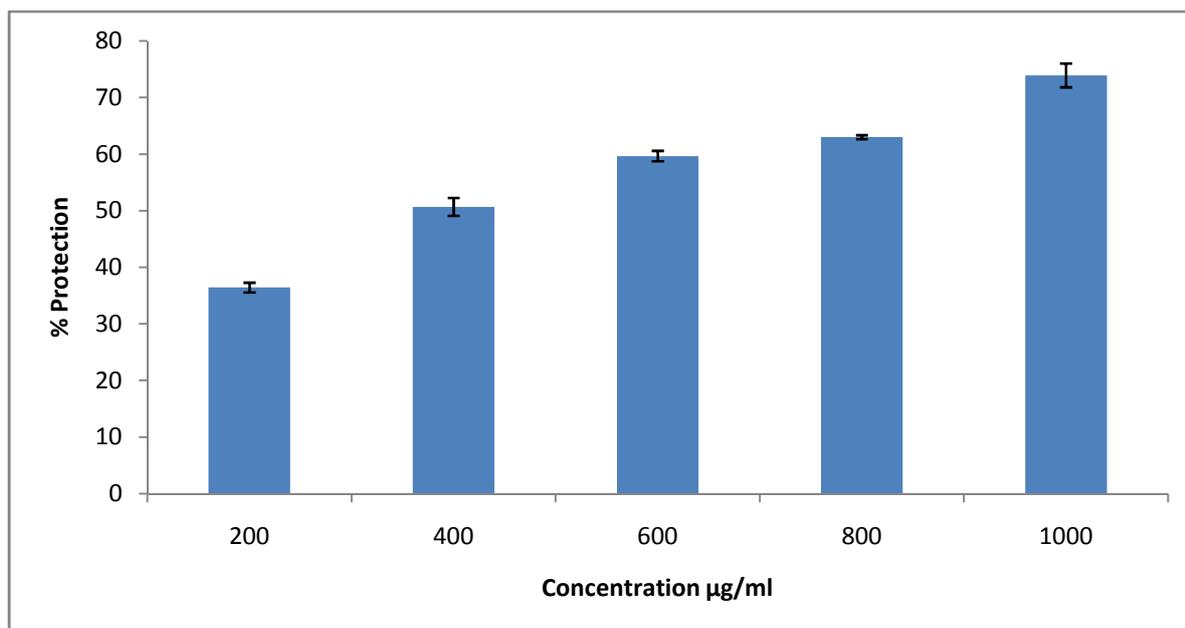


Figure 26 : Pourcentage de protection des hématies vis-à-vis d'un oxydant.

3-9-5-Inhibition de la dénaturation thermique de la BSA

La dénaturation des protéines est une conséquence bien connue et établie de l'inflammation (ANSARI *et al*, 2015).

La figure 27, présente les résultats du test d'inhibition de la dénaturation de la BSA. Les deux substances utilisées (aspirine et extrait) montrent une capacité à inhiber la dénaturation de la BSA dose dépendante. Avec un pourcentage de protection de $74.28 \pm 0.86\%$ à $500 \mu\text{g/ml}$, l'extrait présente une protection moins importante comparativement à l'aspirine ($92.23 \pm 0.32\%$ à $500 \mu\text{g/ml}$). Comparé à la capacité à inhiber la dénaturation thermique de la BSA par l'extrait aqueux de *Morinda umbellata* ($44.8 \pm 0.16\%$), l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo* reste plus efficace (DHARSANA et MATHEW, 2014).

L'extrait pourrait inhiber la dénaturation des protéines en interagissant avec les acides aminés exposés lors du chauffage (CHIRISA, 2016).

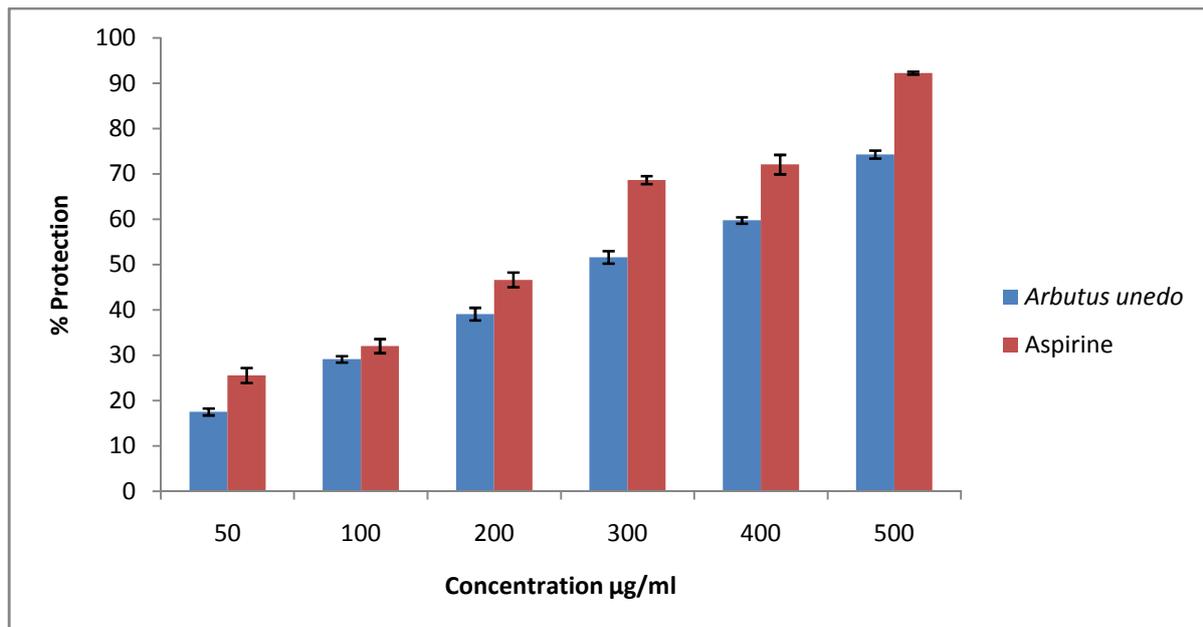


Figure 27 : Pourcentage de protection de la BSA vis-à-vis d'une dénaturation thermique.

3-9-6-Activité thrombolytique

Les données recueillies pour l'effet anti-thrombose de l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo* sont consignées en figure 28. Pour toutes les concentrations d'extrait utilisées (200 à 1200 µg/ml) nous relevons un effet thrombolytique allant de 15.09% à un maximum de 23.42%. Ces résultats restent très faibles comparativement à la streptokinase ($68.582 \pm 1.77\%$) contrôle positif utilisé dans la plupart des études (JAINUL *et al*, 2013).

Les anti-thrombiques utilisés en thérapeutique induisent de nombreux effets secondaires. Par exemple, l'héparino-thérapie induit le saignement, l'ostéoporose et la thrombopénie (CAMBOULIVES et PAUT, 2001). De plus les médicaments à visé thrombolytique induisent la dégradation de la fibrine (ANTICOGULANT et AGENT, 2014). Contrairement à ces molécules et en raison de l'absence d'effets secondaires, les extraits végétaux restent préférables comme c'est le cas de l'extrait de fruits d'*Ananas comosus* (riche en enzymes fibrinolytiques).

EMRAN *et al* (2015), indique que les extrait de plantes exercent leurs effets thrombolytiques ou fibrinolytiques en raison de leur teneur en certaines protéases fibrinolytiques.

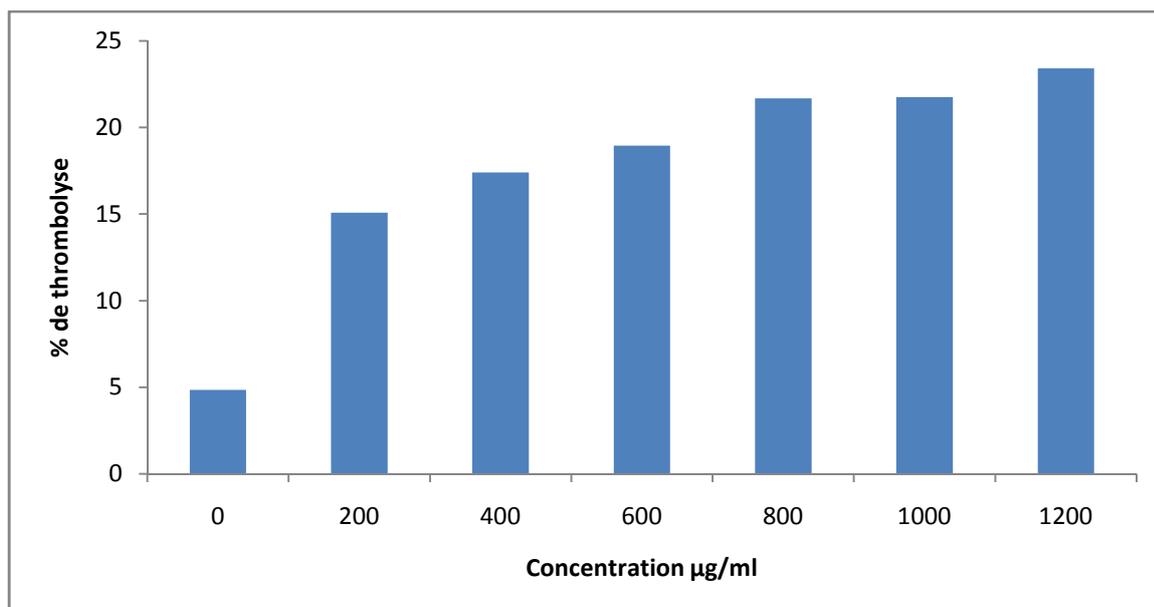


Figure 28 : Pourcentage de thrombolyse induit par l'extrait.

3-9-7-Inhibition de la peroxydation des membranes érythrocytaires

Les lipides membranaires sont particulièrement vulnérables au stress oxydant du fait de leurs multiples doubles liaisons (SPITELLER, 2006).

L'évaluation de la peroxydation lipidique dans les membranes érythrocytaires est réalisée par la détection du malondialdéhyde, marqueur de l'agression radicalaire. Le malondialdéhyde est communément mesuré grâce à sa réaction avec l'acide thiobarbiturique pour produire des substances réactives de l'acide thiobarbiturique, de couleur rose (DEEPA *et al*, 2008 ; LAMPRECHT *et al*, 2009).

Les pourcentages de protection de l'extrait et du standard (BHT) vis-à-vis de la peroxydation des lipides de la membrane érythrocytaire aux concentrations allant de 200 à 1000 µg/ml sont consignés en figure 29. Ces résultats en plus de marquer une évolution dose dépendante, montrent un effet protecteur maximal relativement plus important de l'extrait ($57,77 \pm 3.16\%$) comparativement au standard (BHT) ($41.94 \pm 2.09\%$). Des résultats similaires sont rapportés par HOSSEINZADEH *et al* (2012) pour *Pistacia vera* avec un maximum de protection à 51% atteint à la concentration de 1mg/ml.

L'oxydation des lipides membranaires génère des composés cytotoxiques impliqués dans l'étiologie du vieillissement, du cancer (WARIS et AHSAN, 2006) et le développement des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et les accidents vasculaires cérébraux (MICHEL *et al*, 2008). Considéré comme ayant une implication directe dans l'initiation des

cancers, le MDA (Malondialdéhyde) est le plus mutagène des produits de la peroxydation lipidique (NIEDERNHOFER *et al*, 2003).

L'attaque des phospholipides membranaires induit des changements structuraux dans les membranes biologiques (AL-MUTAIRI *et al*, 2007) et modifie leur fluidité ce qui a pour incidence la perturbation du fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (MARTINEZ, 1995). De plus elle affecterait l'activité des enzymes présents en particulier au niveau des radeaux lipidiques (MARTIN *et al*, 2010).

Au niveau érythrocytaire LEE. S et LEE. B (1997) rapportent une corrélation entre la concentration en MDA, la peroxydation lipidique et l'hémolyse des globules rouges aboutissant à une diminution de l'oxygénation tissulaire. Cette peroxydation compromet la déformabilité du globule rouge, ce qui peut conduire à la perturbation de la diffusion de l'oxygène au niveau tissulaire (RODRIGUEZ *et al*, 2006).

Les polyphénols exercent leur effet protecteur vis-à-vis de la peroxydation érythrocytaire, par le piégeage des substances réactives de l'oxygène et la chélation des métaux de transition comme le fer et le cuivre.

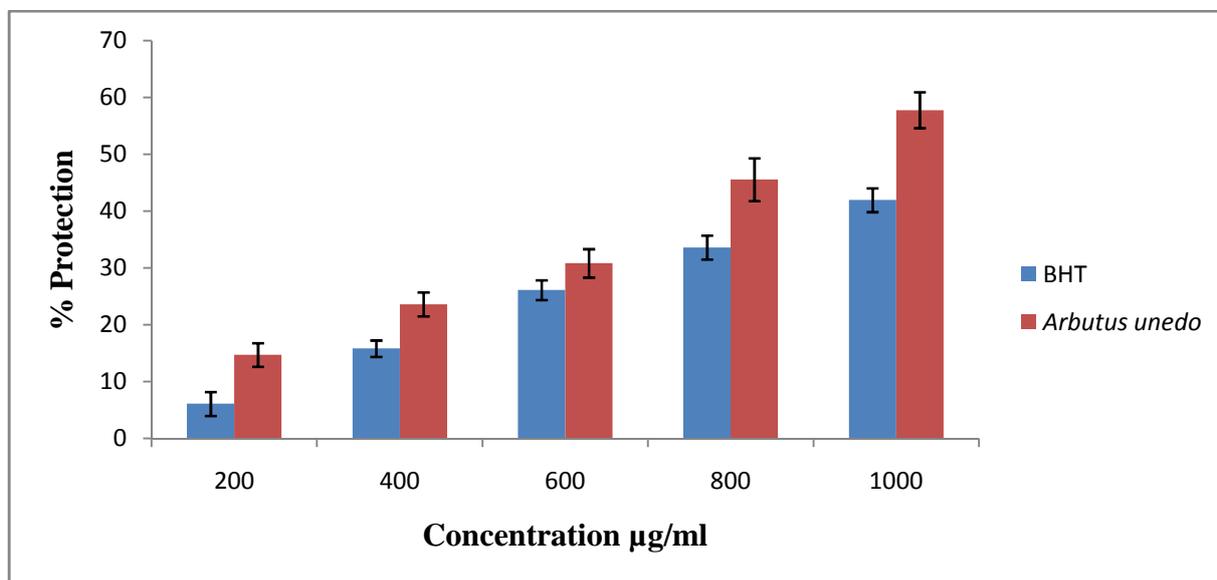


Figure 29 : Pourcentage de protection des membranes érythrocytaires vis-à-vis de la peroxydation.

3-10-Effet hypocholestérolémiant

3-10-1- Courbe étalon de l'acide cholique

Pour la quantification de la quantité d'acide cholique dialysé à travers la membrane de dialyse, lors de cette étude, nous avons construit une courbe d'étalonnage de l'acide cholique ($y = 0,101x + 0,037$, $R^2 = 0,997$) présentée en figure 30.

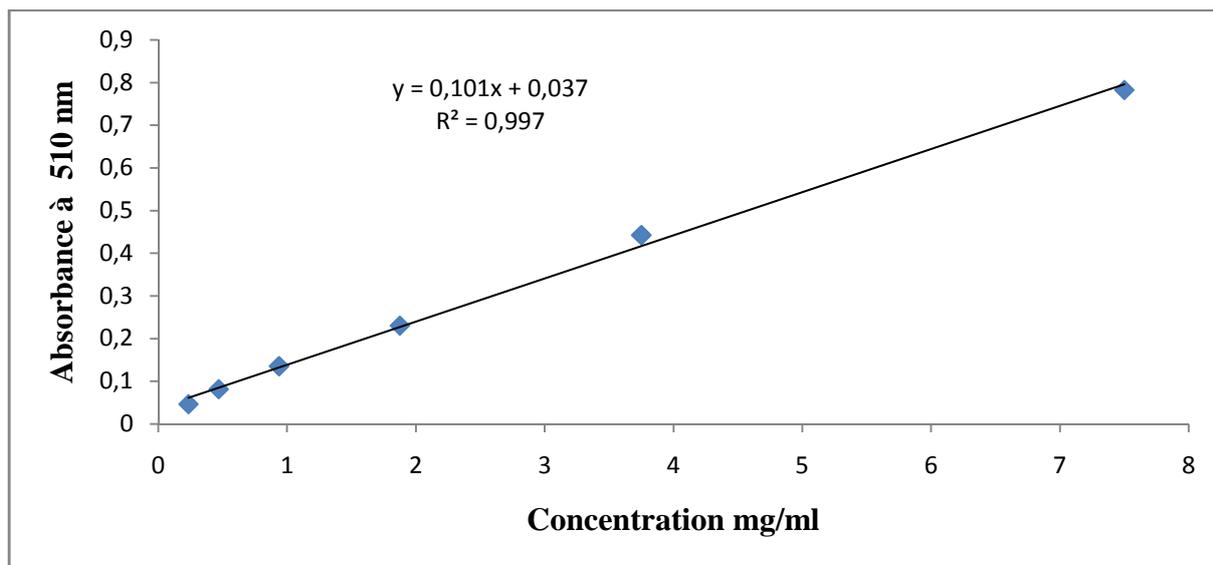


Figure 30 : Courbe étalon de l'acide cholique.

3-10-2-Inhibition de la diffusion de l'acide cholique

La figure 31, montre les résultats obtenus pour l'effet retardateur de la diffusion de l'acide cholique par l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo*. Par rapport au temps de diffusion, les courbes enregistrées, décrivent une même cinétique avec un effet dès la première heure où nous avons enregistré des taux de retard de diffusion variant entre $20 \pm 0,24$ et $43,15 \pm 0,17\%$. De plus, ces résultats indiquent clairement un effet dose dépendant, avec une forte inhibition de la diffusion de l'acide cholique. Cet effet retardateur important est plus marqué pour la concentration de $1000 \mu\text{g/ml}$ à tous les intervalles de temps avec un taux maximum de $59,7 \pm 0,8\%$, enregistré après 7 heures d'incubation. Néanmoins, les résultats obtenus dans notre étude restent relativement supérieurs, comparativement aux travaux de LEE. S et LEE. B (1996) qui enregistrent un taux maximum de $33,5\%$ pour *laminaria japonica* ainsi qu'aux travaux de IM et YOON (2015) qui eux, enregistrent pour *Fagopyrum esculentum* des taux

après une et huit heures d'incubation qui sont respectivement compris entre 14.1 et 20% et 28.3 et 41.7%.

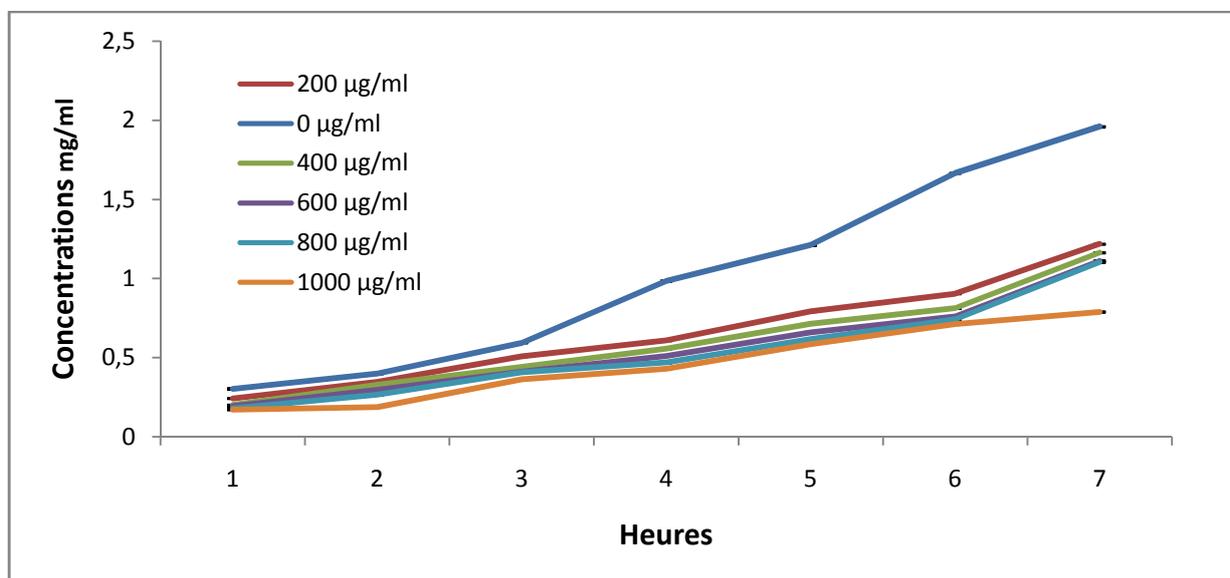


Figure 31 : Concentration en acide cholique diffusée.

3-10-3-Capacité d'adsorption de l'acide cholique

L'évaluation de l'activité hypocholestérolémiant de l'extrait aqueux d'arbousier consiste aussi en la mesure de la capacité de celui-ci à se complexer aux acides biliaries.

Les résultats obtenus pour l'activité chélatrice de l'extrait aqueux vis-à-vis de l'acide cholique sont présentés dans la figure 32. Celle-ci donne le pourcentage de complexation de l'acide cholique en fonction de la concentration d'extrait utilisé.

L'extrait a montré une activité séquestrante à différentes concentrations, avec un pourcentage de chélation maximal de $65,86 \pm 1,25$ à $1000 \mu\text{g/ml}$. Comparativement aux travaux réalisés par ADISAKWATTANA *et al* (2012) qui rapportent à la même concentration une activité séquestrante maximale de $75.5 \pm 2.3\%$ pour *Orthosiphon aristatus*, l'extrait dans notre étude présente un pourcentage de piégeage inférieur. Néanmoins, les mêmes auteurs rapportent pour *Carthamus tinctorius* à $1000 \mu\text{g/ml}$ un pourcentage ($42.7 \pm 3.6\%$) de chélation inférieur à celui enregistré pour l'arbousier. Des valeurs plus faibles que celles que nous avons obtenues ont été enregistrées par GOHIL et LELE (2014), qui rapportent pour *Nelumbo nucifera*, *Brassica oleracea*, *Murraya koenigii* et *Abelmoschus esculentus* des pourcentages

de chélation qui sont respectivement de 10.11 ± 0.20 , 8.24 ± 0.60 , 8.05 ± 0.18 et 8.34 ± 0.27 . TRUONG *et al* (2016) ont réalisés une étude sur l'effet chélateur de certains polyphénols comme le kaempferol, l'hésperidine, la curcumine, la quercétine et l'apigénine et enregistrent respectivement des taux de chélation de 12,4, 10,9, 9,4, 9,1 et 5,1%.

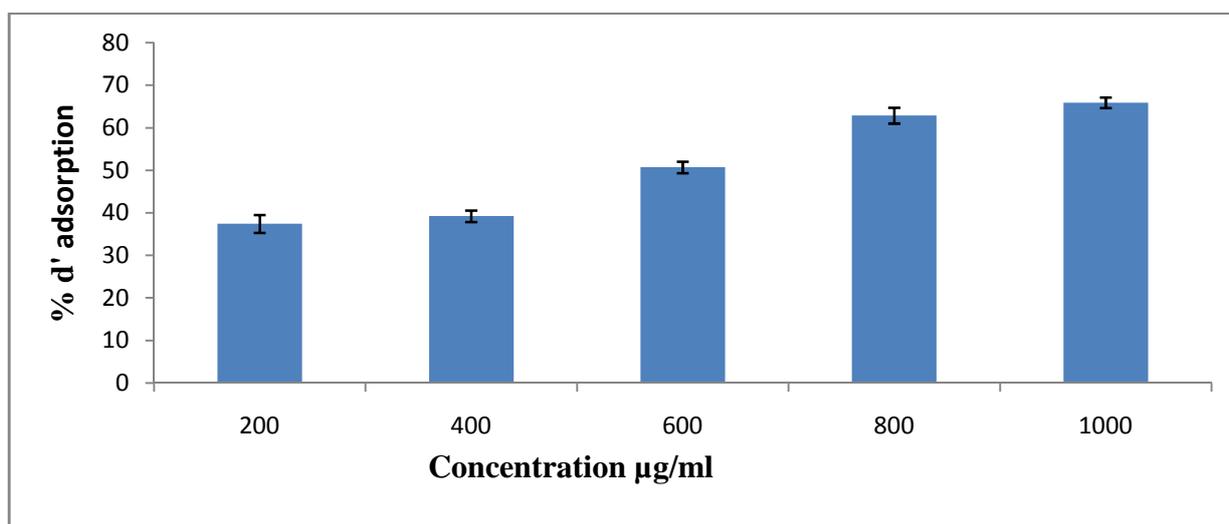


Figure 32 : Pourcentage d'adsorption de l'acide cholique.

L'adsorption de l'acide cholique est le résultat d'une interaction hydrophobe entre les fibres et ce dernier (YUANITA et SANJAYA, 2011). La fixation des acides biliaries et l'augmentation de leur excrétion fécale ont été supposées comme un mécanisme possible pour abaisser les taux de cholestérol plasmatique. Cela est dû au fait que cette fixation perturbe la circulation entérohépatique des acides biliaries en les séquestrant et en empêchant leur réabsorption dans l'intestin; ce qui réduit par conséquent la réserve des acides biliaries. Ceci conduit à une plus grande quantité de cholestérol converti en acides biliaries pour maintenir un niveau stable de cholestérol menant ainsi à une diminution du taux plasmatique de celui-ci (BISHT, 2012).

Fait intéressant, il a été rapporté que le niveau élevé d'acide biliaire est associé à un risque accru de développer un cancer colorectal (PETERLIK, 2008), par conséquent, une diminution de la concentration d'acide biliaire par ces composés polyphénoliques pourrait réduire ce facteur de risque.

3-10-4- Courbe étalon du cholestérol

L'évaluation et le suivi des quantités de cholestérol diffusant au travers des membranes de dialyse mises en œuvre dans cette étude, passe par la construction d'une courbe d'étalonnage du cholestérol. Celle-ci est représenté en figure 33.

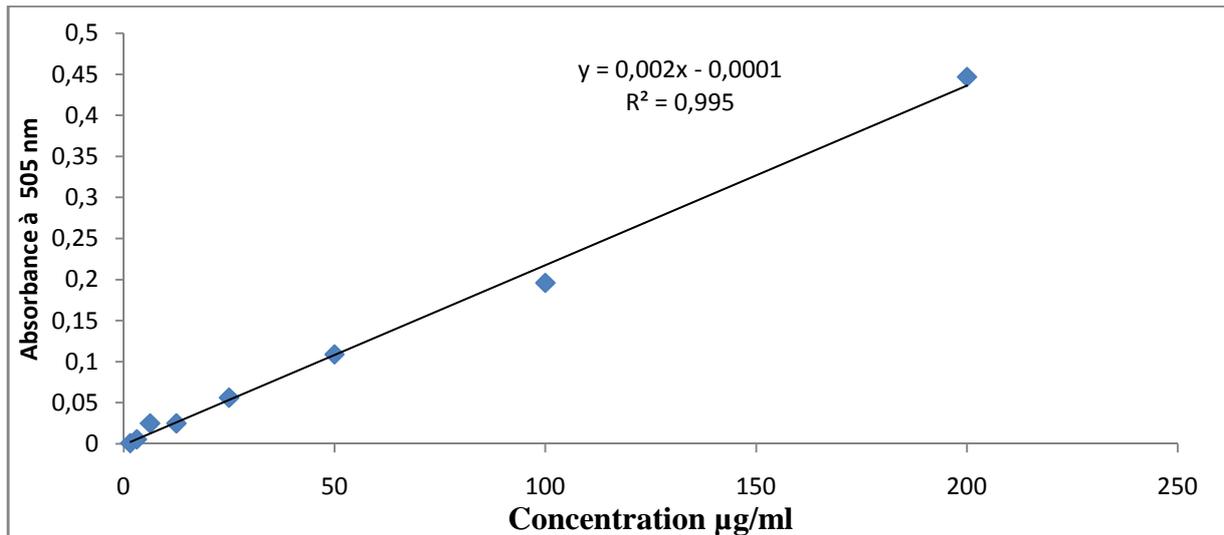


Figure 33 : Courbe étalon du cholestérol.

3-10-5-Inhibition de la diffusion du cholestérol

Les courbes illustrées en figure 34, représentent l'effet retard exercé par l'extrait aqueux étudié vis-à-vis du cholestérol. Les résultats obtenus indiquent un effet retard relativement important de l'extrait comparativement au référent non traité. Après une heure de diffusion nous enregistrons un indice de retardement variant entre 19.17 et 31.5% et entre 28.83 et 50.3% après 7 heures de diffusion. Nos résultats restent proches de ceux de DAOU *et al* (2014) qui rapportent pour *Oryza sativa* après une heure d'incubation, un retardement de 29.9% pour la fraction soluble comme dans notre étude contre 7.55% pour la fraction insoluble. De plus, nos résultats sont confortés par ceux de YOO *et al* (2005), qui rapportent que le chitosan à 6mg présente un indice de retardement de la diffusion du cholestérol de 35.1% à une heure de dialyse. Néanmoins, après huit heures de dialyse ce taux tombe à 15% et reste très inférieur au taux de 37.87% que nous avons enregistré à 7 heures de dialyse pour la concentration de 1mg/ml.

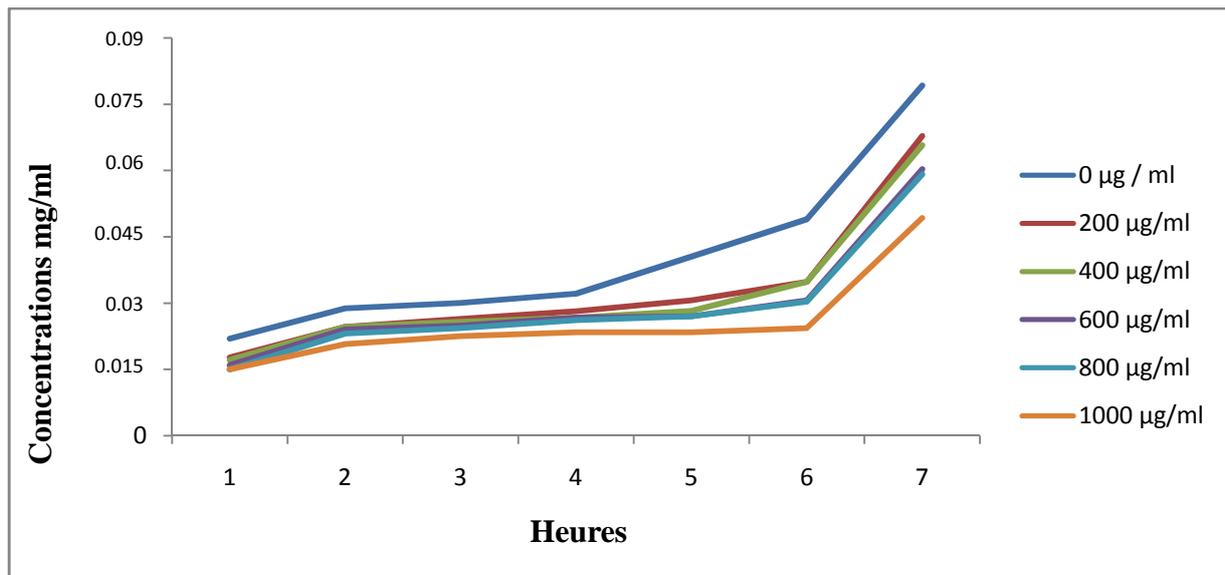


Figure 34 : Concentration en cholestérol diffusée.

3-10-6-Capacité d'adsorption du cholestérol

L'étude de l'activité hypocholestérolémiant de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* est aussi évaluée par l'étude du potentiel de chélation du cholestérol par l'extrait. La figure 36, indique l'existence d'une proportionnalité entre les concentrations croissantes d'extrait mises en œuvre et les quantités de cholestérol chélaté.

Les résultats obtenus, présentés en figure 35, montrent une activité séquestrante à différentes concentrations (200 à 1000 µg/ml), celle-ci est comprise entre 15.24 ± 3.13 et $55.03 \pm 2.05\%$.

Des travaux réalisés par LOPEZ-MARCOS *et al* (2015), sur diverses fibres alimentaires ont enregistré pour *Punica granatum* une activité chélatrice maximale avec un taux de 70% alors que pour les autres fibres comme pour *Citrus* × limon ce taux varie entre 23 et 29%.

Selon DAOU et ZHANG (2014), les fibres alimentaires solubles abaissent la concentration du cholestérol plus que les insolubles. La réduction dans le cas de *Oryza sativa* était de 29,9% pour la fraction soluble contre 7,55% pour la fraction insoluble.

Ainsi, les fibres alimentaires pourraient piéger, déstabiliser et désintégrer l'émulsion lipidique en formant des complexes avec les micelles formant ainsi une barrière à la diffusion de ces dernières, réduisant la diffusion et l'absorption des lipides et du cholestérol dans l'intestin grêle (DAOU et ZHANG, 2014).

Le mécanisme hypocholestérolémiant principal décrit dans la littérature est l'augmentation de la viscosité du milieu, résultant de la consommation des fibres alimentaires qui conduit à une réduction de la diffusion du cholestérol ainsi que des sels biliaries qui ne peuvent plus être réabsorbés par le corps et sont ainsi excrétés (ANTTILA *et al*, 2004).

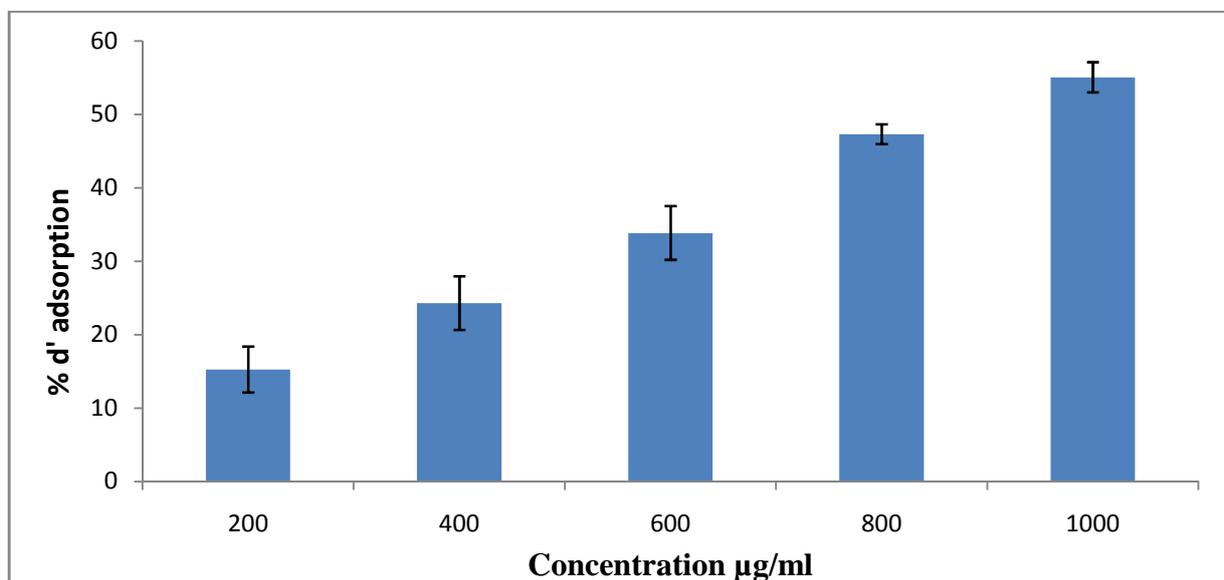


Figure 35 : Pourcentage d'adsorption du cholestérol.

Selon les travaux de IKEDA *et al* (2003) portant sur la solubilité *in vitro* du cholestérol, l'addition de catéchine en réduit considérablement la solubilité et induit une forte précipitation de celui-ci. YANG et KOO (1999) ont observés que l'alimentation des rats avec les catéchines du thé vert augmentait l'excrétion fécale du cholestérol. Cette observation suggère que les catéchines réduisent la concentration plasmatique de cholestérol en inhibant l'absorption de celui-ci. Le mode d'association entre les catéchines et le cholestérol n'est pas élucidé.

(KAJIYA *et al*, 2001) ont montré l'existence d'un domaine hydrophobe dans les catéchines, avec une affinité élevée pour les domaines lipidiques hydrophobes. Il est à supposer que les catéchines peuvent établir des liaisons hydrophobes au cholestérol, qui est également une molécule hydrophobe (IKEDA *et al*, 2003).

3-11-Effet hypoglycémiant

3-11-1-Courbe étalon du glucose

L'expression des résultats en termes de concentration en glucose au niveau des différentes expérimentations mises en œuvre dans notre étude nécessite le recours à une courbe d'étalonnage du glucose. Celle-ci est présentée en figure 36.

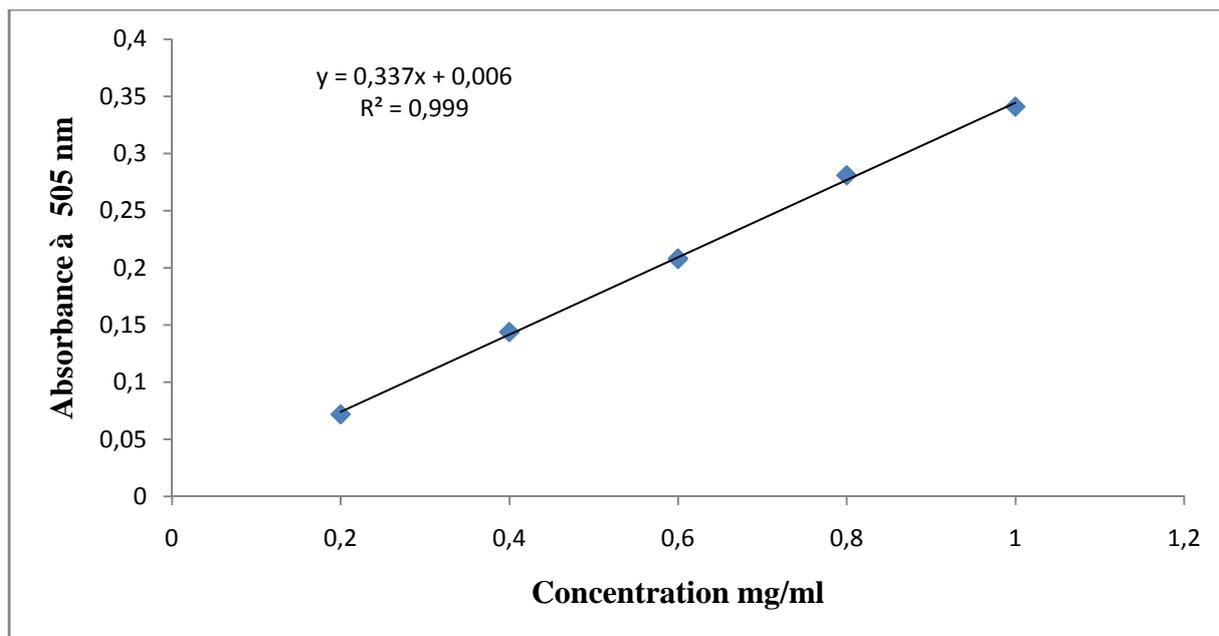


Figure 36 : Courbe étalon du glucose.

3-11-2-Inhibition de la diffusion du glucose

L'effet de l'échantillon étudié sur la diffusion du glucose est présenté dans la figure 37.

Dans la présente étude, la diffusion du glucose à travers la membrane de dialyse a été suivie par intervalle de temps d'une heure pendant sept heures.

Nous remarquons sur la figure 37 que l'effet inhibiteur de l'extrait dépend de la dose. Par rapport au témoin, toutes les concentrations de l'échantillon ont un effet retard sur la diffusion du glucose dans la solution externe à travers la membrane de dialyse.

Après une heure de dialyse, l'extrait aqueux de feuilles *d'Arbutus unedo* pour des concentrations comprises entre 1 et 6 mg/ml, présente un important effet retardateur compris entre 69.86 et 84.47%. Néanmoins, ce dernier se dégrade au cours du temps pour atteindre après 7 heures de dialyse un taux compris entre 46.83 et 77%.

Ces résultats montrent clairement l'effet retard important exercé par l'extrait étudié, comparativement aux résultats rapportés dans la littérature. Ainsi GOHIL et LELE (2014) ont enregistré des valeurs de retardement maximales pour *Abelmoschus esculentus* de $23.82 \pm 0.92\%$, *Nelumbo nucifera* de $53.46 \pm 0.38\%$, *Brassica oleracea* de $42.13 \pm 0.64\%$ et *Murraya koenigii* de $33.01 \pm 0.77\%$. De plus, la baisse du taux de retardement est rapportée par HARISH *et al* (2014) qui enregistrent pour l'extrait aqueux des feuilles de *Butea monosperma* un taux de 34.7% après 30 minutes et augmente à 38.1% après 60 minutes mais baisse à 10.8% après 3 heures.

Selon LOPEZ *et al* (1996), l'effet retard de la diffusion du glucose exercé par les fibres insolubles est nettement plus important comparativement aux fibres solubles. Cette différence peut s'expliquer d'une part par le fait que les fibres insolubles augmentent d'une façon plus importante la viscosité du milieu, d'autre part, un facteur primordial est responsable de cette démarcation entre les fibres solubles et insolubles dans le retardement de la diffusion du glucose, celui-ci étant la constitution d'une barrière physique réalisée par les fibres insolubles qui constituent un frein à la diffusion des molécules de glucose, qui se retrouvent ainsi piégées dans le réseau formé par les fibres (LOPEZ *et al*, 1996 ; Ou *et al*, 2001).

La variation du taux de diffusion d'une fibre alimentaire à l'autre est fortement liée à la complexité de la microstructure des particules de fibres ainsi que leur grande surface facilitant le piégeage du glucose dans le réseau de fibres (PEERAJIT *et al*, 2012).

L'interaction des polyphénols avec les hydrates de carbone dépend fortement du PM des polyphénols (LE BOURVELLEC *et al*, 2012), de l'hydrophilie du polyphénol (CAI *et al*, 1989) ainsi que de la structure de l'hydrate de carbone (SOARES *et al*, 2012).

Ces mécanismes de réduction de la diffusion et d'adsorption du glucose exercé par les fibres, réduisent la concentration de glucose dans l'intestin grêle et pourraient contribuer à réduire le taux de glucose sérique post-prandial (SCHNEEMAN, 1998).

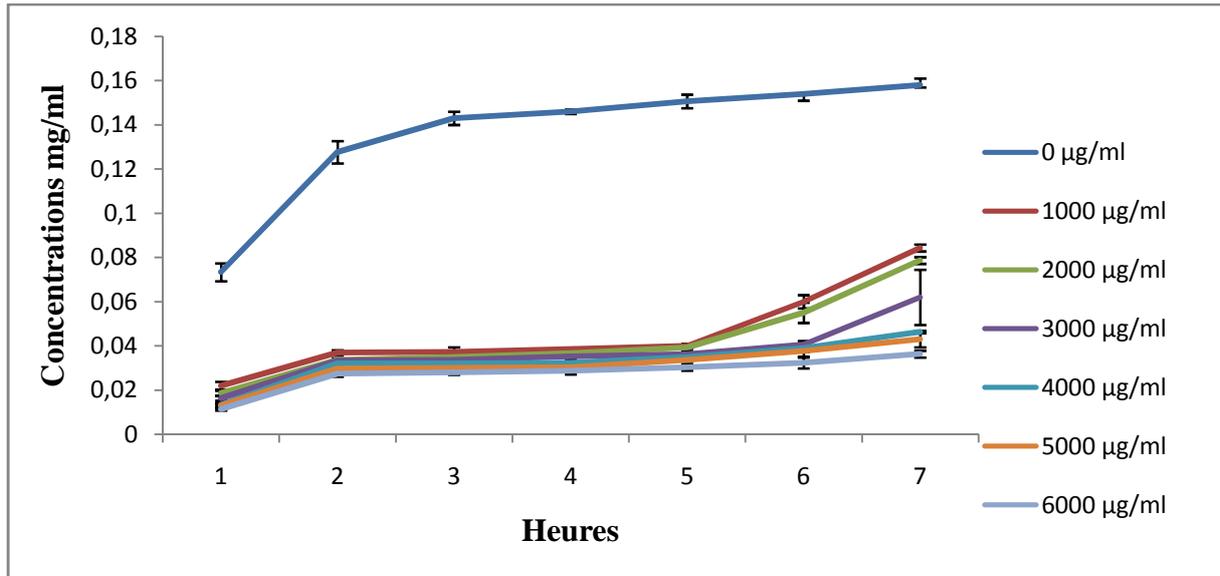


Figure 37 : Concentration en glucose diffusé.

3-11-3-Capacité d'adsorption du glucose

L'étude de l'activité hypoglycémiante de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* est évaluée par l'étude du pouvoir séquestrant de l'extrait sur le glucose. Nous remarquons une proportionnalité entre les quantités de glucose séquestré et les concentrations croissantes d'extrait mises en œuvre, comme l'indique la figure 38.

Les résultats obtenus, présentés dans cette même figure montrent une activité séquestrante à différentes concentrations comprises entre 1 et 6 mg/ml, soit un pourcentage de chélation compris entre 14.34 ± 0.92 et $38.26 \pm 0.7\%$.

Comparativement aux résultats de NADIAH *et al* (2016) qui ont obtenu à une concentration de 10mg/ml, pour les feuilles de trois variétés de thé (*Camellia sinensis*), noir, oolong et vert respectivement des taux de 37% 35.6 et 25.6%, l'extrait des feuilles d'arbousier reste plus efficace. Néanmoins, par rapport aux feuilles d'*Artocarpus altilis* qui expriment à la concentration de 1% un taux de chélation de 50%, l'extrait étudié présente une faible capacité chélatrice du glucose (SAIRAM et UROOJ, 2013).

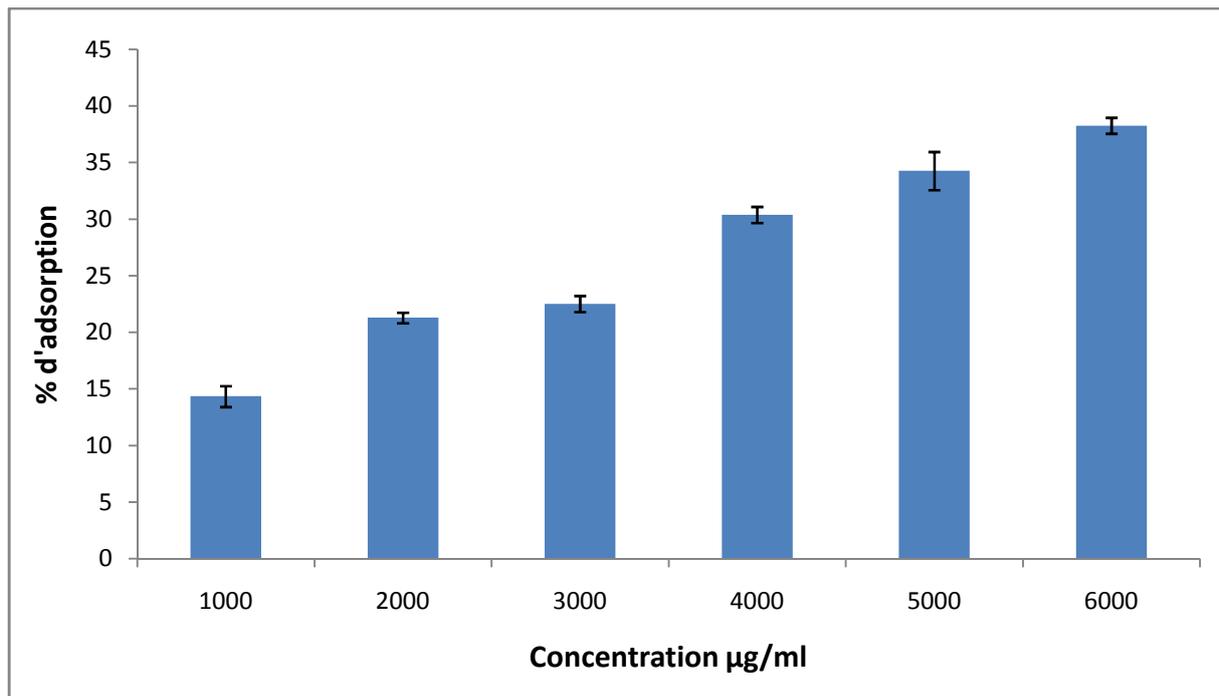


Figure 38 : Pourcentage d'adsorption du glucose.

3-11-4-Inhibition de la consommation du glucose par les levures

Le mécanisme de transport du glucose à travers la membrane de *Saccharomyces cerevisiae* est admis par la communauté scientifique comme méthode d'évaluation *in vitro* pour l'effet hypoglycémique de divers composés comme les plantes médicinales (HARISH *et al* (2014).

La consommation du glucose à travers la membrane dans ce système cellulaire est présentée en figure 39. La quantité de glucose restant dans le milieu après un intervalle de temps spécifique sert d'indicateur de l'absorption du glucose par les cellules de la levure.

Comparativement au témoin, l'extrait d'arbousier pour les concentrations utilisées et comprises entre 1 et 6 mg/ml, affiche une inhibition de la consommation de glucose par les levures allant de 6.35 ± 0.01 à $28.17 \pm 0.003\%$. Ces résultats restent néanmoins modestes comparés à ceux publiés par HARISH *et al* (2014) qui trouvent pour l'extrait aqueux de *Butea monosperma* respectivement aux concentrations de 1, 2, 3, 4 et 5 mg/ml des taux d'inhibition de la consommation en glucose par les levures de 72, 80, 88, 92 et 96%.

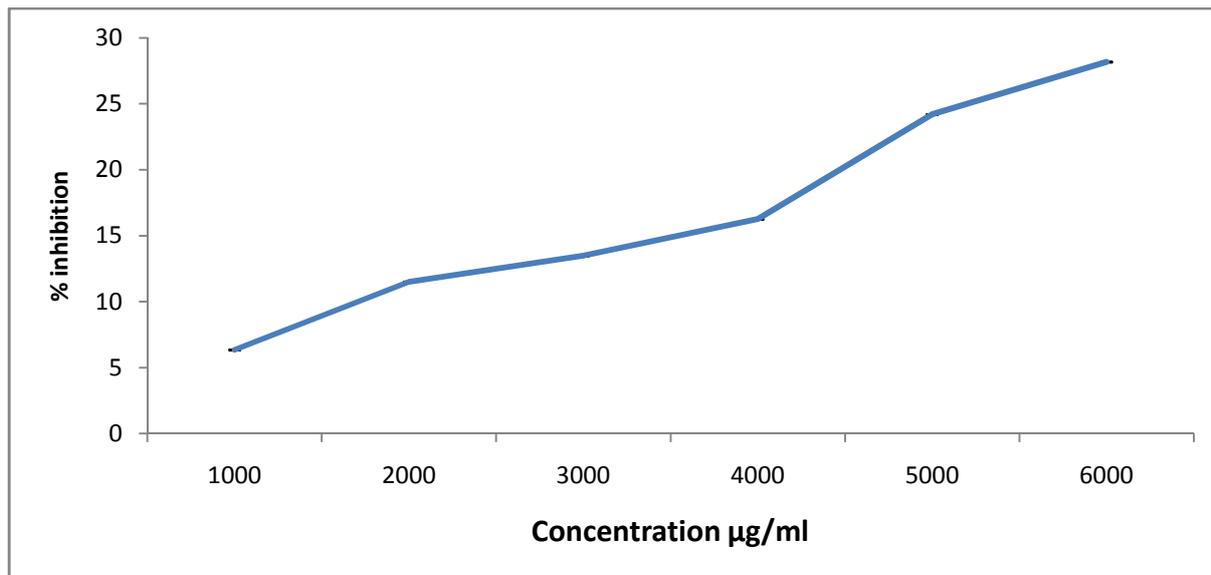


Figure 39 : Pourcentage d'inhibition de la consommation du glucose par *saccharomyces cerevisiae*.

Le pourcentage de retard de dialyse du glucose est prédictif de l'effet des extraits végétaux sur le retard dans l'absorption du glucose dans le tractus gastro-intestinal (LOPEZ *et al*, 1996). Les polyphénols affectent la diffusion du glucose d'une part en réduisant sa biodisponibilité par interaction directe, formant des complexes non digestibles via des liaisons hydrogènes ou des interactions hydrophobes (AMOAKO et AWIKA, 2016). Cela est pertinent car il peut fournir un mécanisme pratique pour réduire la charge calorique des aliments.

D'autre part, en modifiant la viscosité du milieu ce qui réduit l'accessibilité du glucose à l'épithélium de l'intestin grêle, réduisant ainsi le niveau de glucose postprandial. Ce phénomène réduit le taux de diffusion du glucose et peut avoir un avantage potentiel pour contrôler la glycémie postprandiale (SANGEETHAPRIYA et SIDDHURAJU, 2014).

L'attention particulière portée au modèle *in vitro* de transport du glucose à travers la membrane de *Saccharomyces cerevisiae*, est justifiée par le fait que cette levure partage une homologie très importante de ses transporteurs de glucose avec ceux des mammifères (GRIFFITH *et al*, 1992 ; BISSON *et al*, 1993) et plus particulièrement avec les récepteurs intestinaux humains (JOOST et THORENS, 2001).

Le cotransporteur de glucose dépendant de Na⁺ (SGLT1) (cotransporteur 1 glucose sodium dépendant) est exprimé dans le jéjunum et transporte le glucose dans les cellules épithéliales. Le glucose est ensuite transporté dans le sang via le transporteur de glucose facilité (GLUT). L'inhibition de l'absorption du glucose par SGLT1 dans l'intestin grêle peut prévenir

l'hyperglycémie. Il a été prouvé que les polyphénols exercent un effet inhibiteur sur le transporteur SGLT1 et donc auraient un potentiel hypoglycémiant (HOSSAIN *et al*, 2002).

D'autres études ont montré que les polyphénols en plus d'inhiber les transporteurs du glucose, influencent indirectement le métabolisme du glucose par l'inhibition des enzymes digestives (MATSUI *et al*, 2001 ; RIZVI et ZAID, 2001 ; RIZVI *et al*, 2005 ; SANGEETHAPRIYA et SIDDHURAJU, 2014).

3-11-5-Inhibition de la glycation de la BSA

La glycation est une réaction de condensation non enzymatique entre les sucres réducteurs et les groupes amines des protéines qui subissent des réarrangements en des cétoamines stables, conduisant à la formation de produits finaux de glycation avancées (AHMED, 2005). L'accumulation de produits finaux de glycation avancées s'est avérée être impliquée dans plusieurs maladies chroniques comprenant des complications diabétiques typiques, l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, la polyarthrite rhumatoïde et l'insuffisance cardiaque chronique. L'interaction de ces produits finaux de glycation avancées avec leurs récepteurs (RAGE) provoque le stress oxydatif et l'initiation de l'inflammation (VLASSARA et PALACE, 2002; SMIT *et al*, 2008).

L'albumine est l'une des principales protéines subissant des réactions de glycation en raison de son abondance dans le sérum et du fait qu'elle peut être glyquée sur de multiples sites (WAUTIER et GUILLAUSSEAU, 1998). Il existe un intérêt considérable pour les agents antiglycation en raison de leur potentiel thérapeutique dans la réduction de la mortalité associée au diabète. Par exemple, l'aspirine inhibe le processus de glycation en acétylant des groupes amines libres des protéines, donc il peut bloquer la fixation de sucres réducteurs avec des groupes aminés (CROMPTON *et al*, 1985 ; RAO *et al*, 1985).

Le concept de mécanisme inhibiteur est principalement concentré sur le blocage de la fixation du sucre aux protéines, atténuant la glycoxydation et le stress oxydatif par le piégeage de certains intermédiaires de glycation comprenant des ROS, des espèces réactives d'azote (RNS) et des dicarbonyles ainsi que la rupture des voies de production des AGE (REDDY et BEYAZ, 2006). FU *et al* (1994), ont révélé que la glycation peut être inhibée en présence de chélateurs métalliques, de composés sulfhydryles et d'antioxydants, car ils peuvent désaccoupler la glycation. Les résultats de cet auteur, suggèrent que la formation de complexes glyqués peut être inhibée même après l'initiation de la glycation.

La complexité de la réaction de Maillard est le principal obstacle à l'identification des mécanismes d'inhibition de la glycation par les produits naturels. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'inhibition de la glycation par des produits végétaux et des composés naturels, qui ciblent des stades essentiels de glycation ainsi que leur activité de piégeage de radicaux libres.

Ces mécanismes comprennent:

- Des actions hypoglycémiques de produits végétaux et de leurs composés (KUMAR *et al*, 2011).
- Inhibition de la formation de produits Amadori (CHOMPOO *et al*, 2011).
- Inhibition de la formation d'AGE et de ses précurseurs (GUGLIUCCI *et al*, 2009).
- Réduction de la réticulation (RUTTER *et al*, 2003).
- Activité de piégeage de radicaux et antioxydante (HARRIS *et al*, 2014).
- Piégeage de composés dicarbonyle par la catéchine et l'épicatéchine procyanidine (HARRIS *et al*, 2014).

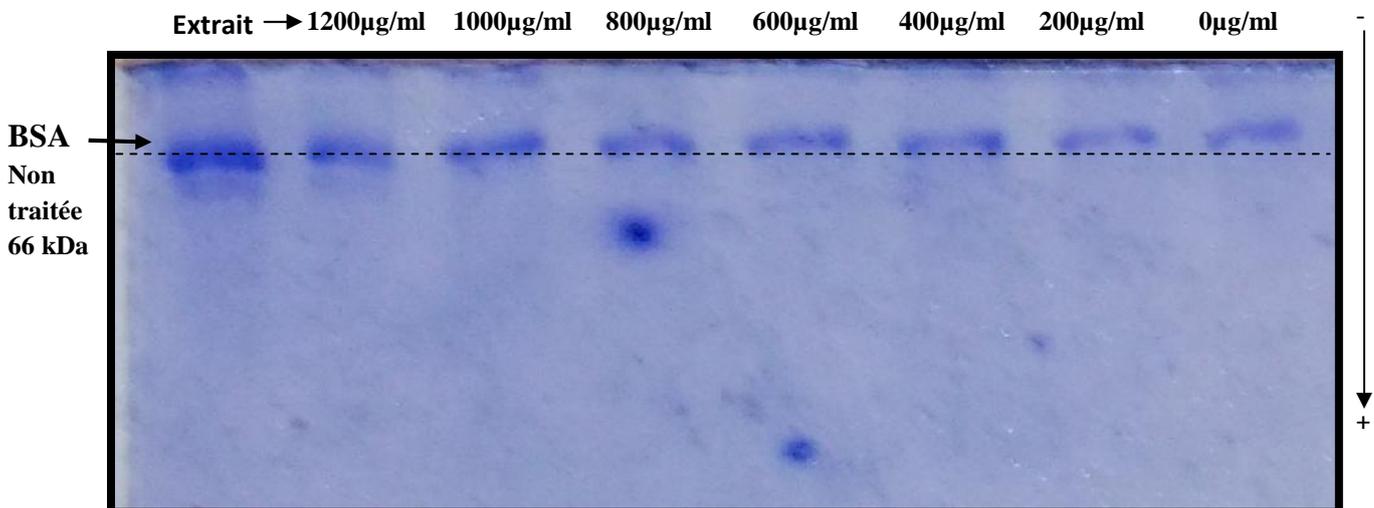


Figure 40 : Electrophorégramme de la BSA en PAGE-SDS

gel de concentration [(T=4% et C= 2.7%) , TRIS-HCl pH 6.8],

gel de séparation [(T=15% et C= 2.7%) , TRIS-HCl pH 8.8]).

L'électrophorégramme présenté en figure 40 indique que les concentrations en extrait de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 et 1.2 mg/ml utilisées, inhibent la glycation de la BSA respectivement aux taux de 59.1, 63.6, 68.2, 72.7, 77.3, 81.8 et 91%. Ces pourcentages sont déduits en comparant le niveau de migration de chaque bande obtenue aux concentrations d'extrait précédemment indiqués avec le témoin sans extrait.

Les extraits de gingembre, de cannelle et de cumin étudiés par SARASWAT *et al* (2008) ont réduit respectivement la glycation de la BSA de 63, 54 et 44%, à la concentration de 10mg/ml, alors qu'à la concentration de 1mg/ml, on a constaté que la réduction était respectivement de 45, 42 et 30%. Des résultats similaires sont rapportés dans les travaux de PERERA (2014) sur les extraits aqueux des feuilles de *Coccinia grandis*, *Gymnema lactiferum* et *Gymnema sylvestre* où l'effet inhibiteur de la glycation, à la concentration de 5mg/ml, ne dépassant pas les 50% pour chaque plante. Comparativement à ces données l'extrait de feuilles d'arbousier est plus efficace pour l'inhibition de la glycation de la BSA.

3-12- Effet de l'interaction plante-liquides biologiques sur la réduction du molybdène et du fer

Le pouvoir antioxydant de la combinaison de l'extrait avec la salive, le plasma sanguin, la BSA et l'urine à été évalué par la mesure de la capacité de réduction du molybdène et du fer.

Les résultats obtenus pour la réduction du molybdène sont indiqués en figures 41, 49, 53, 45. Celles-ci montrent les quantités de salive, de plasma sanguin, d'urine et BSA qui sont respectivement de 50 μ l, 25 μ l, 25 μ l et 500 μ g, ayant montré la capacité réductrice la plus importante. Ces dernières, ont exprimé respectivement une capacité réductrice de $55.12 \pm 0.53\%$, 70.33 ± 0.6 , $97.05 \pm 0.35\%$ et $16.38 \pm 0.74\%$.

Pour ce qui est de la réduction du fer, les quantités de salive, de plasma sanguin, d'urine et de BSA, respectivement de 400 μ l, 400 μ l, 20 μ l et 500 μ g, comme indiqué en figure 42, 50, 54, 46, expriment le pouvoir réducteur le plus important. Ce dernier, est de l'ordre de $28.31 \pm 0.79\%$ pour la salive, $78.12 \pm 0.62\%$ pour le plasma sanguin, $98.81 \pm 0.82\%$ pour l'urine et $2.66 \pm 0.095\%$ pour la BSA.

Par la suite, l'effet de chaque composé biologique, sur la réduction du molybdène et du fer de l'extrait est réalisé par la combinaison d'une quantité optimale préalablement déterminée du composé biologique et de différentes concentrations d'extrait. Ainsi, comme indiqué en figure 43, 47, 51, 55, nous observons que cette combinaison donne au mélange une activité réductrice du molybdène plus importante que celle enregistrée avec chaque composé pris

isolément. Toutes les combinaisons décrivent une synergie aboutissant à une activité supérieure à celle de l'extrait et du standard, sauf pour la BSA qui affiche une activité maximale inférieure à celle du standard.

Les figures 44, 48, 52 et 56, montrent clairement que cette combinaison donne au mélange un pouvoir réducteur du fer plus important que celle enregistrée individuellement avec chaque composé. Ces résultats indiquent que l'ensemble des combinaisons décrivent l'existence d'une synergie donnant lieu à une activité plus importante que celle enregistrée pour l'extrait. Néanmoins comparativement au standard, toutes les combinaisons affichent une activité maximale inférieure.

3-12- 1-Combinaison plante-salive

Dans le cas de la salive, la combinaison avec l'extrait aboutit à une activité réductrice du molybdène maximale de 97.5%, soit une augmentation de 42.38% par rapport au témoin (salive seule), 17.57% par rapport au standard et 64.07% par rapport à l'extrait.

Pour l'effet réducteur du fer, cette combinaison donne une activité réductrice maximale de $45.37 \pm 0.58\%$ soit une augmentation de 17.06% par rapport au témoin et 2.15% par rapport à l'extrait. Toutefois, cette combinaison reste inférieure comparativement au standard à hauteur de 43.79%.

Les protéines salivaires servent de mécanisme de criblage qui permet l'absorption des flavonoïdes et l'exploitation de leurs effets bénéfiques, mais neutralisent les effets moins souhaitables des tanins. Il est généralement admis que les tanins sont synthétisés par les plantes pour agir comme des facteurs de dissuasion pour les animaux en raison de leurs propriétés amères et astringentes.

Ceux-ci peuvent interférer avec la croissance et la santé du bétail et pourraient être potentiellement nuisibles à l'Homme (BENNICK, 2002). La grande affinité des polyphénols aux surfaces buccales contribue à maintenir leur libération lente et contribue ainsi à créer un état redox plus élevé qui pourrait aider à mieux faire face aux stress oxydatifs.

La capacité des antioxydants salivaires à agir en synergie avec les antioxydants naturels tels que les polyphénols, influe sur le maintien d'un potentiel antioxydant élevé dans la cavité buccale et confère ainsi à celle-ci une résistance accrue aux infections (GINSBURG *et al* 2012). La variation de cette capacité est attribuée à plusieurs facteurs et renseigne soit sur l'apport exogène d'antioxydant ou le degré d'épuisement de ces derniers. Ainsi de faibles

valeurs de réduction du molybdène sont enregistrées chez les patients atteints de parodontite et sont corrélées négativement à la sévérité de l'atteinte (GUENTSCH *et al*, 2008). De plus, ces valeurs faibles peuvent s'expliquer par le fait que la réponse immunitaire contre les germes parodontopathogènes est associée à une production accrue de ROS par des neutrophiles et des macrophages. Pour éviter la destruction des tissus de l'hôte, ces ROS sont neutralisés par des antioxydants, ce qui pourrait entraîner une diminution du pouvoir réducteur du molybdène et du fer (CHAPPLE et MATTHEWS, 2007).

L'augmentation du potentiel réducteur salivaire peut être attribuée à l'alimentation. La somme des antioxydants endogènes et dérivés des aliments représente l'activité antioxydante totale du système. L'acide urique est le principal antioxydant présent dans la salive humaine, ce qui représente plus de 85% du pouvoir réducteur de la salive et provient principalement du régime alimentaire. (MOORE *et al*, 1994). D'autre part, cette augmentation s'explique par le fait que les niveaux d'antioxydants pourraient être modifiés en réponse à une infection ou à une maladie.

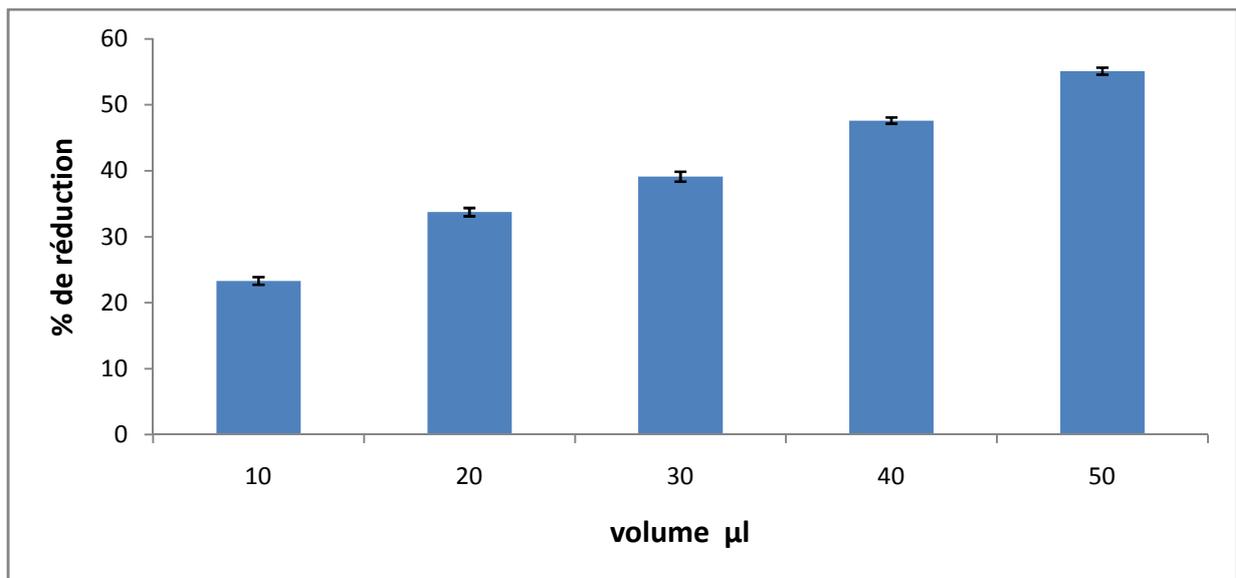


Figure 41 : Pourcentage de réduction du molybdène en fonction du volume de salive.

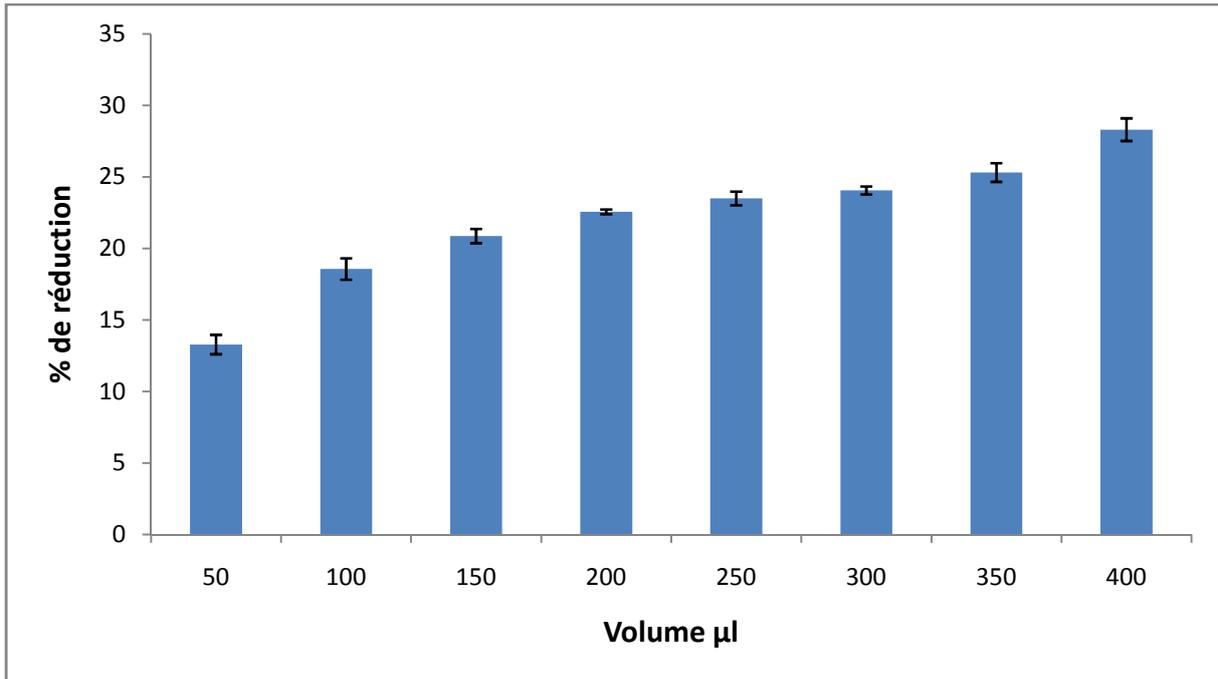


Figure 42 : Pourcentage de réduction du fer en fonction du volume de salive.

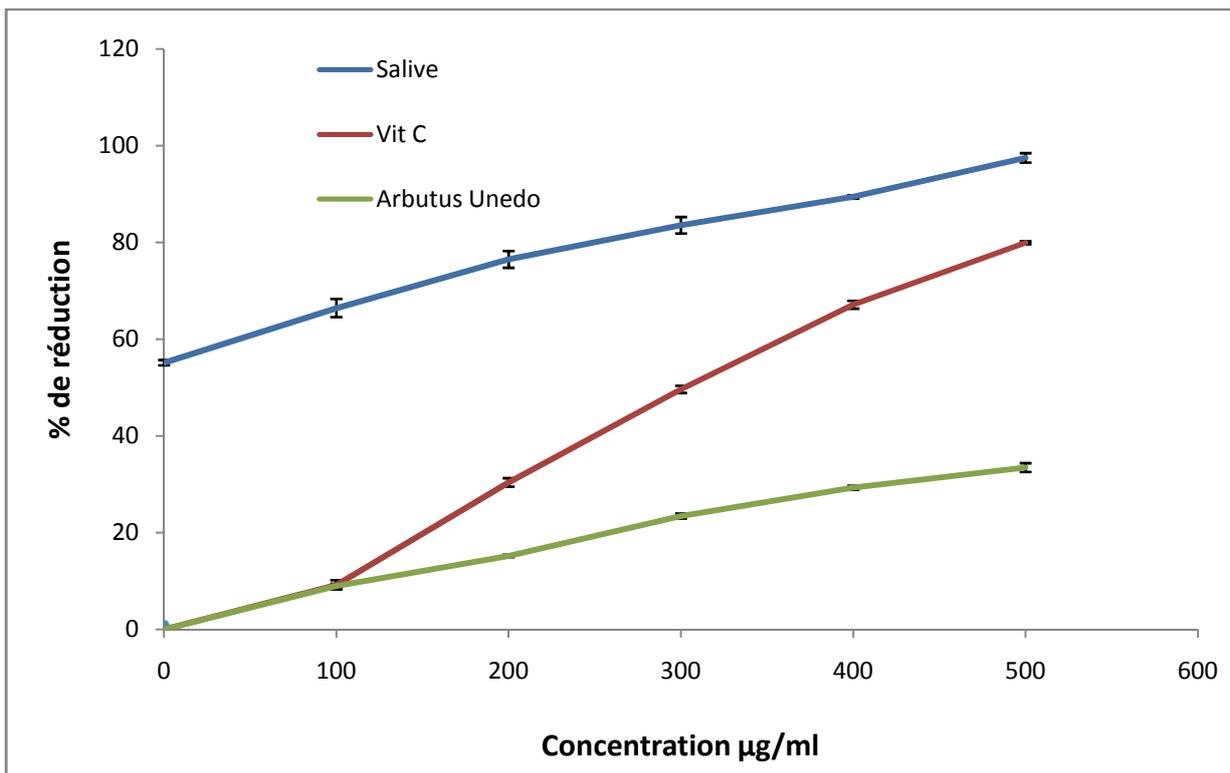


Figure 43 : Pourcentage de réduction du molybdène par la combinaison salive-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.

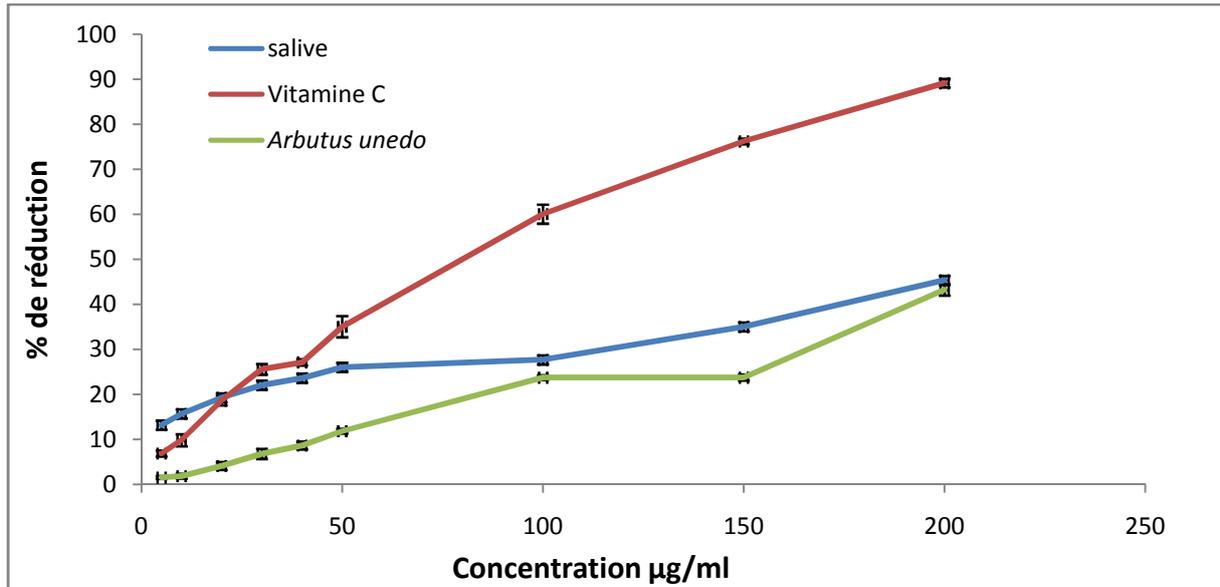


Figure 44 : Pourcentage de réduction du fer par la combinaison salive-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.

3-12- 2-Combinaison plante-BSA

Pour la sérum albumine bovine, la combinaison avec l'extrait aboutit à une activité réductrice du molybdène maximale de $62.61 \pm 0.93\%$, soit une augmentation de 46.23% par rapport au témoin (500µg BSA sans l'extrait) et 21.46% par rapport à l'extrait, alors que par rapport au standard la combinaison de l'extrait et de la BSA reste inférieur de 35.85%.

Cette protéine combinée avec l'extrait donne un pouvoir réducteur du fer maximal de $64.68 \pm 0.48\%$ soit une augmentation de 62.02% par rapport au témoin, 21.5% par rapport à l'extrait mais reste inférieur de 24.07% par rapport au standard.

Protéine majeure, la sérum albumine humaine est responsable du maintien de 80% de la pression osmotique du sang (CARTER et HO, 1994). Elle joue également un pouvoir tampon, notamment lors de l'accumulation du gaz carbonique (FIGGE *et al*, 1991). Elle est bien connue pour sa capacité à lier les molécules, comme les ions métalliques, les acides gras, les médicaments et aussi les hormones. De plus, l'albumine joue un rôle important dans le transport d'une très grande variété de substances, dont certaines à l'état libre peuvent être toxiques contribuant ainsi à la détoxification de l'organisme (OLSEN *et al*, 2004). *In vivo*, il existe une compétition entre différentes métabolites pour le même site de l'albumine (GHUMAN *et al*, 2005). La liaison de l'albumine sérique aux substances exogènes comme les médicaments en contrôle la concentration active et agit comme un réservoir qui allonge

leur durée d'action (GHUMAN *et al*, 2005). Elle en augmente aussi l'activité antioxydante car les émulsions contenant de la BSA augmentent la solubilité du soluté.

Dans le cas des polyphénols ALMAJANO *et al* (2007) observent dans leurs travaux que l'activité antioxydante de l'extrait de thé vert a nettement augmenté avec la concentration en présence de BSA. Par contre ROHN *et al* (2004) rapportent que les liaisons covalentes entre la BSA et les polyphénols induisent une diminution du potentiel antioxydant de ces derniers. Ils concluent que l'effet «masquage» de l'activité antioxydante dépend à la fois de la protéine et du polyphénol utilisé.

De nombreuses activités antioxydantes de l'albumine résultent de sa capacité de liaison aux ligands. La HSA (Sérum albumine humaine) exerce des fonctions antioxydantes spécifiques en raison de ses multiples capacités de liaison aux ligands et des propriétés de piégeage des radicaux libres, toutes deux étroitement liées à leur structure (OETTL et STAUBER, 2007). Les dommages apportés à celle-ci et donc à ses propriétés antioxydantes ont été considérés comme "biologiquement insignifiants" en raison de la grande quantité de cette protéine dans le plasma (HALLIWELL, 1988). Néanmoins, les molécules d'albumine endommagées sont rapidement éliminées de la circulation et dégradées (HALLIWELL et GUTTERIDGE, 1990).

Cependant, les propriétés antioxydantes de l'albumine peuvent être altérées par de nombreuses modifications qui sont étroitement liées à diverses pathologies. Ces modifications pourraient se produire par exemple dans le cas du diabète sucré, qui est l'un des états pathologiques associés à l'apparition précoce de complications vasculaires, ainsi que des altérations fonctionnelles de l'albumine. Dans cette pathologie complexe, l'albumine subit une glycation accrue (COHEN, 2003). Ce phénomène correspond à la fixation non enzymatique d'une molécule de glucose à un résidu d'amine primaire libre. Le réarrangement d'Amadori de la protéine glyquée aboutit aux produits finis de glycation avancée (AGE) (COHEN *et al*, 2003).

Après avoir montré que la propriété antioxydante de l'albumine était modifiée après glycation *in vitro*, FAURE *et al* (2008), sont arrivés à démontrer cette altération *in vivo* chez les patients atteints de diabète. La glycation de la HSA en plus de réduire sa capacité de liaison au cuivre et au fer (SAKATA *et al*, 2002 ; VAN CAMPENHOUT *et al*, 2002), induit une perte marquée de l'activité antioxydante de cette protéine (BOURDON *et al*, 1999).

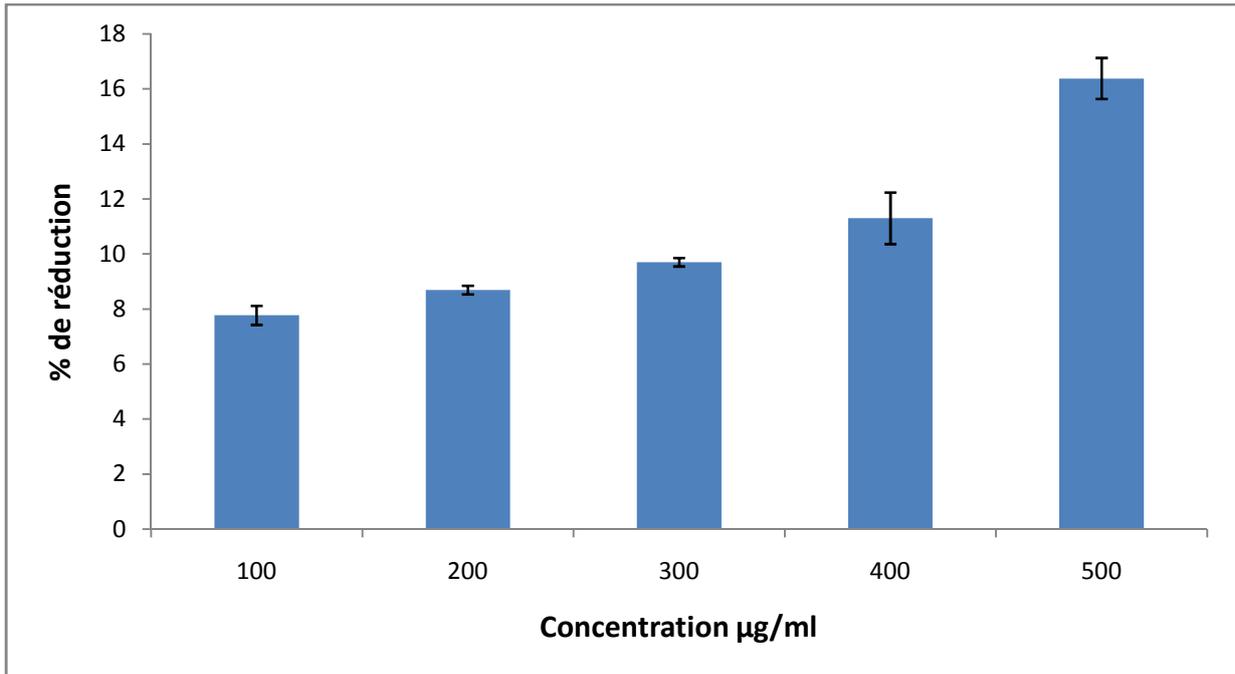


Figure 45 : Pourcentage de réduction du molybdène en fonction de la concentration en BSA.

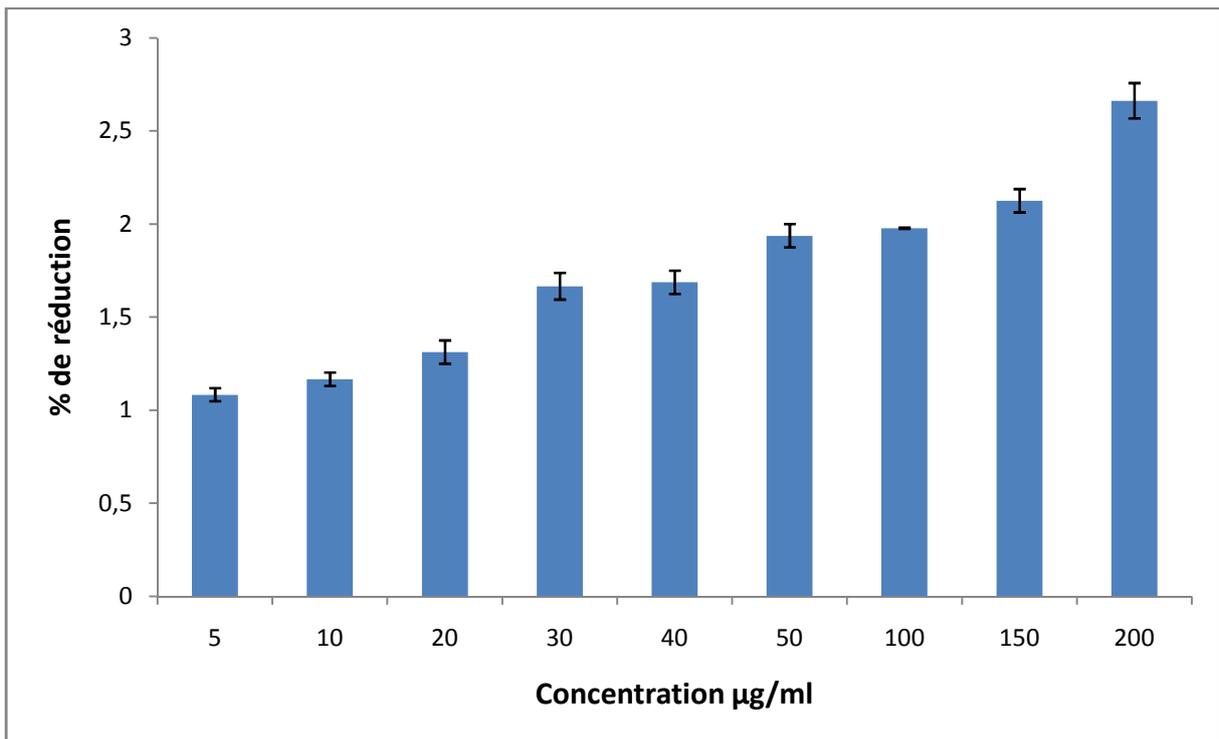


Figure 46 : Pourcentage de réduction du fer en fonction de la concentration en BSA.

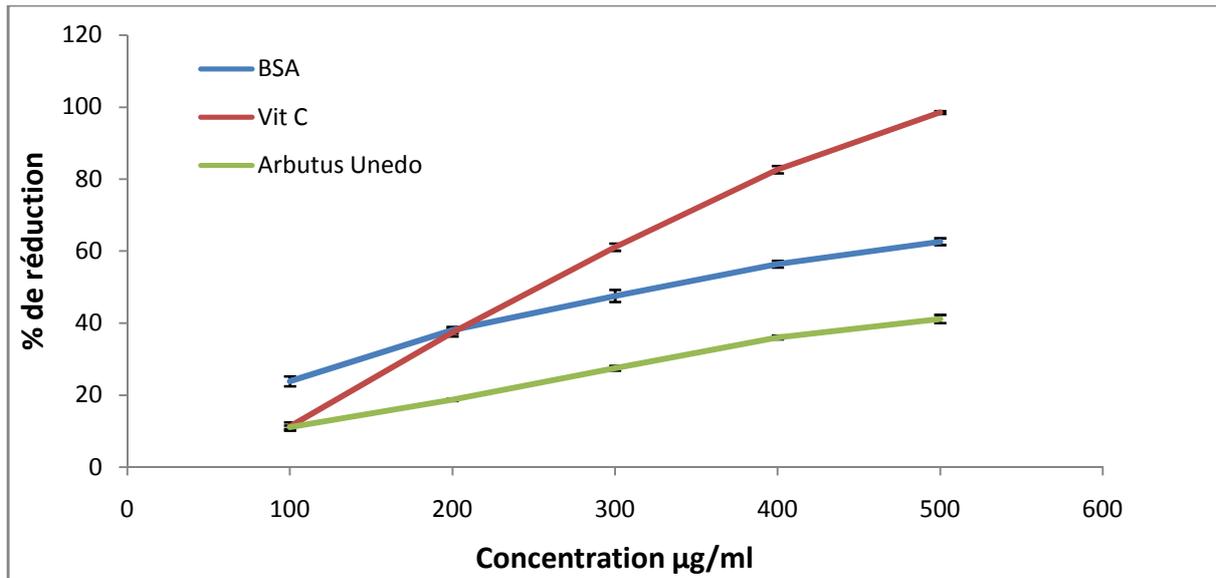


Figure 47 : Pourcentage de réduction du molybdène par la combinaison BSA-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.

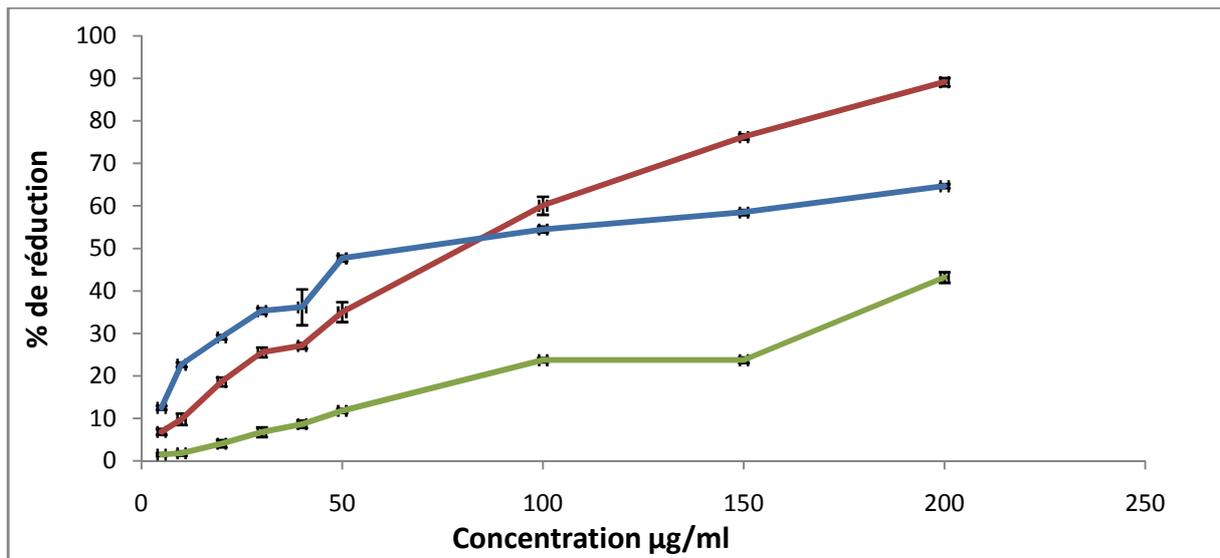


Figure 48 : Pourcentage de réduction du fer par la combinaison BSA-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.

3-12- 3-Combinaison plante-plasma sanguin

Dans le cas du plasma sanguin, la combinaison avec l'extrait aboutit à une activité réductrice du molybdène maximale de $98.13 \pm 0.53\%$, soit une augmentation de 27.8% par rapport au témoin, 11.67% par rapport au standard et 62.47% par rapport à l'extrait.

De plus, l'effet de cette association influe sur le pouvoir réducteur avec une activité maximale de $63.18 \pm 0.34\%$ soit une augmentation de 25.06% par rapport au témoin et 20% par rapport à l'extrait, mais reste à 25.57% au dessous du pourcentage enregistré pour le standard.

Selon DEVARAJ *et al* (2002), une supplémentation en polyphénols extraits de *Pinus pinaster* augmente de 40% la capacité antioxydante du plasma sanguin. Des résultats similaires sont rapportés par PULIDO *et al* (2003) dans le cas d'ingestion de boissons riches en polyphénols comme le vin rouge, les jus de fruits et de légumes, le thé ou alors le café.

D'autres études effectuées par TEISSEDRE (1998) mettent l'accent sur les effets physiologiques obtenus pour la consommation du vin, une restauration de la capacité antioxydante du plasma permettant une amélioration des défenses contre le stress oxydant du diabète ainsi qu'une action favorable sur la sécrétion de l'insuline. D'autre part, PULIDO *et al* (2003) évalue l'effet d'autres boissons riches en polyphénols et trouvent que l'ingestion de ces boissons comme le vin rouge, les jus de fruits et de légumes, ou alors le café et le thé sont susceptibles d'impacter favorablement le potentiel antioxydant du plasma.

Pour ce qui est du thé, réputé riche en flavonoïdes, l'étude réalisée par LEENEN *et al* (2000) montre que son ingestion entraîne l'augmentation significative du statut antioxydant du plasma, avec pour le thé vert, un effet significativement plus important par rapport au thé noir.

Les polyphénols sont connus pour leurs interactions avec les protéines plasmatiques du sang qui sont édifiés par des interactions hydrophobes. L'influence de cette interaction sur le potentiel antioxydant plasmatique ne peut être déterminée que par une analyse antioxydante ainsi que la prise en compte des caractéristiques structurelles des polyphénols ainsi que des protéines (ZOU et XIE, 2013). Dans le sang, les polyphénols présentent une forte affinité aux protéines plasmatiques, celle-ci dépend de plusieurs facteurs comme le nombre de groupement hydroxyles, la présence ou l'absence d'une double liaison et la glycosylation du polyphénol. Pour ce qui est de ce dernier point, dans le cas des flavonoïdes, il diminue leur affinité aux protéines plasmatiques alors que leur méthylation l'augmente. L'interaction polyphénol-protéine dans le sang est un phénomène complexe et pas encore élucidé.

Ajouté à cela, l'effet compétitif pour ces protéines exercé par de nombreuses molécules du sang, telles que les ions métalliques, le glucose, les acides gras et les nombreux métabolites peuvent interférer avec les polyphénols. Récemment, il a été constaté *in vitro* que les ions métalliques tels que Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+} réduisent significativement l'interaction de

plusieurs flavonoïdes avec l'albumine (MAHESHA *et al*, 2006 ; TIAN *et al*, 2006 ; CAO *et al*, 2010).

Dans le sang, la capacité antioxydante est fortement affectée par les concentrations en acide urique qui en plus d'être un puissant piègeur de radicaux libres, fournit 60 à 80% du potentiel antioxydant dans le plasma. GHISELLI *et al* (1995) ; LIN *et al* (2015) et SHI *et al* (2016) rapportent qu'*in vitro*, la quercétine a montré un effet inhibeur de la xanthine oxydoréductase, enzyme intervenant dans la dernière étape de la production intracellulaire de l'acide urique. Ces données suggèrent que la quercétine pourrait baisser les concentrations sanguines d'acide urique et ainsi baisser la capacité antioxydante du sang.

Les effets physiologiques obtenus pour la consommation de polyphénols induisent une restauration de la capacité antioxydante du plasma, une amélioration des défenses contre le stress oxydant du diabète, une réduction des concentrations plasmatiques en glucose, une augmentation de la sécrétion d'insuline et une augmentation de la sensibilité tissulaire à celle-ci (DUTHIE *et al*, 1998 ; TEISSEDDRE, 1998 ; YOUNG *et al*, 1999 ; BOZZETTO *et al*, 2015).

Il existe une corrélation positive entre la concentration en polyphénols et le potentiel antioxydant plasmatique. Néanmoins, les concentrations plasmatiques en polyphénols atteintes après leur consommation varient fortement en fonction de leur nature et de leur source alimentaire (MANACH *et al*, 1995). Selon DUTHIE *et al* (1998) et YOUNG *et al* (1999), la vitesse d'absorption plasmatique des polyphénols dépend de leur structure chimique et non de leur concentration. Les polyphénols les mieux absorbés chez l'homme sont les isoflavones, l'acide gallique, suivis des catéchines, des flavanones et des glucosides de la quercétine alors que les moins bien absorbés sont les proanthocyanidines, les catechines de thé galloylées et les anthocyanes (MANACH *et al*, 2005).

Les effets bénéfiques de ces polyphénols dépendent de divers facteurs, comme l'apport total, les processus de cuisson des aliments, la digestion, l'absorption, les voies métaboliques, mais aussi des différences entre individus (HANHINEVA, 2010).

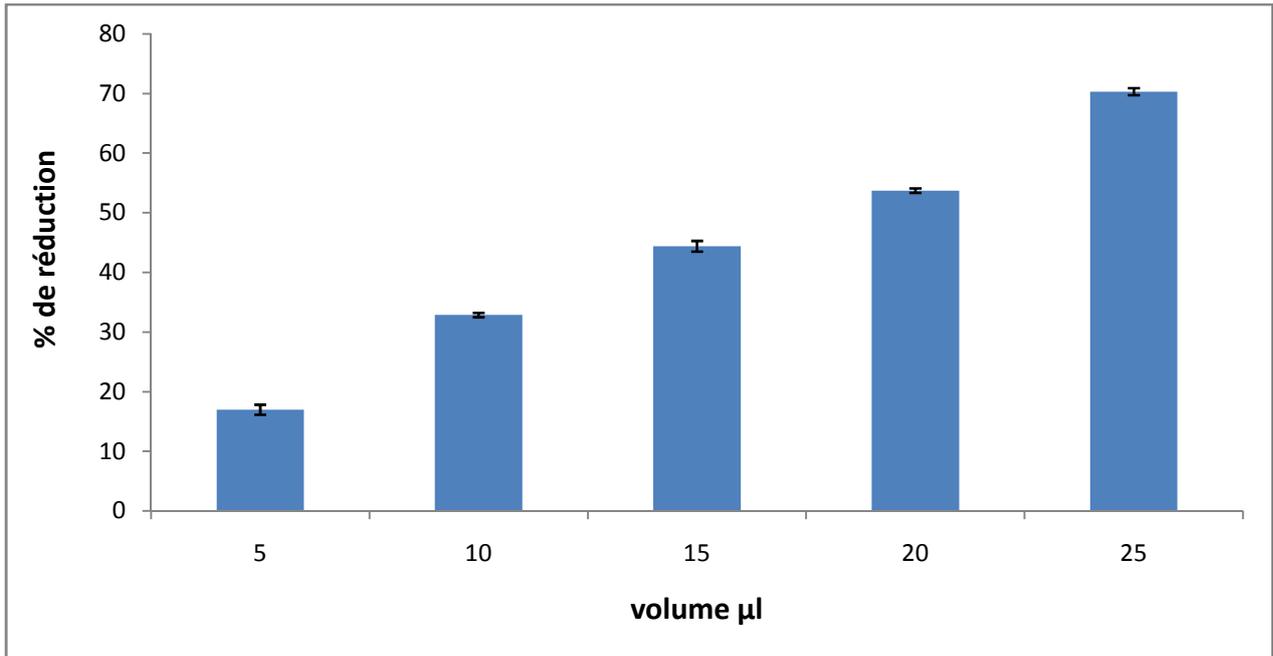


Figure 49 : Pourcentage de réduction du molybdène en fonction du volume de plasma sanguin.

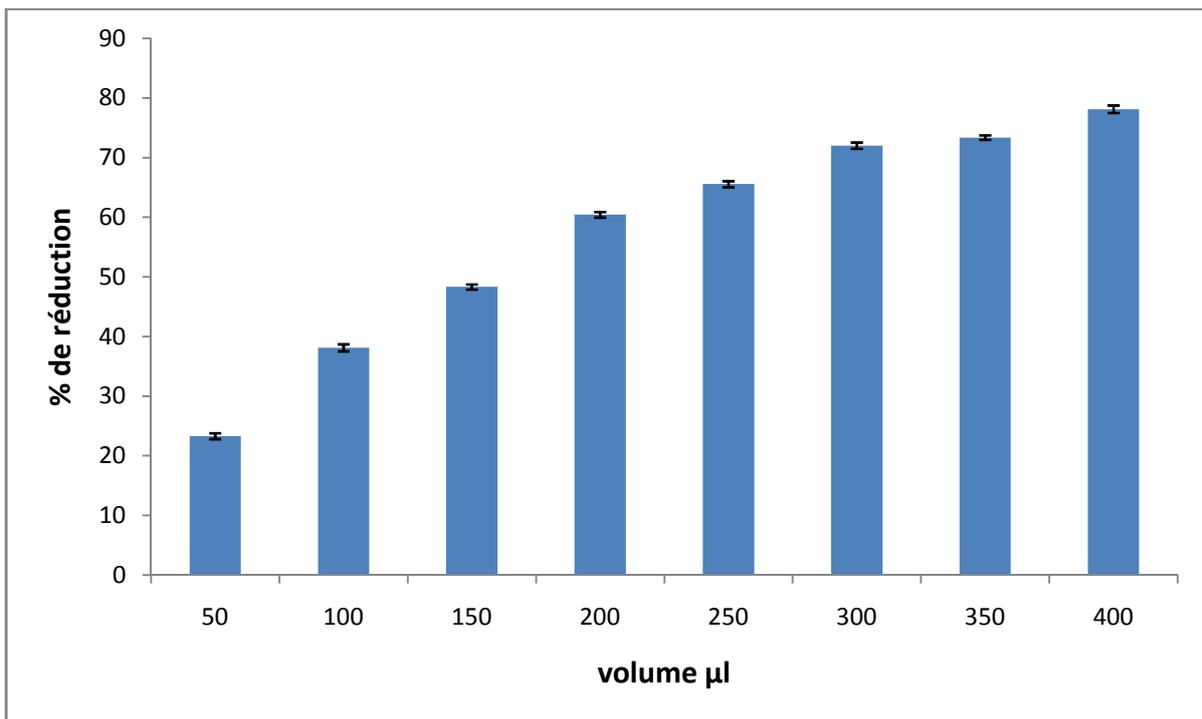


Figure 50 : Pourcentage de réduction du fer en fonction du volume de plasma sanguin.

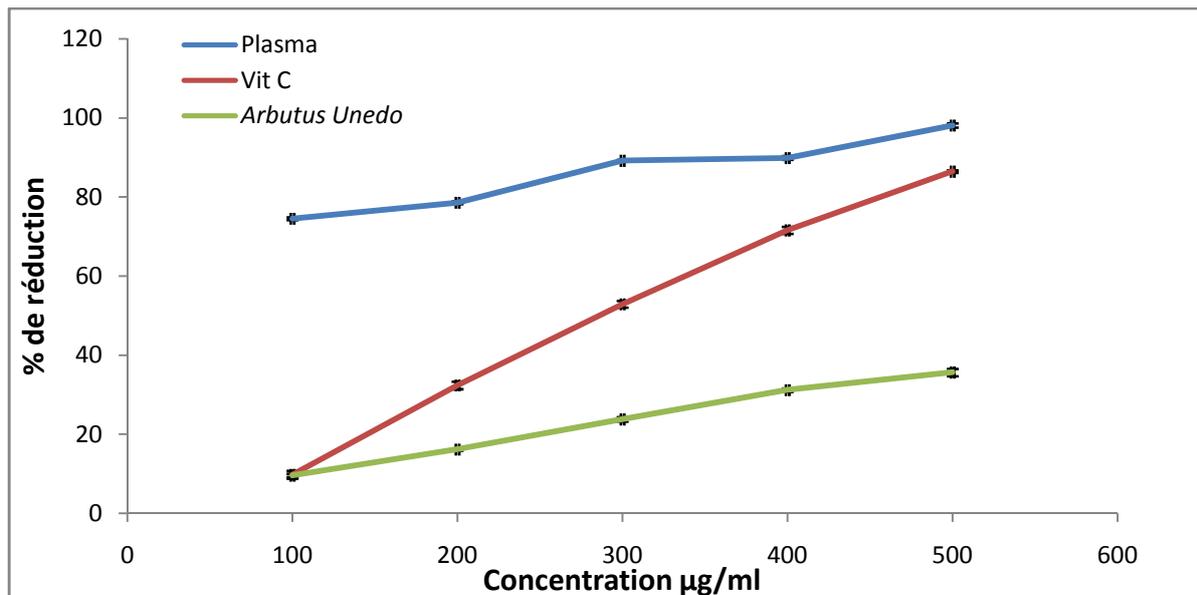


Figure 51 : Pourcentage de réduction du molybdène par la combinaison plasma-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.

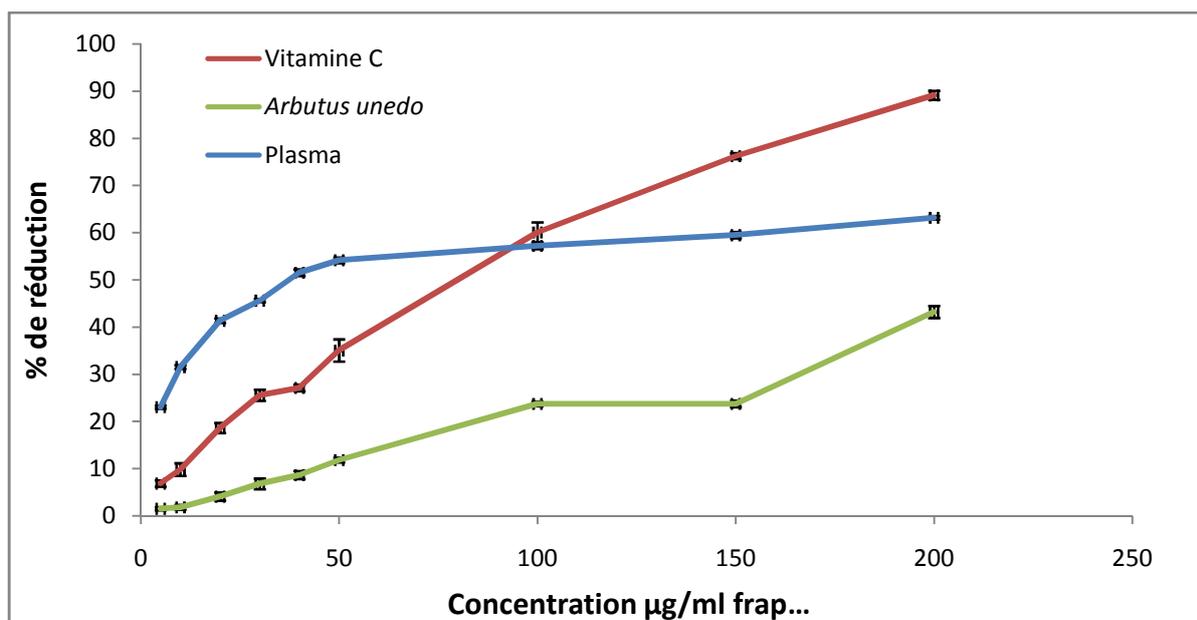


Figure 52 : Pourcentage de réduction du fer par la combinaison plasma-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.

3-12- 4-Combinaison plante-urine

Dans le cas de l'urine, la combinaison avec l'extrait aboutit à une activité réductrice du molybdène maximale de $84.76 \pm 0.9\%$, soit une diminution de 12.29% par rapport au témoin et une augmentation 9.53% par rapport au standard et 53.3% par rapport à l'extrait.

Dans le cas de l'activité réductrice du fer, l'association exprime une activité maximale de $68,81 \pm 0,658\%$ soit une augmentation de 19.69% par rapport au témoin et 25.59% par rapport à l'extrait mais reste inférieure au standard avec un pourcentage de 20.35.

La composition de l'urine est imprévisible, reflétant l'environnement en constante évolution du corps, qui est influencé entre autres par l'alimentation (KIRSCHBAUM, 2001). Environ 160 polyphénols ont été décrits dans l'urine, leur quantité est corrélée positivement avec les concentrations plasmatiques et leur mesure est utilisée comme biomarqueur de l'apport alimentaire (ARCHIVIO *et al*, 2007; HANHINEVA, 2010 ; PEREZ-JIMENEZ *et al*, 2010). L'acide hippurique, indicateur urinaire de la consommation de polyphénols (CLIFFORD *et al*, 2000), est un métabolite résultant de la dégradation microbienne des polyphénols dans le côlon (DUPONT *et al*, 2002). On a également signalé que le potentiel réducteur de l'urine est principalement lié à la concentration en acide urique des échantillons (LISSI *et al*, 1995). Ce dernier, représente environ 75% du potentiel antioxydant de l'urine (BENKHAÏ *et al*, 2010).

Le potentiel biologique des polyphénols urinaires dépend de leur spécificité, leur sensibilité, leur variabilité, leur apport et leur biodisponibilité (ARCHIVIO *et al*, 2007; HANHINEVA, 2010 ; PEREZ-JIMENEZ *et al*, 2010). Dans le système urinaire HONG *et al* (2001) ont décrit une sélectivité régionale des polyphénols dans la prostate. Cette caractéristique combinée au fait que les polyphénols comme ceux du thé vert ont un effet protecteur vis-à-vis du cancer de la prostate soulignent l'importance des polyphénols dans les voies urinaires (ADHAMI *et al*, 2004 ; JIAN *et al*, 2004).

A titre d'exemple, l'acide anacardique est capable d'inhiber l'angiogenèse de la tumeur de la prostate en ciblant la voie de signalisation proto-oncogène. De plus, il affecte la viabilité des cellules endothéliales, la migration, l'adhésion et la différenciation à la fois *in vitro* et *in vivo* des cellules cancéreuses (WU *et al*, 2011). Alors que le resveratrol est impliqué dans l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses, l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dans diverses lignées de cellules du cancer de la prostate (WANG *et al*, 2008; SHETH *et al*, 2012).

On a montré que les polyphénols alimentaires influencent le risque de développer un cancer de la prostate en régulant les gènes inflammatoires et en réduisant les dommages oxydatifs subi par l'ADN (ZHANG *et al*, 2010a ; ZHANG *et al*, 2010b).

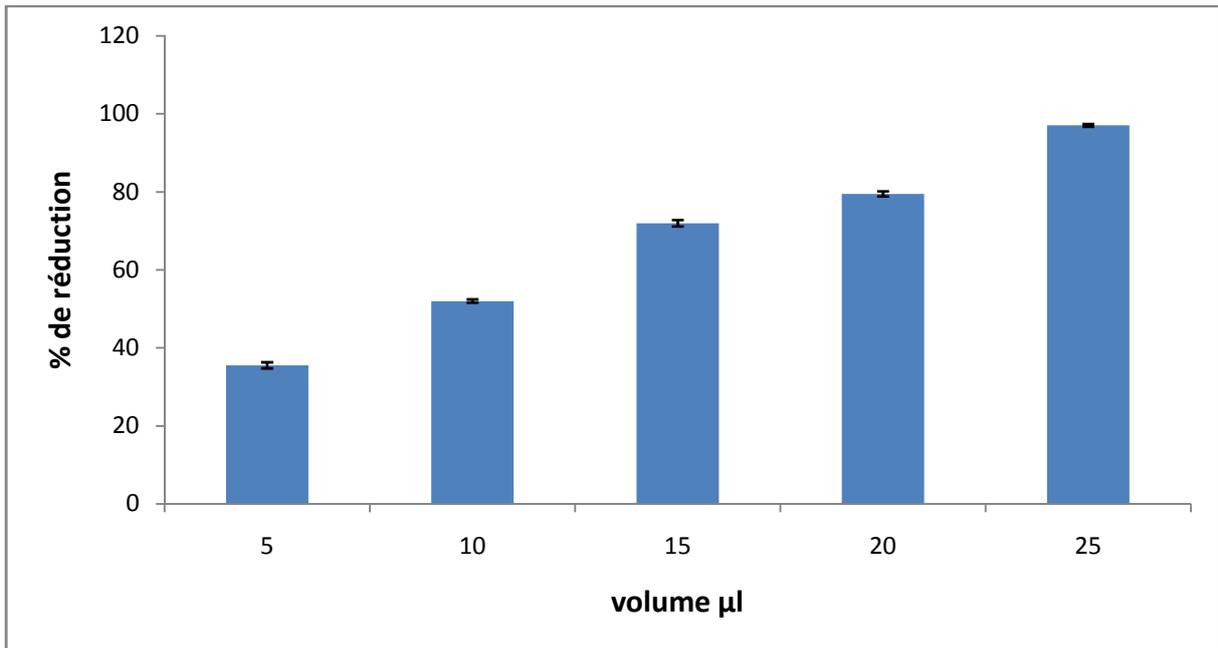


Figure 53 : Pourcentage de réduction du molybdène en fonction du volume d'urine.

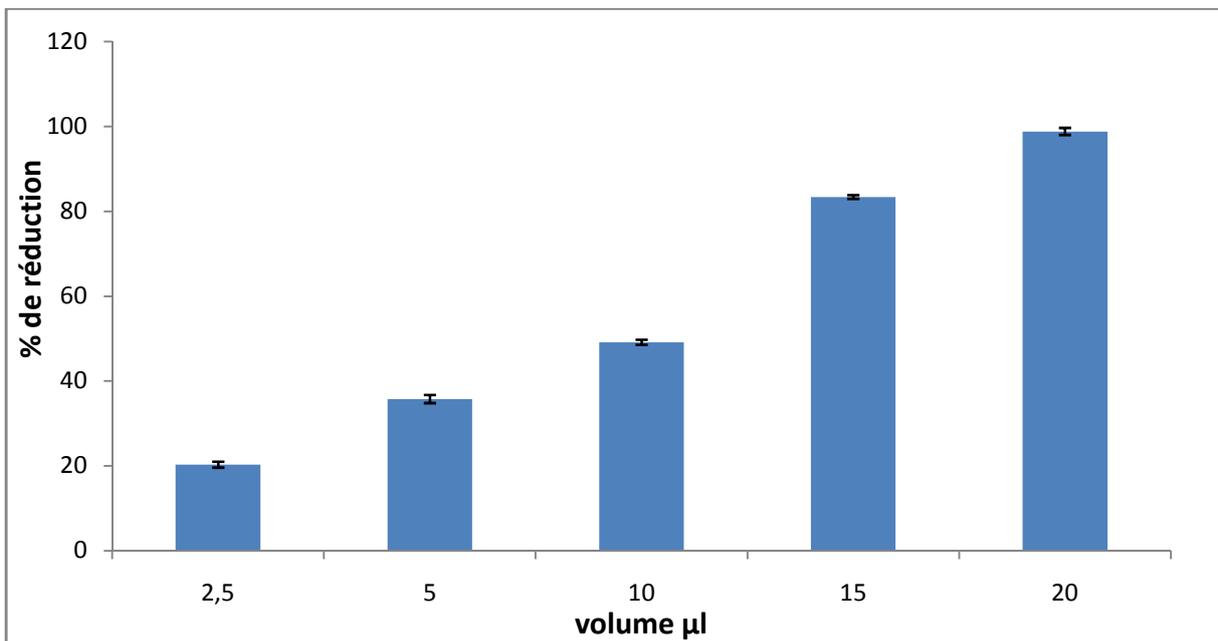


Figure 54 : Pourcentage de réduction du fer en fonction du volume d'urine.

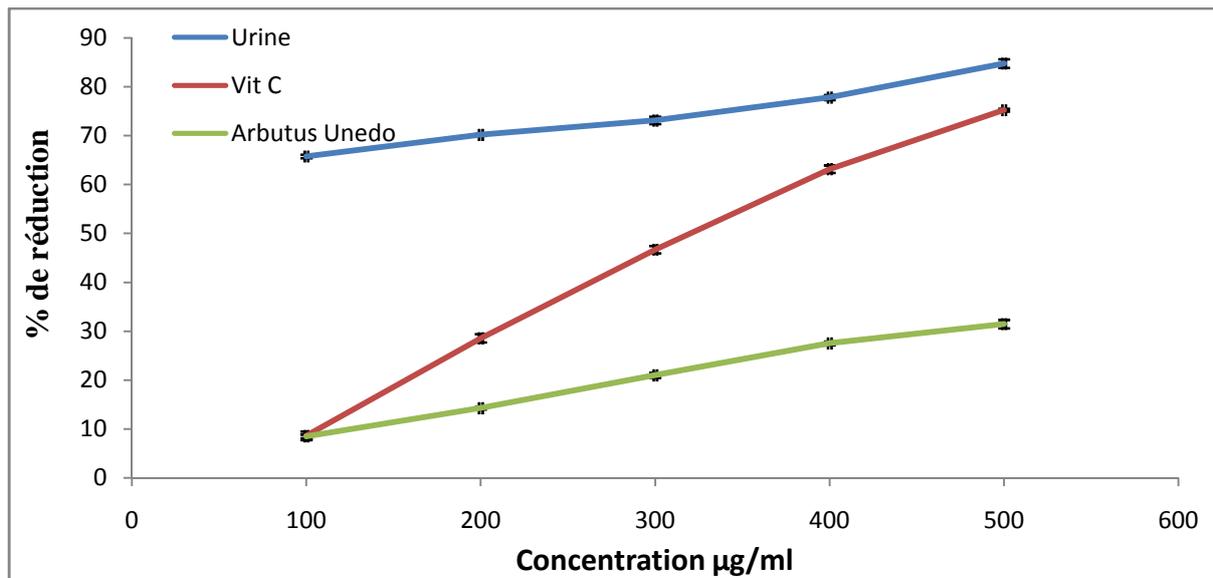


Figure 55 : Pourcentage de réduction du molybdène par la combinaison urine-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.

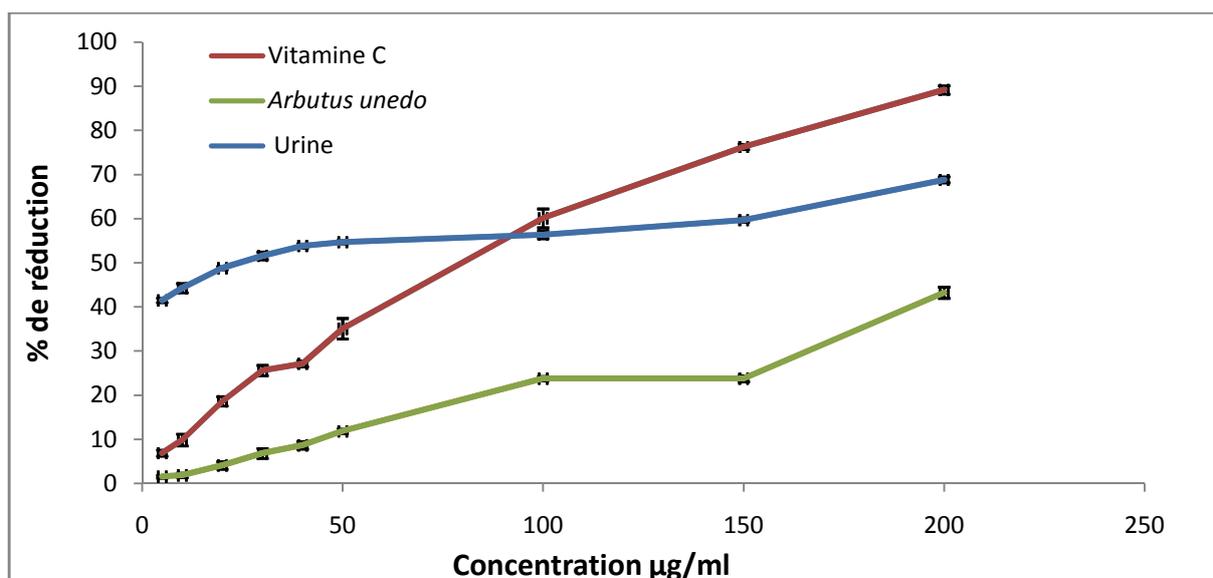


Figure 56 : Pourcentage de réduction du fer par la combinaison urine-plante comparé à l'extrait seul et à la vitamine C.

3-13- Activité antibactérienne

Le traitement des infections bactériennes repose sur les antibiotiques, dont la sur-prescription souvent inappropriée aboutit à la sélection de souches multi-résistantes. Ces dernières posent un problème de santé publique et motivent l'orientation de la recherche scientifique vers de nouvelles molécules d'origine végétale (BILLING et SHERMAN, 1998).

De nombreuses études *in vitro* menées sur le potentiel antibactérien des composés phénoliques les ont confirmés comme agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes avec des spectres d'activités variables.

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion sur disque, vis-à-vis de 10 souches bactériennes de référence qui sont : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Listeria monocytogene* ATCC 15313 et *Citrobacter freundii* ATCC 8090.

Les résultats obtenus font état de zones d'inhibitions comprises entre 7.3 ± 0.6 et 17.3 ± 0.5 mm et sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Diamètres des zones d'inhibition de l'extrait aqueux en mm.

	Souche	Antibiotique Gentamicine 10 µg	Extrait
Gram (-)	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	22 ± 0.1	0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	30.3 ± 0.05	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603	17.6 ± 0.05	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	34 ± 0.1	14 ± 1
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	25.6 ± 0.05	$7.3 \pm 0,5$
Gram (+)	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	26 ± 0.15	$12.3 \pm 0,5$
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	10 ± 0	11 ± 0
	<i>Listeria monocytogene</i> ATCC 15313	7 ± 0	$10.3 \pm 0,6$
	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	30.7 ± 0.06	11 ± 1
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	30.6 ± 0.06	$17.3 \pm 0,6$

Dans notre étude nous pouvons scinder les bactéries de références utilisées en deux groupes égaux en nombre. Les bactéries Gram positif dont fait partie : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 et *Listeria monocytogene* ATCC 15313 et les bactéries Gram négatif dont fait partie : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Citrobacter*

frendii ATCC 8090, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Salmonella typhimurium* ATCC 13311.

Au regard des résultats présentés dans le tableau 3, l'extrait aqueux de feuilles d'Arbousier à la concentration de 50 mg/ml, présente une activité antibactérienne vis-à-vis de la majorité des bactéries testées. L'analyse de ces résultats montre clairement un effet plus important de cet extrait sur les bactéries Gram positif. En effet, l'absence de zone d'inhibition dans les boîtes test ensemencées avec *Citrobacter frendii* ATCC 8090, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 traduit leur résistance à l'extrait étudié. Dans une moindre mesure, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 laisse apparaître une zone d'inhibition faible, par contre *Pseudomonas aeruginosa* 27853 connue pour être une bactérie très résistante donne une zone d'inhibition qui dépasse celles relevées pour quatre des cinq bactéries Gram + testées. Ces résultats, traduisent clairement une plus grande sensibilité des bactéries Gram + à l'extrait appliqué. Des résultats similaires sont rapportés par ORAK *et al* (2011) ; HAOUAT *et al* (2012). D'une façon plus générale, plusieurs études font état d'une activité accrue des composés phénoliques sur les bactéries Gram positif comparativement aux bactéries Gram négatif (TODA *et al*, 1989 ; IKIGAI *et al*, 1993; ARAKAWA *et al*, 2004). La raison de ce contraste de sensibilité, est attribuée aux différences dans les constituants de la membrane cellulaire ainsi qu'à leur agencement. Il est admis que les bactéries Gram positif contiennent un peptidoglycan, qui est une barrière d'imperméabilité inefficace ce qui permet aux molécules d'atteindre leur cible (SCHERRER et GERHARDT, 1971).

Il existe dans la littérature peu d'études sur l'effet antibactérien de l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo*, ce qui rend difficile la comparaison de nos résultats. Néanmoins, les diamètres des zones d'inhibition obtenues dans cette étude restent supérieurs à ceux rapportés pour le même extrait par ORAK *et al* (2011) (10.5 ± 0.15 mm pour *S. aureus*) et par MALHEIRO *et al* (2012) (*S. aureus* 10 mm, *B. cereus* 10 mm et *P. aeruginosa* 11mm).

La variation des diamètres des zones d'inhibition en plus d'être impacté par le micro-organisme, la plante (genre, partie utilisée, variations génétiques etc.) et le potentiel antibactérien des substances bioactive de l'extrait, elle l'est aussi par la capacité de diffusion dans le milieu gélosé de ces dernières (SASSI *et al*, 2007 ; CARNEIRO *et al*, 2008 ; MALHEIRO *et al*, 2012 ; MIGUEL *et al*, 2014).

Le potentiel antibactérien de l'extrait étudié dépend de sa teneur en polyphénols et plus particulièrement en flavonoïdes et tanins (FERREIRA *et al*, 2012 ; DIB *et al*, 2013). En effet,

la littérature fait état de nombreux travaux qui mettent en relief le rôle prépondérant des tanins en tant qu'agents antibactériens efficaces (SANOGO *et al*, 2006). Ils sont impliqués dans l'inhibition des enzymes extracellulaires et de la phosphorylation oxydative (SCHOFIELD *et al*, 2001).

Les flavonoïdes considérés comme la fraction la plus active des polyphénols, agissent en synergie avec divers antibiotiques (DAGLIA, 2012) et sont impliqués dans l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique (PLAPER *et al*, 2003) ainsi que des fonctions des membranes cytoplasmiques (IKIGAI *et al*, 1993 ; SCAZZOCCHIO *et al*, 2006).

Les flavonoïdes antibactériens pourraient avoir plusieurs sites d'action. Une de leurs actions moléculaires est de former des complexes avec des protéines par des liaisons non spécifiques telles que la liaison hydrogène et hydrophobes. Leur mode d'action antimicrobienne peut être lié à leur capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes et les protéines de transport de l'enveloppe cellulaire. Les flavonoïdes lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes (COWAN, 1999 ; MISHRA *et al*, 2009).

HARAGUCHI *et al* (1998), mettent en relief que l'effet le plus observé des flavonoïdes est leur inhibition de la chaîne de transport des électrons respiratoires bactériens et que leur site d'inhibition se trouve entre la CoQ et le cytochrome C. L'inhibition des micro-organismes par les composés phénoliques peut être due à plusieurs facteurs comme, la privation du fer, les liaisons hydrogènes réalisées avec des protéines vitales comme les enzymes microbiennes, (SCALBERT, 1991).

La déstabilisation de la membrane externe des micro-organismes Gram négatif, ainsi que les interactions avec la membrane cellulaire pourraient être l'un des mécanismes spécifiques derrière l'action antibactérienne par ces composés (LI *et al*, 2014). De plus, ils sont capables de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbiens, tels que la réduction de l'adhésion aux ligands de l'hôte, l'inhibition de la formation de biofilms, la neutralisation des toxines bactériennes et la synergie avec les antibiotiques (DAGLIA, 2012).

La concentration minimale inhibitrice ou CMI est la plus petite concentration de l'agent antibactérien suffisante pour inhiber, *in vitro*, la croissance d'une souche bactérienne. Elle renseigne sur le potentiel bactériostatique de l'agent antibactérien utilisé. La CMI de l'extrait

vis-à-vis d'une souche donnée sera donc la plus petite des concentrations ne montrant aucune croissance visible de germes.

La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés par la littérature reste difficile en raison de plusieurs variables comme la technique utilisée, la quantité et la concentration d'extrait appliquée sur les disques. De plus, l'évaluation de ces derniers en termes de sensibilité et de résistance des souches reste impossible, car il n'existe pas de norme à l'image de celle utilisée pour les antibiotiques.

Tableau 5: CMI de l'extrait vis-à-vis des souches sensibles.

Souche	CMI mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1.6 ± 0.28
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	4.7 ± 0.3
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	1.3 ± 0.57
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 49452	2.1 ± 0.28
<i>Listeria monocytogene</i> ATCC 15313	2.7 ± 1.15
<i>Proteus mirabelis</i> ATCC 35659	3.4 ± 0.57
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	1 ± 0.36

3-14- Activité antileishmanienne

L'extrait lyophilisé a été dilué dans du DMSO dont nous avons vérifié l'innocuité vis-à-vis de notre parasite.

Les résultats ont montré que l'activité antileishmanie de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* est dépendante de la dose à des concentrations allant de 12,5 à 100 µg / ml. L'activité maximale de l'extrait a été évaluée à 74% de mortalité des promastigotes pour la concentration de 100 µg/ml et à 100% pour la fungizone à 100 mg/ml. Les données collectées (figure 57) indiquent clairement que la concentration inhibitrice pour l'extrait est inférieure à 12,5 µg / ml.

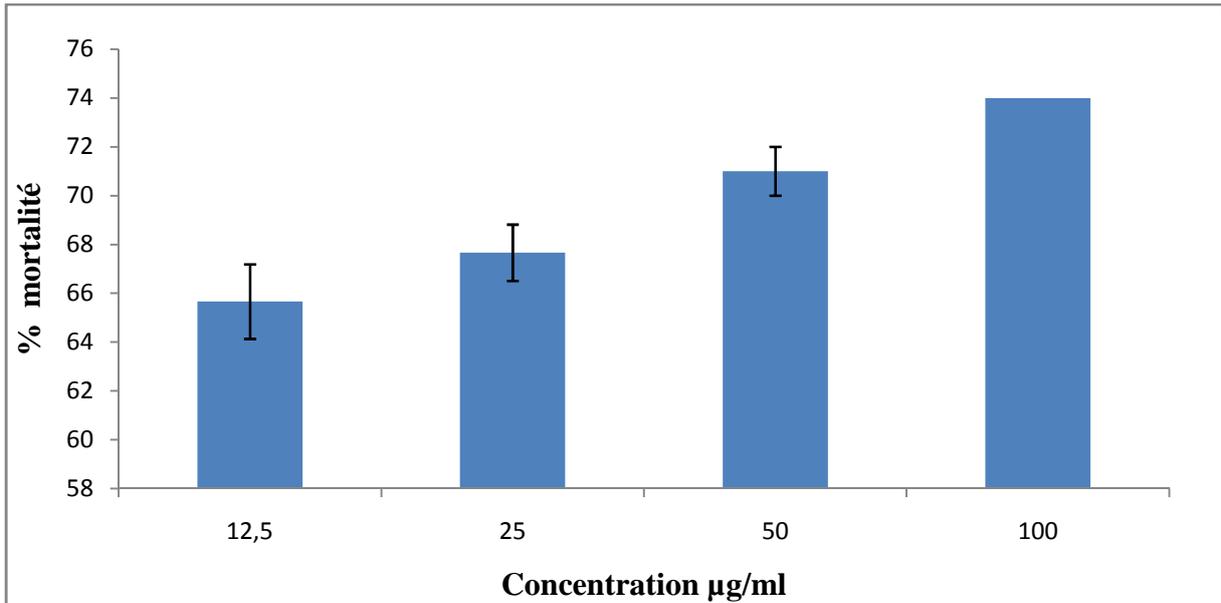


Figure 57 : Pourcentage de mortalité des promastigotes en fonction de la concentration en extrait.

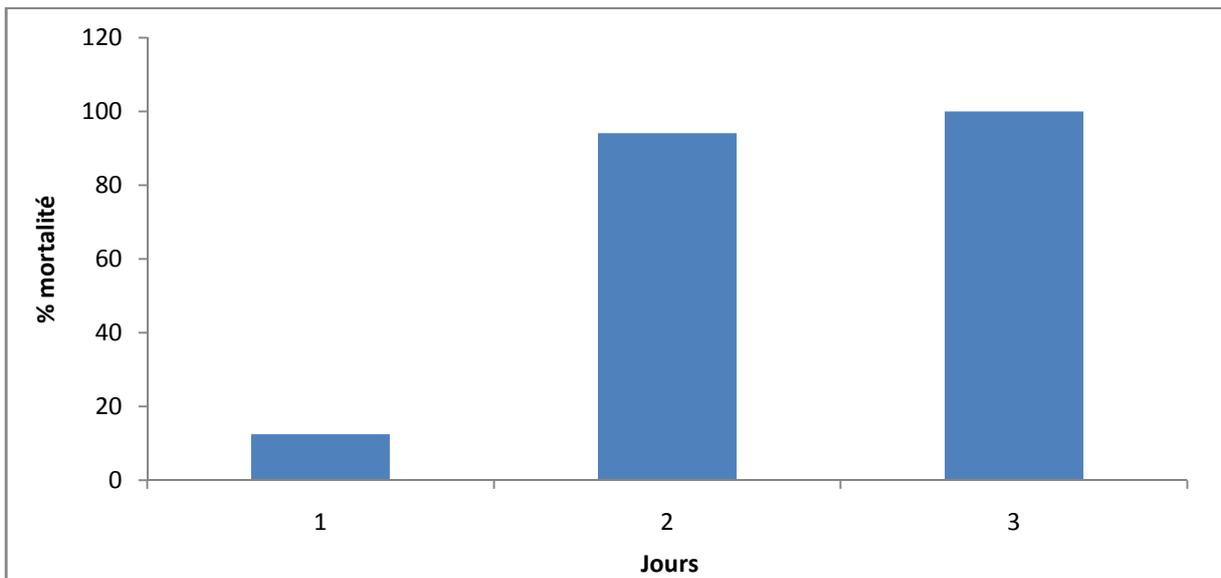


Figure 58 : Pourcentage de mortalité des promastigotes pour la Fungizon (100mg/ml).

Ces dernières années, la recherche scientifique vise à mettre au point des composés à effet leishmanicide puissant et se tourne vers les extraits végétaux. Cette démarche se trouve confortée à titre d'exemple par les travaux sur *Artemisia absinthium* effectués par Youyou Tu sur le paludisme et qui ont été distingués en 2015 par le prix Nobel de médecine.

Dans une étude réalisée en Turquie, sur l'activité leishmanicide *in vitro* d'extrait éthanoliques, aqueux et hexane de feuilles d'*Arbutus unedo* vis-à-vis de promastigote de *Leishmania Tropica* a révélé que l'extrait éthanolique est le plus efficace (KIVÇAK *et al*, 2009).

Peu d'études dans la littérature font état de l'activité de l'extrait aqueux d'*Arbutus unedo* contre *Leishmania infantum*, ce qui ne nous permet pas de comparer nos résultats. Néanmoins, nous pouvons citer les travaux de KHADEM VATAN *et al* (2016), sur l'activité de l'extrait de *Holothuria leucospilota* sur les promastigotes de *Leishmania infantum*, où il trouve une IC50 de $53,5 \pm 2,5 \mu\text{g} / \text{ml}$. Dans une autre étude MANSOUR *et al* (2013), rapporte une IC50 de $12,53 \mu\text{g} / \text{ml}$ pour l'activité anti- *Leishmania infantum* de l'extrait aqueux de *Vitis vinifera*.

De nombreuses études se sont intéressées aux composés des plantes médicinales tels que les polyphénols, les triterpènes, les saponines (KOŁODZIEJ *et al*, 2001 ; RIDOUX *et al*, 2001; TAN *et al*, 2002 ; SAWADOGO *et al*, 2012), le resvératrol (FERREIRA *et al*, 2014), les tanins (KIDERLEN *et al*, 2001), les alcaloïdes (DELORENZI *et al*, 2001) et les quinones (GONZALEZ-COLOMA *et al*, 2012). L'action antileishmanie de ces composés naturels n'a pas encore été élucidée; néanmoins HODEK *et al* (2002), rapportent que l'action antileishmanie des flavonoïdes se fait par inhibition de la topoisomérase parasitaire.

Ces dernières années, la recherche de nouvelles molécules anti-*Leishmania* a été menée à travers des techniques de base, telles que l'inhibition *in vitro* de la croissance des promastigotes (LIU et WANG, 2008), mais cela reste insuffisant en raison du nombre limité d'études sur la forme amastigote qui est la forme pathogène (ACESTOR *et al*, 2002).

La résistance des protozoaires tels que *Leishmania* aux médicaments utilisés pour leur traitement est en augmentation dans les pays développés. Selon LEANDRO et CAMPINO (2003), dans de nombreux cas, la résistance serait due à l'expression de la pompe d'efflux MRP (multi-drogue résistance protéine). Celle-ci appartient à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) et est impliqué dans la résistance à l'antimoine (traitement anti-leishmania classique).

Conclusion

Conclusion

Le présent travail a eu pour objectif l'étude de plusieurs activités biologiques de l'extrait aqueux de feuilles d'*Arbutus unedo* L.

Cette étude s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe « santé et biomolécules actives ». L'objectif assigné a été de vérifier le potentiel antioxydant des feuilles d'arbousier collectées dans la région de Tizi-Ouzou et d'évaluer le potentiel de cet extrait végétal dans d'autres activités biologiques retrouvées dans d'autres plantes.

Pour ce faire, dans un premier temps nous avons testé l'activité antioxydante de l'extrait. Celui-ci a révélé une capacité de piégeage des radicaux libres comme DPPH ($IC_{50} = 7.956 \pm 0.278 \mu\text{g/ml}$), OH ($IC_{50} = 1015.74 \pm 46.35 \mu\text{g/ml}$) et H_2O_2 ($IC_{50} = 114.77 \pm 16.86 \mu\text{g/ml}$). Pour ce qui est du blanchiment du β -carotène nous avons enregistré une inhibition de $87.04 \pm 1.21 \%$ à la concentration de 1mg/ml. De plus l'extrait a exprimé la capacité de chélation des ions ferreux et celle-ci a été estimée par une IC_{50} de $1014.30 \pm 36.21 \mu\text{g/ml}$.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la stabilisation des membranes érythrocytaires. Celle-ci a été appréciée par le test de stabilisation des érythrocytes vis-à-vis d'un stress osmotique où l'extrait a montré un pouvoir protecteur de l'ordre de $76.46 \pm 1.80\%$. Pour ce qui est de la stabilisation vis-à-vis d'un oxydant (HOCl) ainsi que de la chaleur, la protection obtenue avec l'extrait aqueux des feuilles d'arbousier est respectivement de $73.90 \pm 2.08 \%$ et $79.66 \pm 1.92 \%$. De plus l'effet thrombolytique, inhibiteur de la peroxydation ainsi que de la dénaturation thermique de la BSA obtenus avec l'extrait étudié sont respectivement de $57.8 \pm 3.16\%$, de 23.42% et de $74.28 \pm 0.86\%$.

Les résultats obtenus lors de l'évaluation du potentiel hypocholestérolémiant et hypoglycémiant montrent que l'extrait étudié influe clairement sur la diffusion et l'absorption du cholestérol et du glucose.

D'autre part, l'effet synergique observé entre l'extrait étudié, la salive, le plasma sanguin, l'urine et la BSA, indique qu'*in vivo*, la consommation de l'extrait de feuilles d'arbousier ne peut qu'augmenter l'effet antioxydant de celui-ci.

L'inhibition de la croissance de *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Listeria monocytogene* ATCC 15313, *Proteus mirabelis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et de *Leishmania infantum* par l'extrait, indique sa possible utilisation comme antibactérien et antiparasitaire.

L'ensemble de ces résultats justifie l'utilisation traditionnelle de l'arbousier et démontrent son potentiel comme source de biomolécules aux multiples applications thérapeutiques. Notre travail met en relief de nouvelles voies d'investigations ainsi que de nombreuses perspectives comme :

- La purification et l'identification des principes actifs.
- Déterminer les doses thérapeutiques pour chaque molécule active.
- L'étude de la toxicité de l'extrait brut et fractionné.
- L'élargissement de l'éventail des activités et des tests utilisés.
- Le passage aux tests *in vivo*.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abdal Dayem, A., Choi, H. Y., Yang, G. M., Kim, K., Saha, S. K., & Cho, S. G.** (2016). The Anti-Cancer Effect of Polyphenols against Breast Cancer and Cancer Stem Cells: Molecular Mechanisms. *Nutrients*, 8(9), 581.
- **Acestor, N., Masina, S., Walker, J., Saravia, N. G., Fasel, N., & Quadroni, M.** (2002). Establishing two-dimensional gels for the analysis of Leishmania proteomes. *Proteomics*, 2(7), 877-879.
- **Addai, Z. R., Abdullah, A., & Mutalib, S. A.** (2013). Effect of extraction solvents on the phenolic content and antioxidant properties of two papaya cultivars. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(46), 3354-3359.
- **Adhami, V. M., Siddiqui, I. A., Ahmad, N., Gupta, S., & Mukhtar, H.** (2004). Oral Consumption of Green Tea Polyphenols Inhibits Insulin-Like Growth Factor-I-Induced Signaling in an Autochthonous Mouse Model of Prostate Cancer. *Cancer research*, 64(23), 8715-8722.
- **Adisakwattana, S., Intrawangso, J., Hemrid, A., Chanathong, B., & Mäkynen, K.** (2012). Extracts of edible plants inhibit pancreatic lipase, cholesterol esterase and cholesterol micellization, and bind bile acids. *Food Technology and Biotechnology*, 50(1), 11.
- **Afkir, S., Nguenefack, T. B., Aziz, M., Zoheir, J., Cuisinaud, G., Bnouham, M., ... & Ziyat, A.** (2008). Arbutus unedo prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats: Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of Arbutus unedo in L-NAME-induced hypertensive rats. *Journal of ethnopharmacology*, 116(2), 288-295.
- **Aherne, S. A., & O'Brien, N. M.** (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
- **Ahmed, F., Sairam, S., & Urooj, A.** (2011). In vitro hypoglycemic effects of selected dietary fiber sources. *Journal of food science and technology*, 48(3), 285-289.
- **Ahmed, N.** (2005). Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice*, 67(1), 3-21.)
- **Ajayi, A. M., Tanayen, J. K., Magomere, A., & Ezeonwumelu, J. O.** (2017). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of aqueous extract of *Chenopodium opulifolium* schrad leaves. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 6(1), 14.

- **Akowuah, G. A., Ismail, Z., Norhayati, I., & Sadikun, A.** (2005). The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, *93*(2), 311-317.
- **Akrout, A., Gonzalez, L. A., El Jani, H., & Madrid, P. C.** (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(2), 342-347.
- **Alarcao-E-Silva, M. L. C. M. M., Leitão, A. E. B., Azinheira, H. G., & Leitão, M. C. A.** (2001). The arbutus berry: studies on its color and chemical characteristics at two mature stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, *14*(1), 27-35.
- **Ali, N. A., Jülich, W. D., Kusnick, C., & Lindequist, U.** (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, *74*(2), 173-179.
- **Almajano, M. P., Delgado, M. E., & Gordon, M. H.** (2007). Albumin causes a synergistic increase in the antioxidant activity of green tea catechins in oil-in-water emulsions. *Food chemistry*, *102*(4), 1375-1382.
- **Al-Mutairi, D. A., Al-Mutairi, D. A., Craik, J. D., Batinic-Haberle, I., & Benov, L. T.** (2007). Induction of oxidative cell damage by photo-treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. *Free radical research*, *41*(1), 89-96.
- **Alvesalo, J., Vuorela, H., Tammela, P., Leinonen, M., Saikku, P., & Vuorela, P.** (2006). Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures. *Biochemical pharmacology*, *71*(6), 735-741.
- **Amoako, D., & Awika, J. M.** (2016). Polyphenol interaction with food carbohydrates and consequences on availability of dietary glucose. *Current Opinion in Food Science*, *8*, 14-18.
- **Androutsopoulos, V. P., Papakyriakou, A., Vourloumis, D., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A.** (2010). Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & therapeutics*, *126*(1), 9-20.
- **Ansari, P., Sarker, J., Azam, S., Sen, S., Mondal, K. K., Badhan, S. S., & Tapti, Z. T.** (2015). Potential investigation of anti-inflammatory and anti-oxidative property of ethanolic extract of *Ixora nigricans* leaves. *International Journal of Pharmacological Research*, *5*(4), 104-109.

- **Anticogulant, P. A., & Agent, A.** (2014). Plant as anticogulant/antithrombotic agent. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3(3), 4573-4585.
- **Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K.** (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-198.
- **Anttila H, Sontag-Strohm T, Salovaara H.** (2004) Viscosity of beta-glucan in oat products. *Agr Food Sci* 13:80–87.
- **Arakawa, H., Maeda, M., Okubo, S., & Shimamura, T.** (2004). Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(3), 277-281.
- **Arbos, K. A., Claro, L. M., Borges, L., Santos, C. A., & Weffort-Santos, A. M.** (2008). Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*, 28(7), 457-463.
- **Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R.** (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-Istituto Superiore di Sanita*, 43(4), 348.
- **Ayaz, F. A., Kucukislamoglu, M., & Reunanen, M.** (2000). Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(2), 171-177.
- **Bagli, E., Stefaniotou, M., Morbidelli, L., Ziche, M., Psillas, K., Murphy, C., & Fotsis, T.** (2004). Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3 -kinase activity. *Cancer Research*, 64(21), 7936-7946.
- **Bahorun, T.** (1998). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In *Second Annual Meeting of Agricultural Scientists* (p. 83).
- **Baldosano, H. Y., CASTILLO, B., Elloran, C. D. H., & Bacani, F. T.** (2015). Effect of Particle Size, Solvent and Extraction Time on Tannin Extract from *Spondias purpurea* Bark Through Soxhlet Extraction. In *Proceedings of the DLSU Research Congress* (Vol. 3).
- **Baradaran, A., Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M.** (2014). Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(4), 358.

- **Battistelli, M., De Sanctis, R., De Bellis, R., Cucchiarini, L., Dachà, M., & Gobbi, P.** (2005). Rhodiola rosea as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and hemolytic behaviour. *European journal of histochemistry: EJH*, 49(3), 243.
- **Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H.** (2008). *Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses*. John Wiley & Sons.
- **Baumann, E., Stoya, G., Völkner, A., Richter, W., Lemke, C., & Linss, W.** (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta histochemica*, 102(1), 21-35.
- **Bengmark, S.** (2007). Advanced glycation and lipoxidation end products—amplifiers of inflammation: the role of food. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 31(5), 430-440.
- **Benkhail, H., Lemanski, S., Below, H., Heiden, J. U., Below, E., Lademann, J., ... & Kramer, A.** (2010). Can physical stress be measured in urine using the parameter antioxidative potential?. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*, 5(1).
- **Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M.** (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4), 617-633.
- **Bennick, A.** (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 184-196.
- **Berenbaum, M. R.** (1995). The chemistry of defense: theory and practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(1), 2-8.
- **Beta, T., Nam, S., Dexter, J. E., & Sapirstein, H. D.** (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82(4), 390-393.
- **Bhat, S.V., Nagasampigi B.A. et Sivakumar, M.** (2005). Chemistry of Natural Products. *Narosa, Springer*, 1 (1), 115-252.
- **Bhutkar, M., & Bhise, S.** (2013). In vitro hypoglycemic effects of Albizzia lebbek and Mucuna pruriens. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(11), 866-870.
- **Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P.** (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(8), 994-1003.
- **Billing, J., & Sherman, P. W.** (1998). Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly review of biology*, 73(1), 3-49.

- **Bisht, A.** (2012). an huge updated review on dyslipidemia etiology with various approaches for its treatment. *therapy*, 4, 5.
- **Bisson, L. F., Coons, D. M., Kruckeberg, A. L., & Lewis, D. A.** (1993). Yeast sugar transporters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(4), 259-308.
- **Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Legssyer, A., Mekhfi, H., Maâllem, S., & Ziyyat, A.** (2007). Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(8), 630-632.
- **Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Ziyyat, A., Aziz, M., Legssyer, A., & Mekhfi, H.** (2010). Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Human & experimental toxicology*, 29(10), 865-871.
- **Boizot, N., & Charpentier, J. P.** (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006: Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*, 79-82.
- **Bouchelta, A., Boughdad, A., & Blenzar, A.** (2005). Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L.(Solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Homoptera: Aleyrodidae). *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 9(4), 259-269.
- **Bourdon, E., Loreau, N., & Blache, D.** (1999). Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *The FASEB journal*, 13(2), 233-244.
- **Bourgou, S., Beji, R. S., Medini, F., & Ksouri, R.** (2016). Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences*, 28.
- **Bourne, L. C., & Rice-Evans, C.** (1998). Bioavailability of ferulic acid. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(2), 222-227.
- **Bouزيد, A., Chadli, R., & Bouزيد, K.** (2016). Étude ethnobotanique de la plante médicinale *Arbutus unedo* L. dans la région de Sidi Bel Abbés en Algérie occidentale. *Phytothérapie*, 1-6.
- **Bozzetto, L., Annuzzi, G., Pacini, G., Costabile, G., Vetrani, C., Vitale, M., ... & Della Pepa, G.** (2015). Polyphenol-rich diets improve glucose metabolism in people

at high cardiometabolic risk: a controlled randomised intervention trial. *Diabetologia*, 58(7), 1551-1560.

- **Brown, L., Rosner, B., Willett, W. W., & Sacks, F. M.** (1999). Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, 69(1), 30-42.
- **Bruneton, J.** (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (3e édition) Tec & Doc Lavoisier.
- **Bruneton, J.**, *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4^e éd., revue et augmentée*, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 2009, 1288 p. (ISBN 978-2-7430-1188-8)
- **Cabral, I. S. R., Oldoni, T. L. C., Alencar, S. M. D., Rosalen, P. L., & Ikegaki, M.** (2012). The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(3), 557-564.
- **Cai, Y., Gaffney, S. H., Lilley, T. H., & Haslam, E.** (1989). Carbohydrate—Polyphenol Complexation. In *Chemistry and significance of condensed tannins* (Springer US Plenum Press: New York). (pp. 307-322).
- **Camargo, L. E. A., Pedroso, L. S., Vendrame, S. C., Mainardes, R. M., & Khalil, N. M.** (2016). Antioxidant and antifungal activities of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. *Brazilian Journal of Biology*, 76(2), 428-434.
- **Camboulives, J., & Paut, O.** (2001). Traitement des thromboses chez l'enfant: médicaments antithrombotiques et fibrinolytiques. *Réanimation*, 10(5), 487-494.
- **Cao, S., Jiang, X., & Chen, J.** (2010). Effect of Zinc (II) on the interactions of bovine serum albumin with flavonols bearing different number of hydroxyl substituent on B-ring. *Journal of inorganic biochemistry*, 104(2), 146-152.
- **Carcache-Blanco, E. J., Cuendet, M., Park, E. J., Su §, B. N., Rivero-Cruz, J. F., Farnsworth, N. R., ... & Douglas Kinghorn §, A.** (2006). Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. *Natural product research*, 20(04), 327-334.
- **Carneiro, A. L. B., Teixeira, M. F. S., Oliveira, V. M. A. D., Fernandes, O. C. C., Cauper, G. S. D. B., & Pohlit, A. M.** (2008). Screening of Amazonian plants from

the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 31-38.

- **Carter, D. C., & Ho, J. X.** (1994). Structure of serum albumin. *Advances in protein chemistry*, 45, 153-203.
- **Celikel, G., Demirsoy, L., & Demirsoy, H.** (2008). The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 118(2), 115-119.
- **Chabir, N., Ben Brahim, N., Mars, M., & Romdhane, M.** (2009, March). Influence des Ultrasons sur la Qualité et la Quantité des Huiles Essentielles de *Melaleuca armillaris* Cultivée en Tunisie. In *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009* 853 (pp. 277-284.)
- **Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L.** (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(21), 13926-13931.
- **Chang, M. C., Chang, H. H., Wang, T. M., Chan, C. P., Lin, B. R., Yeung, S. Y., ... & Jeng, J. H.** (2014). Antiplatelet effect of catechol is related to inhibition of cyclooxygenase, reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production. *PloS one*, 9(8), e104310.
- **Chapple, I. L., & Matthews, J. B.** (2007). The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*, 43(1), 160-232.
- **Chirisa, E.** (2016). Screening for the effects of selected Zimbabwean plant extracts on enzymes and processes involved in pain and inflammation.
- **Chompoo, J., Upadhyay, A., Kishimoto, W., Makise, T., & Tawata, S.** (2011). Advanced glycation end products inhibitors from *Alpinia zerumbet* rhizomes. *Food chemistry*, 129(3), 709-715.
- **Cicolella, A.** (2008). Les composés organiques volatils (COV): définition, classification et propriétés. *Revue des Maladies Respiratoires*, 25(2), 155-163.
- **Clark, J. L., Zahradka, P., & Taylor, C. G.** (2015). Efficacy of flavonoids in the management of high blood pressure. *Nutrition reviews*, 73(12), 799-822.
- **Clifford, M. N., Copeland, E. L., Bloxside, J. P., & Mitchell, L. A.** (2000). Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica*, 30(3), 317-326.

- **Cohen, M. P.** (2003). Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 419(1), 25-30.
- **Cohen, M. P., Shea, E., Chen, S., & Shearman, C. W.** (2003). Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF- B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor- 1 production in macrophage RAW cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 141(4), 242-249.
- **Cowan, M. M.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- **Crompton, M., Rixon, K. C., & Harding, J. J.** (1985). Aspirin prevents carbamylation of soluble lens proteins and prevents cyanate-induced phase separation opacities in vitro: a possible mechanism by which aspirin could prevent cataract. *Experimental eye research*, 40(2), 297-311.)
- **Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G.** (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- **Daglia, M.** (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- **Daou, C., & Zhang, H.** (2014). Functional and physiological properties of total, soluble, and insoluble dietary fibres derived from defatted rice bran. *Journal of food science and technology*, 51(12), 3878-3885.
- **de Freitas, M. V., Rita de Cássia, M. N., da Costa Huss, J. C., de Souza, T. M. T., Costa, J. O., Firmino, C. B., & Penha-Silva, N.** (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicology in Vitro*, 22(1), 219-224.
- **Deepa, D., Jayakumari, B., & Thomas, S. V.** (2008). Lipid peroxidation in women with epilepsy. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 11(1), 44.
- **Degenhardt, J., Köllner, T. G., & Gershenzon, J.** (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70(15), 1621-1637.
- **Delorenzi, J. C., Attias, M., Gattass, C. R., Andrade, M., Rezende, C., da Cunha Pinto, Â., ... & Saraiva, E. M.** (2001). Antileishmanial activity of an indole alkaloid *Frompeschiera australis*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 45(5), 1349-1354.

- **Devaraj, S., Vega-López, S., Kaul, N., Schönlau, F., Rohdewald, P., & Jialal, I.** (2002). Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids*, 37(10), 931-934.
- **Dharsana, J. N., & Mathew, M.** (2014). Preliminary screening of Anti inflammatory and Antioxidant activity of Morinda umbellata. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 5(8).
- **Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F.** (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.
- **Di Meo, F., Lemaire, V., Cornil, J., Lazzaroni, R., Duroux, J. L., Olivier, Y., & Trouillas, P.** (2013). Free radical scavenging by natural polyphenols: atom versus electron transfer. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(10), 2082-2092).
- **Dib, M. E. A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N., & Tabet, B.** (2013). Antimicrobial activity and phytochemical screening of Arbutus unedo L. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(4), 381-385.
- **Diba, M. A., Paolini, J., Bendahou, M., Varesi, L., Allali, H., Desjobert, J. M., ... & Costa, J.** (2010). Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of Arbutus unedo and in vitro antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. *Natural product communications*, 5(7), 1085-1090.
- **Dinis, T. C., Madeira, V. M., & Almeida, L. M.** (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of biochemistry and biophysics*, 315(1), 161-169.
- **Dixon, R. A., Xie, D. Y., & Sharma, S. B.** (2005). Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research?. *New phytologist*, 165(1), 9-28.
- **Duchnowicz, P., Broncel, M., Podsiadkiewicz, A., & Koter-Michalak, M.** (2012). Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (in vitro study). *European journal of nutrition*, 51(4), 435-443.
- **Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I.** (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences*, 25(5), 417-440.

- **DuPont, M. S., Bennett, R. N., Mellon, F. A., & Williamson, G.** (2002). Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans. *The Journal of nutrition*, *132*(2), 172-175.
- **Duthie, G. G., Pedersen, M. W., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Jenkinson, A. M., McPhail, D. B., & Steele, G. M.** (1998). The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*, *52*(10), 733-736.
- **Dzomba, P., & Muchanyereyi, N.** (2012). Potential Antimicrobial Plant Extract Based Therapeutics from *Temnocalyx obovatus* Roots. *European Journal of Medicinal Plants*, *2*(3), 209-215.
- **Ebner, H F., Darra, E., Mariotto, S., Suzuki, H., & Cavalieri, E.** (2011). Use of STAT1 inhibitors in the treatment of brain I/R injury and neurodegenerative diseases. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, *11*(1), 2-7.
- **El Haouari, M., López, J. J., Mekhfi, H., Rosado, J. A., & Salido, G. M.** (2007). Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *Journal of ethnopharmacology*, *113*(2), 325-331
- **El Jemli, M., Kamal, R., Marmouzi, I., Zerrouki, A., Cherrah, Y., & Alaoui, K.** (2016). Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Advances in pharmacological sciences*, 2016.
- **Emran, T. B., Rahman, M. A., Uddin, M. M. N., Rahman, M. M., Uddin, M. Z., Dash, R., & Layzu, C.** (2015). Effects of organic extracts and their different fractions of five Bangladeshi plants on in vitro thrombolysis. *BMC complementary and alternative medicine*, *15*(1), 1.
- **Enami, S., Sakamoto, Y., & Colussi, A. J.** (2014). Fenton chemistry at aqueous interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(2), 623-628.
- **Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., ... & Messina, M.** (2007). Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31–June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of nutrition*, *137*(3), 718S-737S.

- **Ertabaklar, H., Kivcak, B., Mert, T., & TÖZ, S. Ö.** (2009). In vitro activity of Arbutus unedo leaf extracts against Trichomonas vaginalis trophozoites. *Türkiye parazitoloj derg*, 33, 263-264.
- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C.** (2008). Phenolic composition of Cynara cardunculus L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372-379.
- **Farasat, M., Khavari-Nejad, R. A., Nabavi, S. M. B., & Namjooyan, F.** (2014). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 163-170.
- **Faure, P., Wiernsperger, N., Polge, C., Favier, A., & Halimi, S.** (2008). Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *Clinical Science*, 114(3), 251-256.
- **Ferreira, C., Soares, D. C., do Nascimento, M. T. C., Pinto-da-Silva, L. H., Sarzedas, C. G., Tinoco, L. W., & Saraiva, E. M.** (2014). Resveratrol is active against Leishmania amazonensis: in vitro effect of its association with amphotericin B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(10), 6197-6208.
- **Ferreira, S., Santos, J., Duarte, A., Duarte, A. P., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C.** (2012). Screening of antimicrobial activity of Cistus ladanifer and Arbutus unedo extracts. *Natural product research*, 26(16), 1558-1560.
- **Figge, J., Rossing, T. H., & Fencl, V.** (1991). The role of serum proteins in acid-base equilibria. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 117(6), 453-467.
- **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. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(11), 809-811.
- **Foti, M. C., Daquino, C., & Geraci, C.** (2004). Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• radical in alcoholic solutions. *The Journal of organic chemistry*, 69(7), 2309-2314.
- **Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., & Oteiza, P. I.** (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular aspects of medicine*, 31(6), 435-445.

- **Fu, M. X., Wells-Knecht, K. J., Blackledge, J. A., Lyons, T. J., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W.** (1994). Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose: kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes*, 43(5), 676-683.
- **Gale, M., Carter, V., & Parsons, M.** (1994). Cell cycle-specific induction of an 89 kDa serine/threonine protein kinase activity in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 107(7), 1825-1832.
- **Gao, J., Igarashi, K., & Nukina, M.** (2000). Three new phenylethanoid glycosides from *Caryopteris incana* and their antioxidative activity. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 48(7), 1075-1078.
- **Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D.** (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91.
- **Gaspar, E. M., das Neves, H. J. C., & Noronha, J. P.** (1997). Application of HPLC-PBMS to the identification of unknown components in a triterpenoid fraction of *Arbutus unedo* fruits. *Journal of Separation Science*, 20(8), 417-420.
- **Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A.** (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(1), 29-36.
- **Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., & Curry, S.** (2005). Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of molecular biology*, 353(1), 38-52.
- **Ginsburg, I., Koren, E., Shalish, M., Kanner, J., & Kohen, R.** (2012). Saliva increases the availability of lipophilic polyphenols as antioxidants and enhances their retention in the oral cavity. *Archives of oral biology*, 57(10), 1327-1334.
- **Godinho-Ferreira, P., Azevedo, A., & Rego, F.** (2005). Carta da tipologia florestal de Portugal Continental. *Silva Lusitana*, 13(1), 1-34.
- **Gohil, D. D., & Lele, S. S.** (2014). Insoluble Vegetable Fiber as a Potential Functional Ingredient: Invitro Studies on Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effect. *American Journal of Food Science and Technology*, 2(2), 48-52.
- **Gomes de CF, D., Alegrio, L. V., de Lim, M. E. F., Leon, L. L., & Araujo, C. A.** (2002). Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. *Arzneimittelforschung*, 52(02), 120-124.

- **González-Coloma, A., Reina, M., Sáenz, C., Lacret, R., Ruiz-Mesia, L., Arán, V. J., ... & Martínez-Díaz, R. A.** (2012). Antileishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. *Parasitology research*, 110(4), 1381-1392.
- **Górecka, D., Korczak, J., & Flaczyk, E.** (2003). Adsorption of bile acids and cholesterol by dry grain legume seeds. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 12(1), 69-72.
- **Gramza, A., & Korczak, J.** (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*, 16(8), 351-358.
- **Griffith, J. K., Baker, M. E., Rouch, D. A., Page, M. G., Skurray, R. A., Paulsen, I. T., ... & Henderson, P. J.** (1992). Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Current opinion in cell biology*, 4(4), 684-695.
- **Gugliucci, A., Bastos, D. H. M., Schulze, J., & Souza, M. F. F.** (2009). Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia*, 80(6), 339-344.
- **Gülçin, ., Alici, H. A., & Cesur, M.** (2005). Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(3), 281-285.
- **Gülçin, I., Büyükokuro lu, M. E., Oktay, M., & Küfrevio lu, Ö. .** (2003). Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *Journal of Ethnopharmacology*, 86(1), 51-58.
- **Gülçin, ., Huyut, Z., Elmasta , M., & Aboul-Enein, H. Y.** (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(1), 43-53.
- **Gülçin, ., Topal, F., Sarıkaya, S., Bursal, E., Bilsel, G., & Gören, A. C.** (2011). Polyphenol contents and antioxidant properties of medlar (*Mespilus germanica* L.). *Records of Natural Products*, 5(3).
- **Hadacek, F.** (2002). Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 273-322.
- **Hagerman, A. E., & Butler, L. G.** (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 809-812.

- **Halliwell, B.** (1988). Albumin—an important extracellular antioxidant?. *Biochemical pharmacology*, 37(4), 569-571.
- **Halliwell, B., & Gutteridge, J. M.** (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 280(1), 1-8.
- **Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K.** (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1365-1402.
- **Haouat, A. C., Sqalli, H., Haggoud, A., Ennabili, A., Ibnsouda, S., & Iraqui, M.** (2012). Extra-and intracellular antimycobacterial activity of *Arbutus unedo* L. *African Journal of Microbiology Research*, 6(6), 1283-1290.
- **Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., & Kinoshita, T.** (1998). Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48(1), 125-129.
- **Harish, M., Ahmed, F., & Urooj, A.** (2014). In vitro hypoglycemic effects of *Butea monosperma* Lam. leaves and bark. *Journal of food science and technology*, 51(2), 308-314.
- **Harris, C. S., Cuerrier, A., Lamont, E., Haddad, P. S., Arnason, J. T., Bennett, S. A., & Johns, T.** (2014). Investigating wild berries as a dietary approach to reducing the formation of advanced glycation endproducts: Chemical correlates of in vitro antiglycation activity. *Plant foods for human nutrition*, 69(1), 71-77.
- **Hartmann, T.** (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22), 2831-2846.
- **Hawkins, C. L., & Davies, M. J.** (1998). Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochemical journal*, 332(3), 617-625.
- **Heinonen, M.** (2007). Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics—a Finnish perspective. *Molecular nutrition & food research*, 51(6), 684-691.
- **Heinrich, M.** (2005). Local Food-Nutraceuticals Consortium. (2005). Understanding local Mediterranean diets: a multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacological Research*, 52(4), 353-366.

- **Hennebelle, T., Sahpaz, S., & Bailleul, F.** (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1), 3-6.
- **Hider, R. C., Liu, Z. D., & Khodr, H. H.** (2001). Metal chelation of polyphenols. *Methods in enzymology*, 335, 190-203.
- **Hileman, L. C., Vasey, M. C., & Thomas Parker, V.** (2001). Phylogeny and biogeography of the Arbutoideae (Ericaceae): implications for the Madrean-Tethyan hypothesis. *Systematic Botany*, 26(1), 131-143.
- **Hodek, P., Trefil, P., & Stiborová, M.** (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*, 139(1), 1-21.
- **Hong, J.** (2001). Development of Rat Prostatitis Model by Oral Administration of Isoflavone and Its Characteristics. *Yonsei medical journal*, 42(4), 395-404.
- **Hong, J., Smith, T. J., Ho, C. T., August, D. A., & Yang, C. S.** (2001). Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase-and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochemical pharmacology*, 62(9), 1175-1183.
- **Hossain, S. J., Kato, H., Aoshima, H., Yokoyama, T., Yamada, M., & Hara, Y.** (2002). Polyphenol-induced inhibition of the response of Na⁺/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(18), 5215-5219.
- **Hosseinzadeh, H., Tabassi, S. A. S., Moghadam, N. M., Rashedinia, M., & Mehri, S.** (2012). Antioxidant activity of Pistacia vera fruits, leaves and gum extracts. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 11(3), 879.
- **Hu, M. L.** (2011). Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med J*, 34(5), 449-460.
- **Huang, S. W., Hopia, A., Schwarz, K., Frankel, E. N., & German, J. B.** (1996). Antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 444-452.
- **Ikeda, I., Kobayashi, M., Hamada, T., Tsuda, K., Goto, H., Imaizumi, K., ... & Kakuda, T.** (2003). Heat-epimerized tea catechins rich in gallocatechin gallate and catechin gallate are more effective to inhibit cholesterol absorption than tea catechins

rich in epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7303-7307.

- **Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T.** (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1147(1), 132-136.
- **Im, H. J., & Yoon, K. Y.** (2015). Production and Characterisation of Alcohol-Insoluble Dietary Fibre as a Potential Source for Functional Carbohydrates Produced by Enzymatic Depolymerisation of Buckwheat Hulls. *Czech Journal of Food Science*, 34(5), 449-457.
- **Izzo, A. A.** (1996). PAF and the digestive tract. A review. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 48(11), 1103-1111.
- **Jainul, M. A., Azam, S., Chowdhury, A., Mubarak, R. U., & Faruq, K. O.** (2013). In-vitro thrombolytic and cytotoxic activity of methanolic extract of *flemingia macrophylla* leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(4), 86-88.
- **Jian, L., Xie, L. P., Lee, A. H., & Binns, C. W.** (2004). Protective effect of green tea against prostate cancer: a case-control study in southeast China. *International journal of cancer*, 108(1), 130-135.
- **Joost, H. G., & Thorens, B.** (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Molecular membrane biology*, 18(4), 247-256.
- **Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., & Stevens, P.** (2002). *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*. De Boeck Supérieur.
- **Justicia, J., Oltra, J. E., Barrero, A. F., Guadaño, A., González-Coloma, A., & Cuerva, J. M.** (2005). Total Synthesis of 3-Hydroxydrimanes Mediated by Titanocene (III)–Evaluation of Their Antifeedant Activity. *European journal of organic chemistry*, 2005(4), 712-718.
- **Kajiya, K., Kumazawa, S., & Nakayama, T.** (2001). Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(12), 2638-2643.
- **Kampranis, S. C., Ioannidis, D., Purvis, A., Mahrez, W., Ninga, E., Katerelos, N. A., ... & Goodenough, P. W.** (2007). Rational conversion of substrate and product

specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. *The Plant Cell*, 19(6), 1994-2005.

- **Karthik, K., Kumar, B. R. P., Priya, V. R., Kumar, S. K., & Rathore, R. S. B.** (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(5), 729.
- **Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., & Jain, R.** (2009). Antimalarials from nature. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(9), 3229-3256.
- **Kayser, O., Kiderlen, A. F., & Brun, R.** (2001). In vitro activity of aurones against *Plasmodium falciparum* strains K1 and NF54. *Planta medica*, 67(08), 718-721.
- **Khademvatan, S., Eskandari, A., Saki, J., & Foroutan-Rad, M.** (2016). Cytotoxic activity of *Holothuria leucospilota* extract against *Leishmania infantum* in vitro. *Advances in pharmacological sciences*, 2016.
- **Kiderlen, A. F., Kayser, O., Ferreira, D., & Kolodziej, H.** (2001). Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor α in macrophages in vitro. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(5-6), 444-454.
- **Kilicgun, H., & Altiner, D.** (2010). Correlation between antioxidant effect mechanisms and polyphenol content of *Rosa canina*. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), 238.
- **Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S.** (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, 96(3), 229-245.
- **King, A. M. Y., & Young, G.** (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213-218.
- **Kirschbaum, B.** (2001). Total urine antioxidant capacity. *Clinica Chimica Acta*, 305(1), 167-173.
- **Kivçak, B., Mert, T., Ertabaklar, H., Balcio lu, I. C., & Ozensoy Töz, S.** (2009). In vitro activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. *Turkiye Parazitol Derg*, 33, 114-115.
- **Kolodziej, H., Kayser, O., Kiderlen, A. F., ITO, H., HATANO, T., YOSHIDA, T., & FOO, L. Y.** (2001). Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α release in

the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(9), 1016-1021.

- **Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Bakmaz, M., & Vladimir-Knežević, S.** (2005). Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharmaceutica*, 55(4), 423-430.
- **Kuhnert, N., Dairpoosh, F., Jaiswal, R., Matei, M., Deshpande, S., Golon, A., ... & Hourani, N.** (2011). Hill coefficients of dietary polyphenolic enzyme inhibitors: can beneficial health effects of dietary polyphenols be explained by allosteric enzyme denaturing?. *Journal of chemical biology*, 4(3), 109-116.
- **Kumar, D., Kumar, S., Kohli, S., Arya, R., & Gupta, J.** (2011). Antidiabetic activity of methanolic bark extract of *Albizia odoratissima* Benth. in alloxan induced diabetic albino mice. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(11), 900-903.
- **Kutlu, T., Takim, K., Çeken, B., & Kizil, M.** (2014). DNA damage protecting activity and in vitro antioxidant potential of the methanol extract of Cherry (*Prunus avium* L). *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(19), 715-726.
- **Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., & Carde, J. P.** (1994). Biogénèse des Monoterpènes—II—La chaîne isoprénique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133, 79-99.
- **Lamprecht, M., Hofmann, P., Greilberger, J. F., & Schwaberg, G.** (2009). Increased lipid peroxidation in trained men after 2 weeks of antioxidant supplementation. *International journal of sport nutrition*, 19(4), 385.
- **Landolfi, R., Mower, R. L., & Steiner, M.** (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: structure-activity relations. *Biochemical pharmacology*, 33(9), 1525-1530.
- **Langenheim, J. H.** (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of chemical ecology*, 20(6), 1223-1280.
- **Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. G. C.** (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(3), 213-248.
- **Le, K., Chiu, F., & Ng, K.** (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105(1), 353-363.
- **Leandro, C., & Campino, L.** (2003). Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *International journal of antimicrobial agents*, 22(3), 352-357.

- **Ledesma-Osuna, A. I., Ramos-Clamont, G., & Vázquez-Moreno, L.** (2008). Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochim Pol*, 55(3), 491-497.
- **Lee, S. K., & Lee, B. M.** (1997). Oxidation of erythrocyte protein and lipid, and hemolysis un rabbit red blood cells treated with benzo [a] pyrene or adriamycin. *Journal of toxicology and environmental health*, 51(6), 557-569.
- **Lee, S. K., & Lee, S. R.** (1996). Retarding effect of dietary fibers on the glucose and bile acid movement across a dialysis membrane in vitro. *The Korean Journal of Nutrition* 29(7), 738-746.
- **Leenen, R., Roodenburg, A. J. C., Tijburg, L. B. M., & Wiseman, S. A.** (2000). A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(1), 87.
- **Legssyer, A., Ziyat, A., Mekhfi, H., Bnouham, M., Herrenknecht, C., Roumy, V., ... & Fischmeister, R.** (2004). Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phytotherapy research*, 18(11), 889-894.
- **Leonti, M., Casu, L., Sanna, F., & Bonsignore, L.** (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited?. *Journal of ethnopharmacology*, 121(2), 255-267.
- **Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M.** (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306.
- **Lepock, J. R., Frey, H. E., Bayne, H., & Markus, J.** (1989). Relationship of hyperthermia-induced hemolysis of human erythrocytes to the thermal denaturation of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 980(2), 191-201.
- **Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B.** (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047.
- **Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y.** (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102(3), 771-776.

- **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. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(3), 385-390.
- **Li, J., Luo, Y. W., Wang, Q., Jin, X. X., & Hao, Z. P.** (2016). The Impact of Different Extraction Techniques on Antioxidant Activity of Faba Bean (*Vicia faba* L.). *Advance Journal of Food Science and Technology*, *10*(4), 257-261.
- **Lin, S., Zhang, G., Liao, Y., Pan, J., & Gong, D.** (2015). Dietary Flavonoids as Xanthine Oxidase Inhibitors: Structure–Affinity and Structure–Activity Relationships. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(35), 7784-7794.
- **Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., & del Castillo, M. D.** (1995). Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology and Medicine*, *18*(2), 153-158.
- **Liu, H., Zhang, L., & Lu, S.** (2012). Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, *17*(4), 4281-4291.
- **Liu, Y., & Wang, M. W.** (2008). Botanical drugs: challenges and opportunities: contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. *Life Sciences*, *82*(9), 445-449.
- **López, G., Ros, G., Rincón, F., Periago, M. J., Martínez, M. C., & Ortuno, J.** (1996). Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(9), 2773-2778.
- **López-Marcos, M. C., Bailina, C., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J.** (2015). Effects of various fibre-rich extracts on cholesterol binding capacity during in vitro digestion of pork patties. *Food & function*, *6*(11), 3473-3478.
- **Lorimer, S. D., Perry, N. B., Foster, L. M., Burgess, E. J., Douch, P. G., Hamilton, M. C., ... & McGregor, R. A.** (1996). A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(9), 2842-2845.
- **Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K. V., & Bíró, L.** (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, *47*(1-4), 119-25.

- **Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., & Domingues, F.** (2014). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, 30(1), 69-79.
- **Magadula, J. J., & Erasto, P.** (2009). Bioactive natural products derived from the East African flora. *Natural product reports*, 26(12), 1535-1554.
- **Mahesha, H. G., Singh, S. A., Srinivasan, N., & Rao, A. G.** (2006). A spectroscopic study of the interaction of isoflavones with human serum albumin. *Febs Journal*, 273(3), 451-467.
- **Maleš, Ž., Plazibat, M., BILUŠI VUNDA , V. J. E. R. A., & Žuntar, I.** (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree-*Arbutus unedo* L.(Ericaceae). *Acta pharmaceutica*, 56(2), 245-250.
- **Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., & Pereira, J. A.** (2012). *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 473-478.
- **Manach, C., Morand, C., Texier, O., & Favier, M. L.** (1995). Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *The Journal of nutrition*, 125(7), 1911.
- **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L.** (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- **Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C.** (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 230S-242S.
- **Manson, M. M.** (2003). Cancer prevention—the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends in molecular medicine*, 9(1), 11-18.
- **Mansour, R., Haouas, N., Kahla-Nakbi, A. B., Hammami, S., Mighri, Z., Mhenni, F., & Babba, H.** (2013). The effect of *Vitis vinifera* L. leaves extract on *Leishmania infantum*. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 12(3), 349.
- **Mariotto, S., Ciampa, A. R., de Prati, A. C., Darra, E., Vincenzi, S., Segal, M., ... & Suzuki, H.** (2008). Aqueous extract of *Arbutus unedo* inhibits STAT1 activation in human breast cancer cell line MDA-MB-231 and human fibroblasts through SHP2 activation. *Medicinal Chemistry*, 4(3), 219-228.

- **Mariotto, S., Esposito, E., Di Paola, R., Ciampa, A., Mazzon, E., de Prati, A. C., ... & Suzuki, H.** (2008). Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacological research*, 57(2), 110-124.)
- **Martin, S., & Andriantsitohaina, R.** (2002, December). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. In *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* (Vol. 51, No. 6, pp. 304-315). Elsevier Masson.
- **Martín, V., Fabelo, N., Santpere, G., Puig, B., Marín, R., Ferrer, I., & Díaz, M.** (2010). Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(2), 489-502.
- **Martinez-Cayuela, M.** (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77(3), 147-161.
- **Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., & Matsumoto, K.** (2001). -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. -Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1952-1956.
- **Meddour, R., & Meddour-Sahar, O.** (2015). Medicinal plants and their traditional uses in Kabylia (Tizi Ouzou, Algeria). *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 1(2), 137-151.
- **Mekhfi, H., ElHaouari, M., Bnouham, M., Aziz, M., Ziyat, A., & Legssyer, A.** (2006). Effects of extracts and tannins from *Arbutus unedo* leaves on rat platelet aggregation. *Phytotherapy research*, 20(2), 135-139.
- **Mendes, L., de 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(9), 2285-2291.
- **Mereti, M., Grigoriadou, K., & Nanos, G. D.** (2002). Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Scientia horticultrae*, 93(2), 143-148.
- **Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Draï, J., & Thérond, P.** (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: aspects analytiques. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 66, No. 6, pp. 605-620).
- **Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C., & Antunes, M. D.** (2014). *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules*, 19(10), 15799-15823.

- **Miguel, M. G., Faleiro, M. L., Guerreiro, A. C., & Antunes, M. D.** (2014). Arbutus unedo L.: chemical and biological properties. *Molecules*, *19*(10), 15799-15823.
- **Milane, H.** (2004). *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques* (Doctoral dissertation, Strasbourg 1).
- **Mishra, A. K., Mishra, A., Kehri, H. K., Sharma, B., & Pandey, A. K.** (2009). Inhibitory activity of Indian spice plant Cinnamomum zeylanicum extracts against Alternaria solani and Curvularia lunata, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *8*(1), 9.
- **Moore, S., Calder, K. A., Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A.** (1994). Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free radical research*, *21*(6), 417-425.
- **Nadiah, N. I., Uthumporn, U., Chong, L. H., Azhar, M. E.** (2016). Investigation of the effect tea polyphenol extract to digestion properties. *Australian journal of Basic & Applied Sciences*, *10*(14), 341-346.
- **Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S., & Kakuda, Y.** (2006). Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, *48*(2), 176-181.
- **Newman, D. J., & Cragg, G. M.** (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, *75*(3), 311-335.).
- **Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E., & Marnett, L. J.** (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(33), 31426-31433.
- **Novais, M. H., Santos, I., Mendes, S., & Pinto-Gomes, C.** (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of ethnopharmacology*, *93*(2), 183-195.
- **Oettl, K., & Stauber, R. E.** (2007). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *British journal of pharmacology*, *151*(5), 580-590.
- **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*(7), 1507-1511.

- **Olsen, H., Andersen, A., Nordbø, A., Kongsgaard, U. E., & Børmer, O. P.** (2004). Pharmaceutical-grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro. *BMC clinical pharmacology*, 4(1), 4.
- **Orak, H. H., Yagar, H., Isbilir, S. S., Demirci, A. ., Gümü , T., & Ekinçi, N.** (2011). Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus Unedo L.*) leaf. *Food Science and Biotechnology*, 20(5), 1249-1256.
- **Ou, S., Kwok, K. C., Li, Y., & Fu, L.** (2001). In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(2), 1026-1029.
- **Oyaizu, M.** (1986). Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307-315.
- **Özyürek, M., Bekta o lu, B., Güçlü, K., & Apak, R.** (2009). Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Analytica chimica acta*, 636(1), 42-50.
- **Pabuçuo lu, A., Kıvçak, B., Ba , M., & Mert, T.** (2003). Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves. *Fitoterapia*, 74(6), 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(4), 273-281.
- **Panda, S. K.** (2012). Assay guided comparison for enzymatic and non-enzymatic antioxidant Activities with special reference to medicinal plants. *Antioxid. Enzym*, 14, 382-400.
- **Pavithra, K., & Vadivukkarasi, S.** (2015). Evaluation of free radical scavenging activity of various extracts of leaves from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. *Food Science and Human Wellness*, 4(1), 42-46.
- **Pavlovi , D. R., Brankovi , S., Kova evi , N., Kiti , D., & Veljkovi , S.** (2011). Comparative study of spasmolytic properties, antioxidant activity and phenolic content of *Arbutus unedo* from Montenegro and Greece. *Phytotherapy Research*, 25(5), 749-754.
- **Pawlowska, A. M., De Leo, M., & Braca, A.** (2006). Phenolics of *Arbutus unedo L.*(Ericaceae) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 10234-10238.

- **Peerajit, P., Chiewchan, N., & Devahastin, S.** (2012). Effects of pretreatment methods on health-related functional properties of high dietary fibre powder from lime residues. *Food chemistry*, 132(4), 1891-1898.
- **Perez-Jimenez, J., Hubert, J., Hooper, L., Cassidy, A., Manach, C., Williamson, G., & Scalbert, A.** (2010). Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*, ajcn-29924.
- **Pérez-Victoria, J. M., Chiquero, M. J., Conseil, G., Dayan, G., Di Pietro, A., Barron, D., ... & Gamarro, F.** (1999). Correlation between the affinity of flavonoids binding to the cytosolic site of *Leishmania tropica* multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin. *Biochemistry*, 38(6), 1736-1743.
- **Peterlik, M.** (2008). Role of bile acid secretion in human colorectal cancer. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 158(19-20), 539-541.
- **Philips, A., Philip, S., Arul, V., Padmakeerthiga, B., Renju, V., Santha, S., & Sethupathy, S.** (2010). Free radical scavenging activity of leaf extracts of *Indigofera aspalathoides*—An in vitro analysis. *J Pharm Sci Res*, 2(6), 322-328.
- **Pichersky, E., & Gershenzon, J.** (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 237-243.
- **Pieboji, J. G.** (2007). Caractérisation des beta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales/beta-lactamase characterization and their inhibition by medicinal plants extract. Doctorat en sciences, FS - Département des sciences de la vie, université de Liège.
- **Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., & Jerala, R.** (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and biophysical research communications*, 306(2), 530-536.
- **Pospíšil, P.** (2009). Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1787(10), 1151-1160.
- **Prasad, S., Kashyap, R. S., Deopujari, J. Y., Purohit, H. J., Taori, G. M., & Daginawala, H. F.** (2006). Development of an in vitro model to study clot lysis activity of thrombolytic drugs. *Thrombosis Journal*, 4(1), 14.
- **Preston, C. D., & Hill, M. O.** (1997). The geographical relationships of British and Irish vascular plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 124(1), 1-120.

- **Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M.** (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- **Prior R.L., Wu X. and Schaich K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- **Pulido, R., Hernandez-Garcia, M., & Saura-Calixto, F.** (2003). Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(10), 1275-1282.
- **Rajamanikandan, S., Sindhu, T., Durgapriya, D., Sophia, D., Ragavendran, P., & Gopalakrishnan, V. K.** (2011). Radical scavenging and antioxidant activity of ethanolic extract of *Mollugo nudicaulis* by invitro assays. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45(4), 310-316.
- **Rajbhar, K., Dawda, H., & Mukundan, U.** (2015). Polyphenols: Methods of Extraction. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 5(1).
- **Ramos, S.** (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular nutrition & food research*, 52(5), 507-526.
- **Rao, G. N., Lardis, M. P., & Cotlier, E.** (1985). Acetylation of lens crystallins: a possible mechanism by which aspirin could prevent cataract formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 128(3), 1125-1132.
- **Reddy, V. P., & Beyaz, A.** (2006). Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug discovery today*, 11(13), 646-654.
- **Reguieg, L.** (2011). Using medicinal plants in Algeria. *Am J Food Nutr*, 1(3), 126-127.
- **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.
- **Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B.** (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free radical research*, 22(4), 375-383.
- **Ridoux, O., Di Giorgio, C., Delmas, F., Elias, R., Mshvildadze, V., Dekanosidze, G., ... & Timon-David, P.** (2001). In vitro antileishmanial activity of three saponins

isolated from ivy, -hederin, -hederin and hederacolchiside A1, in association with pentamidine and amphotericin B. *Phytotherapy Research*, 15(4), 298-301.

- **Rizvi, S. I., & Zaid, M. A.** (2001). Insulin-Like Effect Of (-) Epicatechin On Erythrocyte Membrane Acetylcholinesterase Activity In Type 2 Diabetes Mellitus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28(9), 776-778.
- **Rizvi, S. I., Zaid, M. A., Anis, R., & Mishra, N.** (2005). Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32(1-2), 70-75.
- **Roberts, M. F. (Ed.)**. (2013). *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media.
- **Robu, S. I. L. V. I. A., Aprotosoie, A. C., Miron, A., Cioanc , O. A. N. A., St nescu, U. R. S. U. L. A., & H ncianu, M. O. N. I. C. A.** (2012). In vitro antioxidant activity of ethanolic extracts from some Lavandula species cultivated in Romania. *cell*, 60, 3.
- **Rodríguez, J., Di Pierro, D., Gioia, M., Monaco, S., Delgado, R., Coletta, M., & Marini, S.** (2006). Effects of a natural extract from Mangifera indica L, and its active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(9), 1333-1342.
- **Rohn, S., Rawel, H. M., & Kroll, J.** (2004). Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4725-4729.
- **Ruiz-Rodríguez, B. M., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M. C., Cámara, M., Díez-Marqués, C., ... & Tardío, J.** (2011). Valorization of wild strawberry-tree fruits (Arbutus unedo L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, 44(5), 1244-1253.
- **Rutter, Sell, Fraser, Obrenovich, Zito, Starke-Reed, & Monnier.** (2003). Green tea extract suppresses the age-related increase in collagen crosslinking and fluorescent products in C57BL/6 mice. *International journal for vitamin and nutrition research*, 73(6), 453-460.
- **Sairam, S., & Urooj, A.** (2013). Artocarpus altilis-mode of anti-hyperglycemic activity: elucidation by suitable in-vitro and ex-vivo techniques. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(8), 3013.

- **Sakat, S., Juvekar, A. R., & Gambhire, M. N.** (2010). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 146-155.
- **Sakata, N., Moh, A., & Takebayashi, S.** (2002). Contribution of superoxide to reduced antioxidant activity of glycoxidative serum albumin. *Heart and vessels*, 17(1), 22-29.
- **Sánchez-Moreno, C.** (2002). Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems.
- **Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F.** (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- **Sandhar, H. K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., & Sharma, P.** (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 25-41.
- **Sang, S., Shao, X., Bai, N., Lo, C. Y., Yang, C. S., & Ho, C. T.** (2007). Tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate: a new trapping agent of reactive dicarbonyl species. *Chemical research in toxicology*, 20(12), 1862-1870.
- **Sangeetha, N., Aranganathan, S., & Nalini, N.** (2010). Silibinin ameliorates oxidative stress induced aberrant crypt foci and lipid peroxidation in 1, 2 dimethylhydrazine induced rat colon cancer. *Investigational new drugs*, 28(3), 225-233.
- **Sangeethapriya, M., & Siddhuraju, P.** (2014). Health related functional characteristics and antioxidant potential of mucilage (dietary fiber) from *Zizyphus mauritiana* fruits. *Food Science and Human Wellness*, 3(2), 79-88.
- **Sanjust, E., Mocci, G., Zucca, P., & Rescigno, A.** (2008). Mediterranean shrubs as potential antioxidant sources. *Natural Product Research*, 22(8), 689-708.
- **Sanogo, R., Diallo, D., Diarra, S., Ekoumou, C., & Bougoudogo, D.** (2006). Activité antibactérienne et antalgique de deux recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et la cystite au Mali. *Mali Médical*, 21(1), 18-24.
- **Santo, D. E., Galego, L., Gonçalves, T., & Quintas, C.** (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47(1), 45-50.

- **Santos, S. A., Pinto, P. C., Silvestre, A. J., & Neto, C. P.** (2010). Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products*, *31*(3), 521-526.
- **Saraswat, M., Reddy, P. Y., Muthenna, P., & Reddy, G. B.** (2008). Prevention of non-enzymic glycation of proteins by dietary agents: prospects for alleviating diabetic complications. *British journal of nutrition*, *101*(11), 1714-1721.
- **Sarni-Manchado, V. Cheynier,** *Les polyphénols en agroalimentaire*, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 2006, 398 p. (ISBN 2-7430-0805-9)
- **Sassi, A. B., Harzallah-Skhiri, F., & Aouni, M.** (2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharmaceutical biology*, *45*(5), 421-428.
- **Satterfield, M., & Brodbelt, J. S.** (2000). Enhanced detection of flavonoids by metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, *72*(24), 5898-5906.
- **Sawadogo, W. R., Maciuk, A., Banzouzi, J. T., Champy, P., Figadere, B., Guissou, I. P., & Nacoulma, O. G.** (2012). Mutagenic effect, antioxidant and anticancer activities of six medicinal plants from Burkina Faso. *Natural product research*, *26*(6), 575-579.
- **Scalbert, A.** (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, *30*(12), 3875-3883.
- **Scazzocchio, F., D'auria, F. D., Alessandrini, D., & Pantanella, F.** (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, *161*(4), 327-333.
- **Scherrer, R., & Gerhardt, P.** (1971). Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology*, *107*(3), 718-735.
- **Schneeman, B. O.** (1998). Dietary fiber and gastrointestinal function. *Nutrition Research*, *18*(4), 625-632.
- **Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A. N.** (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, *91*(1), 21-40.
- **Serteser, A., Kargio lu, M., Gök, V., Ba ci, Y., Özcan, M. M., & Arslan, D.** (2009). Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey. *Grasas Y Aceites*, *60*(2), 147-154.

- **Sheth, S., Jajoo, S., Kaur, T., Mukherjea, D., Sheehan, K., Rybak, L. P., & Ramkumar, V.** (2012). Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway. *PloS one*, 7(12), e51655.)
- **Shi, Y., & Williamson, G.** (2016). Quercetin lowers plasma uric acid in pre-hyperuricaemic males: a randomised, double-blinded, placebo-controlled, cross-over trial. *British Journal of Nutrition*, 115(05), 800-806.
- **Shinde, U. A., Phadke, A. S., Nair, A. M., Mungantiwar, A. A., Dikshit, V. J., & Saraf, M. N.** (1999). Membrane stabilizing activity—a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia*, 70(3), 251-257.
- **Siasos, G., Tousoulis, D., Tsigkou, V., Kokkou, E., Oikonomou, E., Vavuranakis, M., ... & Stefanadis, C.** (2013). Flavonoids in atherosclerosis: an overview of their mechanisms of action. *Current medicinal chemistry*, 20(21), 2641-2660.
- **Sindhu, T., Rajamanikandan, S., & Srinivasan, P.** (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activities of methanol extract of *kyllinga nemoralis*. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 76(2), 170.
- **Smit, A. J., Hartog, J. W., Voors, A. A., & Van Veldhuisen, D. J.** (2008). Advanced glycation endproducts in chronic heart failure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126(1), 225-230.
- **Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V.** (2012). Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(15), 3966-3972.
- **Sobhani, I., Cherifi, Y., & André, B. A. D. O.** (1995). Platelet-activating factor (PAF): propriétés biologiques et implications. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, 2(2), 165-72.
- **Sólyom, K., Solá, R., Cocero, M. J., & Mato, R. B.** (2014). Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food chemistry*, 159, 361-366.
- **Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J.** (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. **94**: 219-243.
- **Spiteller, G.** (2006). Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(3), 362-387.

- **Stalikas, C. D.** (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.
- **Stöckigt, J., Sheludko, Y., Unger, M., Gerasimenko, I., Warzecha, H., & Stöckigt, D.** (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A*, 967(1), 85-113.
- **Sunil, V. R., Laumbach, R. J., Patel, K. J., Turpin, B. J., Lim, H. J., Kipen, H. M., ... & Laskin, D. L.** (2007). Pulmonary effects of inhaled limonene ozone reaction products in elderly rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 222(2), 211-220.
- **Surh, Y. J.** (2008). NF- B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 17(S1), 269-272.
- **Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M., & Villena, F.** (2007). Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 130-135.
- **Takada, H., Kokubo, K., Matsubayashi, K., & Oshima, T.** (2006). Antioxidant activity of supramolecular water-soluble fullerenes evaluated by β -carotene bleaching assay. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(12), 3088-3093.
- **Tan, N., Kaloga, M., Radtke, O. A., Kiderlen, A. F., Öksüz, S., Ulubelen, A., & Kolodziej, H.** (2002). Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*, 61(8), 881-884.
- **Tapiero, H., Tew, K. D., Ba, G. N., & Mathe, G.** (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(4), 200-207.
- **Tardío, J., Pascual, H., Morales, R.** (2002). *Alimentos silvestres de Madrid: Guía de plantas y setas de uso alimentario tradicional en la Comunidad de Madrid*. Ediciones La Librería. Madrid.
- **Tardío, J., Pardo-de-Santayana, M., & Morales, R.** (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(1), 27-71.
- **Tavares, L., Fortalezas, S., Carrilho, C., McDougall, G. J., Stewart, D., Ferreira, R. B., & Santos, C. N.** (2010). Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. *Journal of Berry Research*, 1(1), 3-12.

- **Teissedre, P. I.** (1998). Effets physiologiques possibles d'une consommation modérée de vin pour diverses pathologies chroniques de l'homme: athérosclérose, diabète, hypertension, cancer. *cah. nutr. diét*, 33(3), 182-187.
- **Teissedre, P. L.** (1998). Effets physiologiques possibles d'une consommation modérée de vin pour diverses pathologies chroniques de l'homme: athérosclérose, diabète, hypertension, cancer. *Cah. Nutr. Diét*, 33(3), 182-187.
- **Telepova, M. N., Budantzev, A. L., & Shavarda, A. L.** (1992). Etude comparative de la sécrétion des terpènes par les éléments glandulaires foliaires chez différentes espèces du genre *Dracocephalum* L.(Labiatae). *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques*, 139(3), 247-264.
- **Tian, Q. L., Liao, S. H., Lu, P., & Liu, L. J.** (2006). Spectroscopic study on the interaction of Al³⁺ with flavonoids and BSA. *Chinese Journal of Chemistry*, 24(10), 1388-1390.
- **Tippayakul, C., Pongsamart, S., & Suksoptip, M.** (2005). Lipid entrapment property of polysaccharide gel (PG) extracted from fruit-hulls of durian (*Durio zibethinus* Murr. Cv. Mon-Thong). *Songklanakarin J Sci Technol*, 27(2), 291-300.
- **Toda, M., Okubo, S., Hiyoshi, R., & Shimamura, T.** (1989). The bactericidal activity of tea and coffee. *Letters in applied microbiology*, 8(4), 123-125.
- **Torres, J. A., Valle, F., Pinto, C., García-Fuentes, A., Salazar, C., & Cano, E.** (2002). *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula mountains. *Plant Ecology*, 160(2), 207-223.
- **Truong, N. H., Lee, S., & Shim, S. M.** (2016). Screening bioactive components affecting the capacity of bile acid binding and pancreatic lipase inhibitory activity. *Applied Biological Chemistry*, 59(3), 475-479.
- **Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M., & Niki, E.** (1995). Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 323(1), 137-147.
- **Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, A. T., Remyaraju, A., Subhadradevi, V., & Ravi, T. K.** (2009). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of ethnopharmacology*, 124(3), 646-648.

- **Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A.** (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.
- **Van Campenhout, A., Van Campenhout, C., Lagrou, A. R., Moorkens, G., De Block, C., & Manuel-y-Keenoy, B.** (2006). Iron-binding antioxidant capacity is impaired in diabetes mellitus. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(10), 1749-1755.
- **Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., & Spencer, J. P.** (2010). Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106-1131.
- **Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Agosin, E., & Pérez-Correa, J. R.** (2012). Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(44), 10920-10929.
- **Vinson, J. A., Proch, J., & Bose, P.** (2001). Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. *Methods in Enzymology*, 335, 103-114.
- **Vissers, M. C., Stern, A., Kuypers, F., Van Den Berg, J., & Winterbourn, C. C.** (1994). Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 703-712.
- **Vlassara, H., & Palace, M. R.** (2002). Diabetes and advanced glycation endproducts. *Journal of internal medicine*, 251(2), 87-101.)
- **Wang, L., & Weller, C. L.** (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- **Wang, T. T., Hudson, T. S., Wang, T. C., Remsberg, C. M., Davies, N. M., Takahashi, Y., ... & Hursting, S. D.** (2008). Differential effects of resveratrol on androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, 29(10), 2001-2010.
- **Waris, G., & Ahsan, H.** (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of carcinogenesis*, 5(1), 14.
- **Wautier, J. L., & Guillausseau, P. J.** (1998). Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease. *Vascular Medicine*, 3(2), 131-137.

- **Wink, M.** (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 75(2), 225-233.
- **Wu, Y., He, L., Zhang, L., Chen, J., Yi, Z., Zhang, J., ... & Pang, X.** (2011). Anacardic acid (6-pentadecylsalicylic acid) inhibits tumor angiogenesis by targeting Src/FAK/Rho GTPases signaling pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 339(2), 403-411.
- **Yadav, Y. C., Srivastava, D. N., Saini, V., Singhal, S., Seth, A. K., & Kumar, S.** (2011). In-vitro antioxidant activity of methanolic extraction of Ficus Benghalensis L. latex. *Pharmacologyonline*, 1, 140-148.
- **Yang, T. T., & Koo, M. W.** (1999). Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life sciences*, 66(5), 411-423.
- **Yang, Y., Wolfram, J., Boom, K., Fang, X., Shen, H., & Ferrari, M.** (2013). Hesperetin impairs glucose uptake and inhibits proliferation of breast cancer cells. *Cell biochemistry and function*, 31(5), 374-379.
- **Yoo, S. H., Lee, J. S., Park, S. Y., Kim, Y. S., Chang, P. S., & Lee, H. G.** (2005). Effects of selective oxidation of chitosan on physical and biological properties. *International journal of biological macromolecules*, 35(1), 27-31.
- **Young, J. F., Nielsen, S. E., Haraldsdóttir, J., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P., ... & Dragsted, L. O.** (1999). Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *The American journal of clinical nutrition*, 69(1), 87-94.
- **Yuanita, L., & Sanjaya, I. G. M.** (2011). The binding of cholic acid by hemicellulose and pectin of Yard-Long Bean [*Vigna sesquipedalis* (L.) Fruhw]. *Journal of Food Science and Engineering*, 1(5), 348.
- **Zavodnik, I. B., Lapshina, E. A., Zavodnik, L. B., Bartosz, G., Soszynski, M., & Bryszewska, M.** (2001). Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(4), 363-369.
- **Zavodnik, I. B., Lapshina, E. A., Zavodnik, L. B., Soszynski, M., Bartosz, G., & Bryszewska, M.** (2002). Hypochlorous acid-induced oxidative damage of human red blood cells: effects of tert-butyl hydroperoxide and nitrite on the HOCl reaction with erythrocytes. *Bioelectrochemistry*, 58(2), 127-135.

- **Zenk, M. H., & Juenger, M.** (2007). Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68(22), 2757-2772.
- **Zhai, L., Blom, J., Chen, M., Christensen, S. B., & Kharazmi, A.** (1995). The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(12), 2742-2748.
- **Zhang, H. Y., & Ji, H. F.** (2006). How vitamin E scavenges DPPH radicals in polar protic media. *New journal of chemistry*, 30(4), 503-504.
- **Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L., & Sun, X.** (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 C. *Meat science*, 81(4), 686-692.
- **Zhang, J., Dhakal, I. B., Greene, G., Lang, N. P., & Kadlubar, F. F.** (2010 b). Polymorphisms in hOGG1 and XRCC1 and risk of prostate cancer: effects modified by plasma antioxidants. *Urology*, 75(4), 779-785.
- **Zhang, J., Dhakal, I. B., Lang, N. P., & Kadlubar, F. F.** (2010 a). Polymorphisms in inflammatory genes, plasma antioxidants, and prostate cancer risk. *Cancer Causes & Control*, 21(9), 1437-1444.
- **Zhao, G. R., Xiang, Z. J., Ye, T. X., Yuan, Y. J., & Guo, Z. X.** (2006). Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food chemistry*, 99(4), 767-774.
- **Ziyyat, A., & Boussairi, E. H.** (1998). Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. *Phytotherapy Research*, 12(2), 110-113.
- **Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., & Benjelloun, W.** (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of ethnopharmacology*, 58(1), 45-54.
- **Zou, D., & Xie, A.** (2013). Influence of polyphenol-plasma protein interaction on the antioxidant properties of polyphenols. *Current drug metabolism*, 14(4), 451-455.

Annexes

Annexe I : Milieux de culture**• Milieu NNN (Novy-McNeal-Nicolle) :**

Bacto-agar-Difco.....	10g
NaCl.....	06g
Eau distillée.....	1000g
Sang de lapin.....	1 ml/tube

- Préparation de la gélose :

- mettre le chlorure de sodium (NaCl) dans l'eau froide et chauffer sur un agitateur magnétique.

Quand l'eau frémit, ajouter le Bacto-agar et remuer avec un agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète,

- laisser bouillir 5 minutes,

- répartir en tubes à vis à raison de 8 ml de gélose par tube.

- autoclaver à 120° pendant 20 minutes.

- conserver les tubes à + 4°C,

- prélever par ponction cardiaque du sang de lapin sur tube au citrate de sodium (10%) et 250 000 U de pénicilline,

- mélanger le sang de lapin et la gélose :

- placer les tubes de gélose dans un bain-marie et chauffer pour faire fondre la gélose,

- laisser refroidir jusqu'à 45°C et ajouter 1 ml de sang par tube,

- agiter sans faire de bulles,

- incliner sur un portoir et laisser refroidir

• Milieu RPMI 1640

RPMI 1640.....	16.40g
L-Glutamine.....	0.30g
Streptomycine.....	50000U
Sérum de veau fœtal.....	10%
Eau distillée.....	1000ml

• Gélose Mueller-Hinton

Hydrolysate acide de caséine.....	17.50g
Extrait de viande.....	2.00g
Amidon.....	1.50g

Agar	17.00g
Eau distillée.....	1000ml

- **Bouillon cœur-cervelle**

Extrait cœur cervelle :.....	17,5g
Peptone pancréatique de gélatine :	10,0g
Protéose peptone :.....	10,0g
Glucose :.....	2,0g
Phosphate disodique :.....	2,5g
Chlorure de sodium :.....	5,0g
Eau distillée.....	1000ml

Annexe II : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

Solutions :

Solution d'acrylamide (A) :

- Acrylamide	36 g
- Bisacrylamide.....	1g
- Eau distillée.....	100 ml

Tampon de gel de séparation (S) :

- Tris.....	18,15 g
- Eau distillée.....	100 ml

Ajuster à pH 8,8 avec HCl 4N

Tampon de gel de concentration (C)

- Tris.....	6g
- Eau distillée.....	100 ml

Ajuster à pH 6,8 avec du HCl 4N

Tampon d'électrode

- Tris	1,2 g
- Glycine.....	5,76 g
- SDS.....	0,2 g
- Eau distillée.....	200 µl

Ajuster à pH 8,3 avec du Tris

Tampon d'échantillon

- Solution (C)500 µl
- Eau distillée.....250 µl
- SDS (10%).....250 µl
- 2-mercaptoéthanol.....50 µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon, chauffer à 100°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide.

Ajouter 200 µl d'une solution de Glycérol 50% (V/V) et quelques grains de bleu de bromophénol.

Solution de fixation

- TCA.....12g
- Eau distillée (qsp).....100 ml

Solution de coloration

- Bleu de coomassie R250.....0,5 g
- TCA.....4 g
- Méthanol.....100 ml
- Eau distillée.....100 ml

Solution de décoloration

- Acide acétique37,5 ml
- Eau distillée.....312,5 ml
- Méthanol.....150 ml

Solution de persulfate d'ammonium

- Persulfate d'ammonium.....0,1 g
- Eau distillée (qsp).....1 ml

Electrophorèse**Préparation du gel de séparation T = 17% et 2,7%**

- Solution (A).....4,6 ml
- Solution (S).....2,51 ml
- Eau distillée.....2,73 ml

Dégazer le mélange pendant 2 mn maximum

- SDS (10%).....100 μ l
- TEMED.....13 μ l
- Persulfate d'ammonium 10%.....75 μ l

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque

Préparation du gel de concentration : T = 4,8% et C = 2,7%

- Solution (A).....1,3 ml
- Solution (C).....2,5 ml
- Eau distillée.....5,8 ml

Dégazer le mélange quelques secondes

- SDS 10%.....100 μ l
- TEMED.....20 μ l
- Persulfate d'ammonium à 10%.....10 μ l

Couler immédiatement sur le gel de séparation puis introduire le peigne

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 μ l

Mise sous tension : 20 mA, 25 V

Fixation : 45 mn dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration

Annexe III : Tampon phosphate

- **Tampon phosphate 0.2 M pH 6.6**

Solution A

- NaH₂PO₄2.40g
- Eau distillée.....100ml

Solution B

- NaH₂PO₄.....2.84g
- Eau distillée.....100ml

Préparation de la solution tampon :

Mélanger 62.5 ml de la solution A avec 37.5 ml de la solution B.

HOSTED BY



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtbOriginal article <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.09.002>Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extractIdir Moualek^{*}, Ghenima Iratni Aiche, Nadjet Mestar Guechaoui, Souad Lahcene, Karim Houali

Laboratory Analytical Biochemistry & Biotechnology Research (LABAB), Faculty of Biological Sciences and Agricultural Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi-Ouzou, Tizi Ouzou, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 Mar 2016

Received in revised form 4 Apr, 2nd

revised form 9 Apr 2016

Accepted 10 Jul 2016

Available online 20 Sep 2016

Keywords:

Arbutus unedo

Antioxidant

Anti-inflammatory

Anti-hemolytic activity

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extract of *Arbutus unedo* (*A. unedo*) leaves.**Methods:** In this context, the *in vitro* antioxidant activity was demonstrated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, hydroxyl radical and H₂O₂ radical scavenging, ferrous ion chelating, ferric reducing power, total antioxidant capacity and by the protection against peroxidation of β -carotene-linoleic acid in emulsion. The anti-inflammatory activity was evaluated first by studying the membrane of human red blood cells against different hypotonic concentrations of NaCl and against heat, inhibiting the denaturation of albumin.**Results:** Total phenolic and flavonoid content were found respectively [(207.84 \pm 15.03) mg gallic acid equivalent/g, and (13.070 \pm 0.096) mg quercetin equivalent/g]. The extract displayed significant scavenging activity of some radicals such as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl [IC₅₀ at (7.956 \pm 0.278) μ g/mL], \cdot OH [IC₅₀ = (1015.74 \pm 46.35 μ g/mL)], H₂O₂ [IC₅₀ = (114.77 \pm 16.86) μ g/mL] and showed a good antioxidant activity through ferrous ion chelating activity [IC₅₀ = (1014.30 \pm 36.21) μ g/mL], ferric reducing power [IC₅₀ = (156.55 \pm 17.40) μ g/mL], total antioxidant capacity [IC₅₀ = (461.67 \pm 4.16) μ g/mL] and β -carotene-linoleic acid protection against peroxidation [I % = (87.04 \pm 1.21)% at 1 000 μ g/mL].**Conclusions:** *A. unedo* showed *in vitro* anti-inflammatory activity by inhibiting the heat induced albumin denaturation and red blood cells membrane stabilization. Our results show that aqueous leaf extract of *A. unedo* has good antioxidant activity and interesting anti-inflammatory properties. *A. unedo* aqueous extract can be used to prevent oxidative and inflammatory processes.

1. Introduction

Medicinal plants are considered as an important source of new molecules with high antioxidant potential. Polyphenols,

commonly referred to as antioxidant compounds, play a major role in safeguarding health, and a protection against diseases like cancer, has recently been shown [1].

Free radicals are generated by various exogenous chemicals and several endogenous metabolic processes oxidize the biomolecules leading to cell death and tissue damage. The organism must keep free radicals at relatively low concentrations using various defense systems and antioxidant molecules such as glutathione [2].

Poorly absorbed and extensively metabolized polyphenols cannot act a direct antioxidant activity, but they have the ability to interact with target proteins to regulate various cellular and molecular processes, giving them biological activity [3].

Drug that plays a role in the stabilization of erythrocyte membrane against osmotic lysis and heat indicates their potential to maintain the integrity of biological membrane. Knowing that erythrocyte membrane resembles to lysosomal membrane, the stabilization of erythrocyte can be extrapolated to the stabilization of lysosomal membrane.

^{*}Corresponding author: Idir Moualek, Laboratory Analytical Biochemistry & Biotechnology Research (LABAB), Faculty of Biological Sciences and Agricultural Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi-Ouzou, Tizi Ouzou, Algeria.

Tel: +213 775595914

E-mail: moualek_idir@yahoo.fr

The study protocol was performed according to the Helsinki declaration and approved by Scientific Committee of the Faculty of Biology (CSFB). Informed written consent was obtained from Hospital Department of Hematology (University Hospital Nedir Mohamed of Tizi-Ouzou).

Foundation Project: Supported by University Hospital Nedir Mohamed of Tizi-Ouzou (Grant No. cnp-um/8819-136/2014) and Laboratory Analytical Biochemistry & Biotechnology Research (LABAB), Faculty of Biological Sciences and Agricultural Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi-Ouzou, Algeria (Grant No. bn-001375-14-993).

Peer review under responsibility of Hainan Medical University. The journal implements double-blind peer review practiced by specially invited international editorial board members.

Arbutus unedo L. (Ericaceae family) (*A. unedo*), commonly called strawberry tree, is an evergreen shrub endemic to Mediterranean region [4]. It is widely used in traditional medicine, and nowadays many of its virtues have been scientifically proven as antioxidant, antihypertensive, anti-hyperglycemic and anti-inflammatory [5–7].

The objective of this work is to deepen the knowledge of antioxidant and anti-inflammatory capacities of *A. unedo* leaves.

2. Materials and methods

2.1. Plant collection

A. unedo leaves were collected in mid-December 2014 from Tizi-Ouzou, Algeria. The plant was identified by Doctor Mahmoud Laribi, botanist at Mouloud Mammeri University of Tizi-Ouzou department of vegetal biology, where a voucher specimen was deposited (FSBSA/MK/2105).

The sample was dried and then ground to obtain a powder that was stored at room temperature and in the dark until extraction.

2.2. Extract preparation

Twenty grams of powder were dissolved in 200 mL of distilled water. After 24 h of maceration at room temperature, the filtrate was lyophilized.

2.3. Determination of total phenolic content

The concentration of phenolic compounds in plant extract was determined using the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method [8].

The reaction mixture was prepared by mixing 200 μ L of extract (40 μ g/mL) with 1 mL of Folin–Ciocalteu reagent (diluted ten times) and 800 μ L of sodium carbonate (75 mg/mL). The mixture was incubated for 45 min at room temperature and the absorbance was measured against a blank at 760 nm.

The same procedure was repeated for the standard solution of gallic acid and the calibration curve was constructed. The results are expressed in mg of gallic acid equivalent per gram of extract.

2.4. Determination of total flavonoid content

The total content of flavonoids in leaves extract was determined using the aluminum chloride spectrophotometric assay [9,10]. The plant extract (1 mL) was mixed with the same volume of a methanolic solution containing 2% of aluminum trichloride. After incubation for 10 min, the absorbance of the reaction mixture was measured at 430 nm against a methanol blank.

A standard curve of quercetin was drawn and the results were expressed as mg of quercetin equivalent per gram of extract.

2.5. Determination of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals scavenging activity

The free radical scavenging activity of the extract was measured using the stable free radical DPPH test according to the method described before [11,12]. A total of 250 μ L of 0.8 mmol/L DPPH in ethanol was mixed with 3.75 mL of the extract. The reaction was carried out in triplicate and the

absorbance was measured at 517 nm after 30 min in dark. L-Ascorbic acid was used as reference standard.

The percent of scavenging activity was calculated using the following equation.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

where, Ac stands for the absorbance of the control and As stands for absorbance of the sample.

2.6. β -Carotene bleaching assay

Antioxidant activity of the extract of leaves of the strawberry tree and level of butylated hydroxytoluene (BHT) were measured according to the published method [13,14]. The emulsion mixture was prepared in 50 mL round-bottom flask containing 1 mL of chloroform (high performance liquid chromatography grade), 0.5 mg β -carotene, 25 μ L linoleic acid and 200 mg of Tween 40. Chloroform was completely evaporated using a vacuum evaporator at 40 °C for 10 min.

After evaporation, the mixture was immediately diluted in 100 mL of distilled water saturated with oxygen. The ethanolic stock solution of the extract (350 μ L, concentrations were 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 mg/mL) was mixed with 2.5 mL of emulsion. The same procedure was repeated with positive control BHT.

Absorbance of the mixtures was measured at 470 nm immediately after their preparation ($t = 0$ min) and at incubation time $t = 120$ min against the blank.

The percentage of inhibition was calculated with the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(Aa_{120} - Ac_{120}) / (Ac_0 - Ac_{120})] \times 100$$

where, Aa_{120} is the absorbance of the antioxidant at $t = 120$ min, Ac_{120} is the absorbance of the control at $t = 120$ min and Ac_0 is the absorbance of the control at $t = 0$ min.

2.7. Hydroxyl radical scavenging assay

Scavenging activity of hydroxyl radical of the extract was measured according to the method of Rajamanikandan *et al.* [15]. Three milliliters of the final reaction solution consisted of aliquots (500 μ L) of various concentrations of the extract, 1 mL $FeSO_4$ (1.5 mmol/L), 0.7 mL hydrogen peroxide (6 mmol/L) and 0.3 mL sodium salicylate (20 mmol/L). The reaction mixture was incubated for 1 h at 37 °C. L-Ascorbic acid was used as the standard.

The color development was measured at 560 nm against a blank.

2.8. Hydrogen peroxide radical scavenging activity

The scavenging ability of the water extract of *A. unedo* on hydrogen peroxide was determined according to the method of Serteser *et al.* [16]. A solution of hydrogen peroxide (40 mmol/L) was prepared in phosphate buffer (pH 7.4). The extract in distilled water (3.4 mL) was added to a hydrogen peroxide solution (0.6 mL, 40 mmol/L). Absorbance of hydrogen peroxide at 230 nm was measured 10 min later against a blank solution containing the phosphate buffer without hydrogen peroxide.

The percentage of hydrogen peroxide scavenging by the extract and standard (L-ascorbic acid) was calculated using the following equation:

$$\text{Scavenged H}_2\text{O}_2 (\%) = (1 - \text{As}/\text{Ac}) \times 100$$

where, Ac is the absorbance of the control (without the extract) and As is absorbance in the presence of the extract. The experiment was repeated in triplicate.

2.9. Ferrous ion chelating activity

Ferrous ion chelating activity was determined by inhibition of the formation of iron(II)–ferrozine complex, following the previous published method [17,18]. Briefly, 100 μL of 0.6 mmol/L FeCl_2 was added to 500 μL of different concentrations of the extract or ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (positive control). The reaction mixture was adjusted to a final volume of 1.5 mL with methanol, and then 100 μL of 5 mmol/L ferrozine solution were added.

The mixture was shaken vigorously and left to stand at room temperature for 5 min. Absorbance was determined at 562 nm and percent of chelation was calculated using the following equation:

$$\text{Chelation } (\%) = (\text{A}_{\text{sample}}/\text{A}_{\text{control}}) \times 100$$

where, A_{sample} is the absorbance of the sample and $\text{A}_{\text{control}}$ is the absorbance of the control.

2.10. Ferric reducing power assay

Reducing power was determined by the method described by Oyaizu and Hazra *et al.* [19,20]. Different concentrations of the extract were mixed with 1.25 mL of 0.2 mol/L, pH 6.6 sodium phosphate buffer and 1.25 mL of potassium ferricyanide (1%). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min.

After incubation, the reaction mixture was acidified with 1.25 mL of trichloroacetic acid (10%) and centrifuged at 3 000 r/min for 10 min. Finally, 0.5 mL of freshly prepared FeCl_3 (0.1%) was added to this solution, and the absorbance was measured at 700 nm. Ascorbic acid at various concentrations was used as standard.

2.11. Total antioxidant capacity

Total antioxidant capacity was estimated by phosphomolybdenum assay [21,22]. The tubes containing the extract and reagent solution (0.6 mol/L sulfuric acid, 28 mmol/L sodium phosphate and 4 mmol/L ammonium molybdate) were incubated at 95 °C for 90 min. Then the solution was cooled to room temperature and the absorbance was read at 695 nm. Ascorbic acid was used as standard.

2.12. Antihemolytic activity

2.12.1. Red blood cell suspension

Blood was obtained by venipuncture from healthy volunteers collected in heparinized tubes and centrifuged at 2 000 r/min for 10 min at 4 °C. After removing the plasma, red blood cells (RBCs) were washed for three successive times using phosphate

buffer saline (PBS) (0.9% NaCl). The study protocol was performed according to the Helsinki declaration and approved by Scientific Committee of the Faculty of Biology (CSFB). Informed written consent was obtained from Hospital Department of Hematology (University Hospital Nedir Mohamed of Tizi-Ouzou).

2.12.2. Hypotonic solution induced hemolysis

Membrane stabilizing activity of the extract was assessed using hypotonic solution induced hemolysis, and the method was described by de Freitas *et al.* [23]. In hypotonic solution, the test sample consisted of washed stock erythrocyte (RBC) suspension (40 μL) with 1 mL of hypotonic solution (0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9% NaCl) in sodium PBS (pH 7.4) containing either of the different concentrations of aqueous extract.

The mixture was incubated for 30 min at 37 °C under gentle stirring, centrifuged for 10 min at 2 000 r/min and the absorbance of the supernate was measured at 540 nm.

$$\text{Inhibition of hemolysis } (\%) = [(\text{OD}_1 - \text{OD}_2)/\text{OD}_1] \times 100$$

where, OD1 is the optical density of hypotonic-buffered saline solution alone (control) and OD2 is the optical density of test sample in hypotonic solution.

2.12.3. Heat induced hemolysis

Different concentrations of the extract ($\mu\text{g}/\text{mL}$) or aspirin dissolved in isotonic PBS (pH 7.4) was mixed with 1 mL of 2% RBCs suspension. The reaction mixture was incubated in a water bath at 56 °C for 30 min. After incubation, the tubes were cooled under running tap water, then centrifuged at 2 000 r/min for 10 min and the absorbance of the supernatants was estimated at 560 nm [24].

The percentage of protection against heat induced hemolysis was calculated by using the following equation:

$$\text{Production } (\%) = (1 - \text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

2.12.4. Oxidant induced hemolysis

One milliliter of RBC suspension (5%) in PBS (pH 7.4) was incubated for 15 min at 37 °C with 1 mL of the extract at different concentrations. After pre-incubation, the mixture was centrifuged at 2 000 r/min for 10 min at 4 °C, the supernatant was removed and packed RBCs were resuspended with 0.5 mmol/L HOCl in PBS. After this, the incubation was performed as previously described. The absorbance was determined at 540 nm [25,26].

$$\text{Production } (\%) = (1 - \text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

2.12.5. Inhibition of albumin denaturation

A solution of 0.2% (w/v) of egg albumin was prepared in a PBS (pH 6.4). A volume of 50 μL of the extract or standard at different concentrations was added to 5 mL of this stock solution.

The test tubes were heated at 72 °C for 5 min and then cooled. The absorbance of these solutions was determined at 660 nm [27].

3. Results

3.1. Phenolic content

Many studies report that phenolic compounds play an important role in human health due to their antioxidant activity.

The total phenols of *A. unedo* aqueous extract [(207.84 ± 15.03) mg gallic acid equivalent/g of extract] was calculated according to the equation $y = 0.006x + 0.027$ ($R^2 = 0.990$).

3.2. Flavonoid content

After construction of the calibration curve [$y = 0.022x + 0.182$ ($R^2 = 0.994$)], collected data clearly showed a good amount of flavonoid content in the aqueous extract [(13.070 ± 0.096) mg quercetin equivalent/g of extract].

3.3. DPPH scavenging activity

The DPPH radical scavenging activity was recorded in terms of inhibition percent as shown in Figure 1.

The parameter used to compare the radical scavenging activity of the extract and ascorbic acid is IC_{50} value, defined as the concentration of antioxidant required for 50% scavenging of DPPH radicals. The IC_{50} value for ascorbic acid was (2.359 ± 0.091) µg/mL, which was comparatively lower than the IC_{50} [(7.956 ± 0.278) µg/mL] of aqueous extract.

3.4. β-Carotene bleaching

In the evaluation of the antioxidant activity, β-carotene bleaching method was used to measure the ability of the extract to inhibit lipid peroxidation. The antioxidant activity was expressed as percent inhibition. Figure 2 shows that the antioxidant activity increases with the increasing concentrations of the extract used.

Almost similar results were obtained for BHT [% Inhibition = 96.88 ± 0.34 (positive control)] and *A. unedo* [% Inhibition = 87.04 ± 1.21] at 1 000 µg/mL, which indicates a high potential antioxidant activity of the extract.

3.5. Hydroxyl radical scavenging

The hydroxyl scavenging activity of *A. unedo* aqueous extract was evaluated by its ability to compete with salicylic acid for hydroxyl radicals.

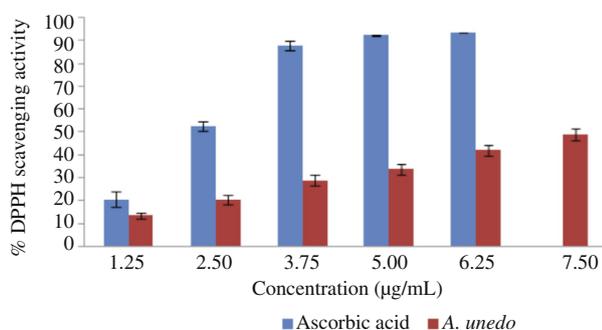


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of ascorbic acid and aqueous leaf extract of *A. unedo*.

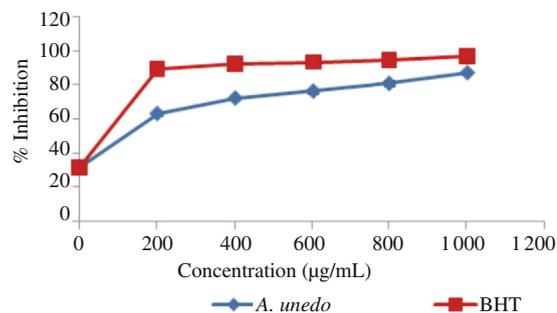


Figure 2. β-Carotene bleaching inhibition by BHT and aqueous extract of *A. unedo*.

As shown in Figure 3, hydroxyl radical scavenging increased with increase in concentrations. The ascorbic acid [$IC_{50} = (758.83 \pm 7.40)$ µg/mL] showed more effective scavenging ability when compared to that of aqueous extract [$IC_{50} = (1\ 015.74 \pm 46.35)$ µg/mL].

The maximum scavenging activity was found to be (97.80 ± 0.18)% for ascorbic acid and (79.23 ± 1.14)% for aqueous extract at 2 mg/mL.

3.6. Hydrogen peroxide radical scavenging activity

Scavenging activity of the extract and ascorbic acid as reference compound against hydrogen peroxide in terms of effective concentration was remarkably different and they were shown to be 83.14% (600 µg) and 96.3% (90 µg), respectively (Figure 4).

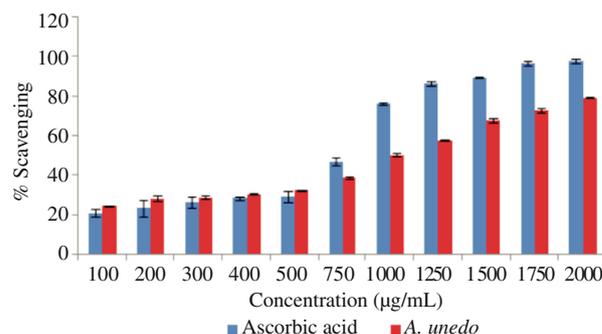


Figure 3. Hydroxyl radical scavenging activity of ascorbic acid and aqueous extract of *A. unedo*.

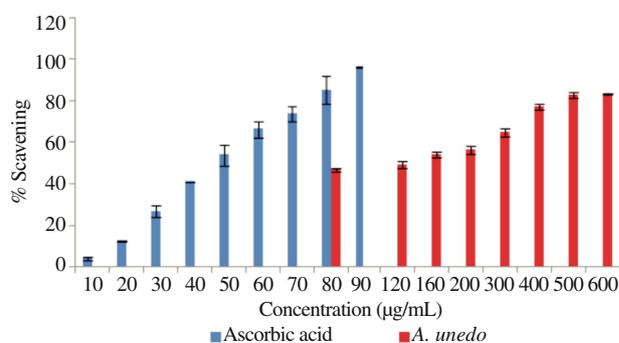


Figure 4. Hydrogen peroxide radical scavenging activity of ascorbic acid and aqueous extract of *A. unedo*.

According to the results, *A. unedo* showed an activity dependent on the concentration and the H₂O₂ scavenging IC₅₀ was (114.77 ± 16.86) µg/mL, which indicates a less effective scavenging potential referring to ascorbic acid [IC₅₀ = (49.19 ± 2.70) µg/mL].

3.7. Ferrous ion chelating activity

Antioxidant action may be of secondary type. One of the most important mechanisms is the chelating of pro-oxidant metals such as iron. Ferrozine forms a complex with Fe²⁺ with a characteristic red color, but in the presence of chelating agent, the complex formation is disrupted and the red color is decreased. Measurement of color reduction, therefore, allows the estimation of the chelating activity of the plant extract.

The metal chelating effect of investigated extract and EDTA were dependent on concentrations (Figure 5).

EDTA [IC₅₀ = (57.21 ± 0.44) µg/mL] in this assay demonstrated relatively high activity in comparison to the extract [IC₅₀ = (1 014.30 ± 36.21) µg/mL].

3.8. Ferric reducing power

The extract showed concentration-dependent reducing power. However, its reducing power [IC₅₀ = (156.55 ± 17.40) µg/mL] was lower than that of ascorbic acid [IC₅₀ = (56.72 ± 2.79) µg/mL] (Figure 6).

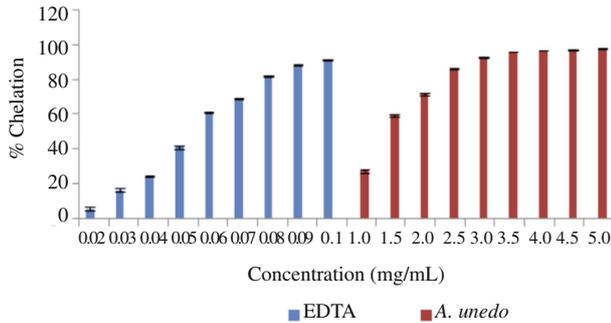


Figure 5. Ferrous ion chelating activity of EDTA and aqueous extract of *A. unedo*.

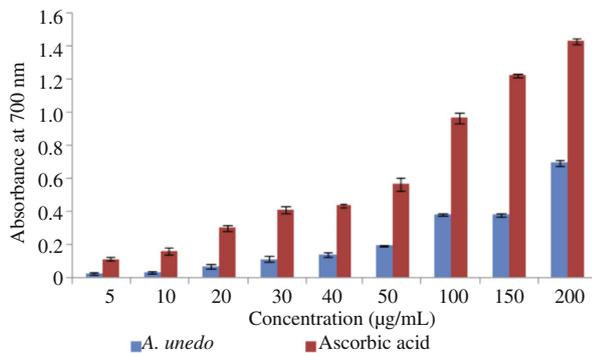


Figure 6. Ferric reducing power of ascorbic acid and aqueous extract of *A. unedo*.

3.9. Total antioxidant capacity

This test was based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) by the extract and formation at acid pH of green phosphate/Mo(V) complex.

Results showed the antioxidant activity of the extract and ascorbic acid in a dose dependent manner at concentrations 100–500 µg/mL. The IC₅₀ value of antioxidant capacity for the ascorbic acid [(292 ± 7.54) µg/mL] was greater than the extract IC₅₀ [(461.67 ± 4.16) µg/mL] (Figure 7).

3.10. Membrane stabilizing activity

As shown in Figures 8 and 9, the extract prevented the erythrocyte membrane against lysis induced either by hypotonic solution and heat.

For hypotonic solution induced hemolysis, at concentration range of 0.250–1.500 mg/mL, the extract showed significant inhibitory effect against RBCs hemolysis [(46.15 ± 0.70)%, (79.53 ± 0.43)%, (70.78 ± 1.38)%, (71.95 ± 2.26)% and (76.46 ± 1.80)% respectively for 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% and 0.9% of NaCl when the concentration of the extract was 1.500 mg/mL].

In heat induced hemolysis, the extract inhibited lysis of erythrocyte membrane in the range of (45.70 ± 1.30)%–(79.66 ± 1.92)% at concentration range of 0.025–0.500 mg/mL. Aspirin demonstrated protection in the range of (25.65 ± 1.57)%–(58.49 ± 1.23)%.

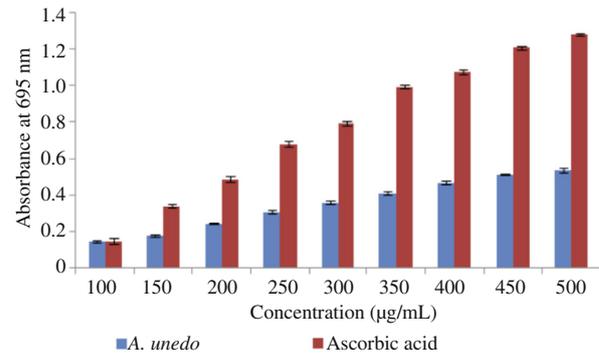


Figure 7. Total antioxidant capacity of ascorbic acid and aqueous extract of *A. unedo*.

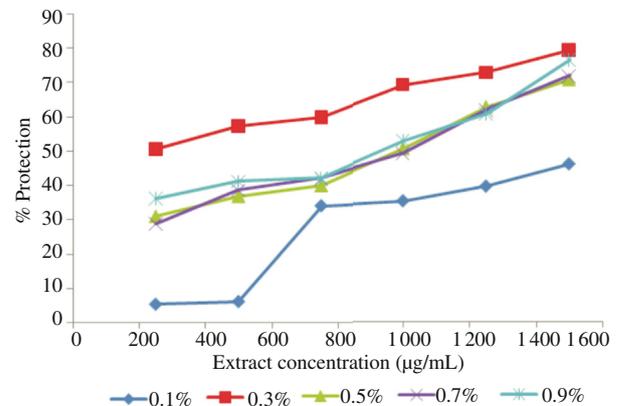


Figure 8. Effect of *A. unedo* aqueous extract on hypotonicity-induced hemolysis.

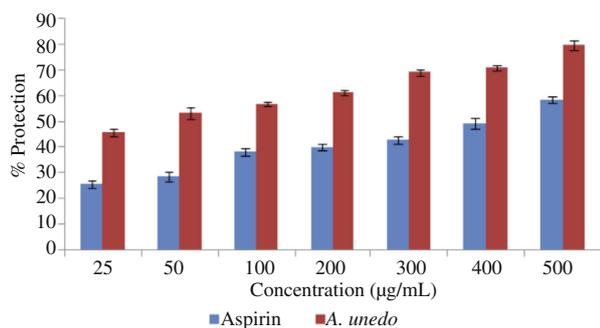


Figure 9. Effect of *A. unedo* aqueous extract on heat-induced hemolysis.

3.11. Oxidant induced hemolysis

As shown in Figure 10, protective effect of the extract against HOCl induced hemolysis was dose dependent. In fact, the hemolysis ratio gradually decreased with the increasing dose of the extract. Protection was already evident at 1 mg/mL of the extract with $(73.90 \pm 2.08)\%$ protection.

3.12. Inhibition of albumin denaturation

Protein denaturation is involved in inflammation and plant extracts showing inhibition of denaturation are often tested for anti-inflammatory activity.

For inhibiting thermally induced denaturation of albumin, the extract showed an astonishingly effect at different concentrations as shown in Figure 11.

A maximum inhibition of $(74.28 \pm 0.86)\%$ was observed at 500 µg/mL for the extract, and $(92.23 \pm 0.32)\%$ at 500 µg/mL for aspirin, the anti-inflammatory standard.

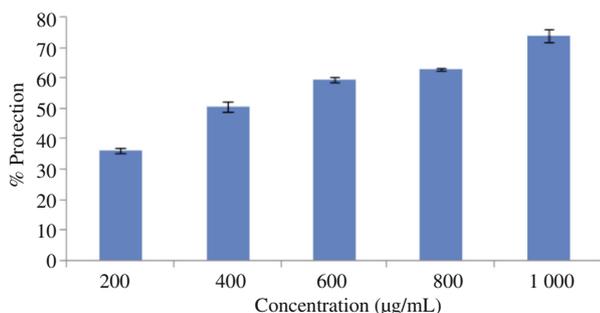


Figure 10. Effect of *A. unedo* aqueous extract on HOCl induced hemolysis.

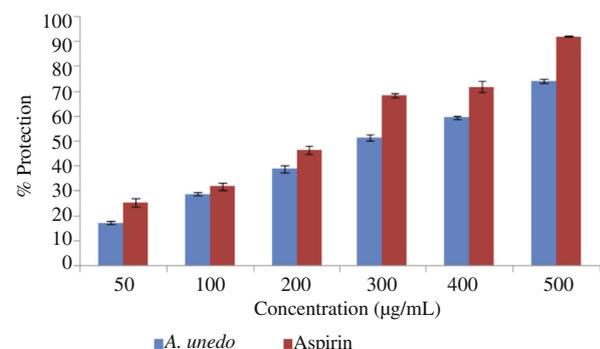


Figure 11. Effect of *A. unedo* aqueous extract on albumin denaturation.

4. Discussion

Antioxidants are substances that prevent various pathologic changes in living cell by protecting oxidation of its major constituents (proteins, lipids, carbohydrates and DNA) [28]. In plant extracts, the antioxidant activity is performed by polyphenols and is correlated positively with their concentration. From the obtained results, we can see a great antioxidant potential of the studied extract when compared to other species described in the literature.

So, the phenolic content of the studied extract exceed that reported by Mendes *et al.* [29] with (170.3 ± 1.4) mg GAE/g and Oliveira *et al.* [30] with (172.21 ± 6.29) mg GAE/g, that of *Malva parviflora* L. with (0.83 ± 0.063) mg/g [31], *Anacardium excelsum* with (1.49 ± 0.03) mg/g and *Piper putumayoense* with (10.20 ± 0.03) mg/g [32].

In the first part of our study, we focused on the antioxidant activity of the aqueous extract of *A. unedo*.

The large amount of polyphenols in this plant can explain the scavenging and antioxidant activity, due to their loss of proton properties, chelate formation, dismutation of radicals and giving up hydrogen atoms from their hydroxyl groups with radicals to form stable phenoxyl radicals [33].

Monitored in our study by several tests, this potential was confirmed in comparison to other works.

So, DPPH scavenging activity, in comparison to other works on the aqueous extract of *A. unedo* [487.2 µg/mL [34], (73.7 ± 6.3) µg/mL [30] and (87 ± 7) µg/mL [29]], our sample presented a lower IC₅₀ which revealed a higher scavenging activity.

The hydroxyl radical, the representative reactive oxygen species generated in biological systems, can be formed from superoxide anion and hydrogen peroxide in the presence of metal ions.

Considered as the most reactive free radical, hydroxyl radical is most often implicated in the pathology of free radical because of its ability to interact with intracellular targets such as DNA, thus causing significant damage.

The extract was found to be a less effective scavenger of hydroxyl radical compared to reported results [$(80.160 \pm 0.015)\%$ at 1 mg/mL] for *Quisqualis indica* [35].

Hydrogen peroxide itself is not very reactive, but it can sometimes be toxic to cell because it can give rise to hydroxyl radical in the cells [36,37]. Thus, the removal of H₂O₂ is very important for antioxidant defense in cell systems or food [38].

Compared to the scavenging effect reported by Kumar and Pandey [39] with $(26.02 \pm 1.91)\%$ at 250 µg/mL, our extract showed a better scavenging activity with $(60.53 \pm 1.18)\%$ at the same concentration.

The ability of the extract to slow down the β-carotene bleaching is used in the evaluation of its antioxidant activity and its ability to inhibit lipid peroxidation.

The inhibition percentage for *A. unedo* extract at 1 mg/mL, was significantly important compared to those reported by Norhaiza *et al.* [40] for *Labisia pumila* var. *alata* with $(89.72 \pm 0.95)\%$ and *Labisia pumila* var. *pumila* with $(59.09 \pm 2.24)\%$ at 40 mg/mL.

These data lead us to believe the great biological activity of the extract such as anti-cancer activity, for which one of the causes of its occurrence is lipid peroxidation.

A. unedo showed a stronger chelating activity ferrous ion chelating activity (IC₅₀) compared to reported data for aqueous extract of *Smilax excelsa* with (1.55 ± 0.06) mg/mL [41].

This chelating potential indicated a significant protective activity of the extract against oxidative damage by sequestering iron (II) ions that may turn into catalyst for Fenton-type reactions or participate in metal-catalyzed hydroperoxide decomposition reactions [42].

Ferric reducing power is a simple test of antioxidant capacity, and often used as indicator of antioxidant potential for a plant extract. In this test, antioxidant electron donation leads to the neutralization of the free radical [43].

An increase in absorbance corresponds to an increase of the reducing power of the extract tested [44,45].

A. unedo water extract was characterized by higher ferric reducing power than other data reported for the same water extract of the plant [$IC_{50} = (287.7 \pm 15.6) \mu\text{g/mL}$] [30].

Electron donating capacity and antioxidant activity are two related concepts and reflecting reducing power of a plant extract. The antioxidant molecules present in the extract play a reductant role and cause the reduction of the Fe^{3+} /ferricyanide complex to the ferrous form.

A. unedo leaves extract showed greater total antioxidant capacity compared to *Pistacia lentiscus* [$IC_{50} = (500.0 \pm 22.3) \mu\text{g/mL}$] [46]. This result suggests an important electron donating ability of the extract and so a great antioxidant capacity.

In the second part of our study, we explored anti-inflammatory activity of *A. unedo* aqueous extract through the study of its ability to stabilize RBCs membrane.

For hypotonic solution induced hemolysis, compared to 24.5% produced by *Momordica charantia* aqueous extract at 2.0 mg/mL [47], the studied extract presented stronger protection.

In heat induced hemolysis, compared to *Murraya paniculata* [(33.49 \pm 0.51)% at 2 mg/mL] [48], the plant extract showed greater protection.

While the protection percentage against HOCl induced hemolysis was lower than that recorded for the aqueous extract of *Rhus typhina* [(61.06 \pm 2.53)% at the concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$] [49].

These results provide evidence of anti-inflammatory activity of the extract which showed a good protective effect of RBCs against heat, oxidant and hypotonic solution induced hemolysis. This feature can be explained by the ability of the extract to edit the calcium influx in erythrocytes [50].

Knowing that the erythrocyte membrane resembles to lysosomal membrane and as such, the effect of extracts on the stabilization of erythrocyte could be extrapolated to the stabilization of lysosomal membrane [51]. The anti-inflammatory activity can also be explained by the inhibition of release of lysosomal content at the site of inflammation [52].

During the investigation of the activity of the plant extract on albumin denaturation we observed that *A. unedo* extract showed a greater protection comparatively to data observed for *Erythrina indica* [(65.21 \pm 1.77)% at 800 $\mu\text{g/mL}$] [53].

According to the fact that proteins denaturation is the cause of inflammation and rheumatoid arthritis, the protection of albumin denaturation confirms and contributes to anti-inflammatory activity of *A. unedo* extract.

This study demonstrated *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of *A. unedo*. Aqueous leaves extract, through scavenging, chelating and reducing activities indicated in the performed tests, showed a good antioxidant activity. Furthermore, the protection of RBCs indicated a membrane stabilizing effect of the extract.

These results lead to the conclusion that *A. unedo* aqueous extract has antioxidant and anti-inflammatory potential.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by University Hospital Nedir Mohamed of Tizi-Ouzou (Grant No. cnp-um/8819-136/2014) and Laboratory Analytical Biochemistry & Biotechnology Research, Faculty of Biological Sciences and Agricultural Sciences, Mouloud Mammeri University of Tizi-Ouzou, Algeria (Grant No. bn-001375-14-993).

References

- [1] Rodríguez ML, Estrela JM, Ortega ÁL. Natural polyphenols and apoptosis induction in cancer therapy. *J Carcinog Mutagn* 2013; **S6**: 004.
- [2] Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 2014; **94**(2): 329-54.
- [3] Amiot MJ, Riollet C, Landrier JF. Polyphenols and metabolic syndrome. *Médecine des Maladies Métaboliques* 2009; **3**(5): 476-82.
- [4] Sulusoglu M, Cavusoglu ES. *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree) selection in Turkey Samanlı mountain locations. *J Med Plants Res* 2011; **5**(15): 3545-51.
- [5] Afkir S, Nguetefack TB, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, et al. *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats Part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2008; **116**(2): 288-95.
- [6] Medjdoub H, Selles C, Tabti B. Preliminary phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. and anti-hyperglycemic effect of the root aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *J Chem Pharm Res* 2014; **6**(11): 195-9.
- [7] Mariotto S, Esposito E, Di Paola R, Ciampa A, Mazzon E, de Prati AC, et al. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacol Res* 2008; **57**: 110-24.
- [8] Li HB, Wong CC, Cheng KW, Chen F. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci Technol* 2008; **41**(3): 385-90.
- [9] Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx M, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol* 2000; **72**(1): 35-42.
- [10] Akrou A, Gonzalez LA, El Jani H, Madrid PC. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food Chem Toxicol* 2011; **49**(2): 342-7.
- [11] Santos SA, Pinto PC, Silvestre AJ, Neto CP. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Ind Crops Prod* 2010; **31**(3): 521-6.
- [12] Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem* 2009; **113**(4): 1202-5.
- [13] Aslan A, Güllüce M, Sökmen M, Adıgüzel A, Sahin F, Özkan H. Antioxidant and antimicrobial properties of the Lichens *Cladonia foliacea*., *Dermatocarpon minutum*., *Everinia divaricata*., *Evernia prunastri*., and *Neofuscella pulla*. *Pharm Biol* 2006; **44**(4): 247-52.
- [14] Dawidowicz AL, Olszowy M. Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by β -carotene bleaching assay: experiments with

- BHT used as standard antioxidant. *Eur Food Res Technol* 2010; **231**(6): 835-40.
- [15] Rajamanikandan S, Sindhu T, Durgapriya D, Sophia D, Ragavendran P, Gopalakrishnan VK. Radical scavenging and antioxidant activity of ethanolic extract of *Mollugo nudicaulis* by *in vitro* assays. *Indian J Pharm Educ Res* 2011; **45**(4): 310-6.
- [16] Serteser A, Kargioğlu M, Gök V, Bağcı Y, Özcan MM, Arslan D. Antioxidant properties of some plants growing wild in Turkey. *Grasas y Aceites* 2009; **60**(2): 147-54.
- [17] Dinis TC, Maderia VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch Biochem Biophys* 1994; **315**(1): 161-9.
- [18] Nabavi SF, Nabavi SM, Helliö C, Alinezhad H, Zare M, Azimi R, et al. Antioxidant and antihemolytic activities of methanol extract of *Hyssopus angustifolius*. *J Appl Bot Food Qual* 2013; **85**(2): 198-201.
- [19] Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. *Jpn J Nutr* 1986; **44**(6): 307-15.
- [20] Hazra B, Biswas S, Mandal N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement Altern Med* 2008; **8**: 63.
- [21] Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 1999; **269**(2): 337-41.
- [22] Rao AS, Reddy SG, Babu PP, Reddy AR. The antioxidant and antiproliferative activities of methanolic extracts from Njavara rice bran. *BMC Complement Altern Med* 2010; **10**: 4.
- [23] de Freitas MV, Netto Rde C, da Costa Huss JC, de Souza TM, Costa JO, Firmino CB, et al. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol In Vitro* 2008; **22**(1): 219-24.
- [24] Sakat S, Juvekar AR, Gambhire MN. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci* 2010; **2**(1): 146-55.
- [25] Suwalsky M, Orellana P, Avello M, Villena F. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food Chem Toxicol* 2007; **45**(1): 130-5.
- [26] Chandler JD, Min E, Huang J, Nichols DP, Day BJ. Nebulized thiocyanate improves lung infection outcomes in mice. *Br J Pharmacol* 2013; **169**(5): 1166-77.
- [27] Karthik K, Kumar BR, Priya VR, Kumar SK, Rathore RS. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by *in vitro* method. *Indian J Res Pharm Biotechnol* 2013; **1**(5): 729-30.
- [28] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; **142**(2): 231-55.
- [29] Mendes L, de Freitas V, Baptista P, Carvalho M. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chem Toxicol* 2011; **49**(9): 2285-91.
- [30] Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food Chem Toxicol* 2009; **47**(7): 1507-11.
- [31] Farhan H, Rammal H, Hijazi A, Hamad H, Daher A, Reda M, et al. *In vitro* antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts from crude *Malva parviflora* L. grown in Lebanon. *Asian J Pharm Clin Res* 2012; **5**(3): 234-8.
- [32] Lizcano LJ, Bakkali F, Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. *Food Chem* 2010; **119**(4): 1566-70.
- [33] Aksoy L, Kolay E, Ağılönü Y, Aslan Z, Kargioğlu M. Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*. *Saudi J Biol Sci* 2013; **20**(3): 235-9.
- [34] Orak HH, Yagar H, Isbilir SS, Demirci AŞ, Gümü T, Ekinçi N. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf. *Food Sci Biotechnol* 2011; **20**(5): 1249-56.
- [35] Bose A, Bose S, Maji S, Chakraborty P. Free radical scavenging property of *Quisqualis indica*. *Int J Biomed Pharm Sci* 2009; **3**(1): 1-4.
- [36] Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; **91**(3C): 14S-22S.
- [37] Kumar RS, Rajkapoor B, Perumal P. Antioxidant activities of *Indigofera cassioides* Rottl. Ex. DC. using various *in vitro* assay models. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; **2**(4): 256-61.
- [38] Turkoglu S, Turkoglu I, Kahyaoglu M, Celik S. Determination of antimicrobial and antioxidant activities of Turkish endemic *Ajuga chamaepitys* (L.) Schreber subsp. *euphratica* P.H. Davis (Lamiaceae). *J Med Plants Res* 2010; **4**(13): 1260-8.
- [39] Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal* 2013; **2013**: 162750.
- [40] Norhaiza M, Maziah M, Hakiman M. Antioxidative properties of leaf extracts of a popular Malaysian herb, *Labisia pumila*. *J Med Plant Res* 2009; **3**: 217-23.
- [41] Ozsoy N, Can A, Yanardag R, Akev N. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chem* 2008; **110**(3): 571-83.
- [42] Adefegha SA, Oboh G. Water extractable phytochemicals from some Nigerian spices inhibit Fe²⁺-induced lipid peroxidation in rat's brain – *in vitro*. *J Food Process Technol* 2011; **2**(1): 104.
- [43] Nishaa S, Vishnupriya M, Sasikumar JM, Hephzibah PC, Gopalakrishnan VK. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Maranta arundinacea* L. tuberous rhizomes. *Asian J Pharm Clin Res* 2012; **5**(4): 85-8.
- [44] Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; **16**(3): 144-58.
- [45] Goudjil MB, Ladjel S, Bencheikh SE, Zighmi S, Hamada D. Study of the chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the leaves of Algerian *Laurus nobilis* Lauraceae. *J Chem Pharm Res* 2015; **7**(1): 379-85.
- [46] Ghenima AI, Idir M, Nadjet MG, Samia MA, Mihoub ZM, Karim H. *In vitro* evaluation of biological activities of *Pistacia lentiscus* aqueous extract. *Int J Pharm Pharm Sci* 2015; **7**(11): 133-9.
- [47] Umukoro S, Ashorobi RB. Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing property of aqueous leaf extract of *Momordica charantia* in rats. *Afr J Biomed Res* 2006; **9**(2): 119-24.
- [48] Laboni FR, Afsari M, Howlader MS, Labu ZK, Julie AS. Thrombolytic and membrane stabilizing activities of ethanolic extract of local medicinal plant *Murraya paniculata*. (Family: Rutaceae). *J Pharmacogn Phytochem* 2015; **4**(2): 17-20.
- [49] Olchowik E, Lotkowski K, Mavlyanov S, Abdullajanova N, Ionov M, Bryszewska M, et al. Stabilization of erythrocytes against oxidative and hypotonic stress by tannins isolated from sumac leaves (*Rhus typhina* L.) and grape seeds (*Vitis vinifera* L.). *Cell Mol Biol Lett* 2012; **17**(3): 333-48.
- [50] Chopade AR, Somade PM, Sayyad FJ. Membrane stabilizing activity and protein denaturation: a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Phyllanthus amarus*. *JKIMSU* 2012; **1**(1): 67-72.
- [51] Omale J, Okafor PN. Comparative antioxidant capacity, membrane stabilization, polyphenol composition and cytotoxicity of the leaf and stem of *Cissus multistriata*. *Afr J Biotechnol* 2008; **7**(17): 3129-33.
- [52] Govindappa M, Naga Sravya S, Poojashri MN, Sadananda TS, Chandrappa CP, Santoyo G, et al. Antimicrobial, antioxidant and *in vitro* anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *J Med Plants Res* 2011; **5**(24): 5718-29.
- [53] Sakat S, Tupe PN, Juvekar AR. *In-vitro* anti-inflammatory activity of aqueous and methanol extracts of *Erythrina indica* Lam leaves. *Pharmacologyonline* 2009; **3**: 221-9.



***In vitro* Activity of *Arbutus unedo* Aqueous Extract against *Leishmania infantum* Promastigote**

**Idir Moualek¹, Abdelkamel Mouloua¹, Ghenima Iratni Aiche¹,
Abdenassar Harrar², Nacima Achour³, Celia Zerrouki¹, Ouerdia Mezine¹
and Karim Houali^{1*}**

¹Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB), University Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algeria.

²Department of Biochemistry and Microbiology, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Constantine 1, Constantine, Algeria.

³University Mouloud Mammeri and CHU Dr. Nedir Med, Tizi-Ouzou, Algeria.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors IM and AM designed the study, performed and wrote the protocol. Authors GIA and AH collected the plant samples. Author NA provided the parasite strain. Authors CZ and OM managed the literature searches. Author KH wrote the first draft of the manuscript and led the work. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/ARRB/2017/32556

Editor(s):

(1) J. David Puett, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Georgia, Athens, USA.

(2) George Perry, Dean and Professor of Biology, University of Texas at San Antonio, USA.

Reviewers:

(1) I. Nkem Benjamin, Federal Medical Centre, Owerri, Nigeria.

(2) Poliana Guerino Marson, Federal University of Tocantins, Brazil.

(3) Lúcio Roberto Cançado Castellano, Escola Técnica de Saúde da UFPB, Brazil.

(4) Samar al nahhas, Damascus university, Syria.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/18820>

Short Communication

Received 1st March 2017
Accepted 17th April 2017
Published 27th April 2017

ABSTRACT

Considered as a major public health problem, leishmaniasis incidence continues to increase due to lack of vaccine. In addition, drugs routinely used for the treatment of this disease have associated side effects. This justifies a need to develop new drug treatments. It is in this perspective that our study is inscribed.

In vitro antileishmanial activity of the aqueous extract of *Arbutus unedo* leaves was evaluated

*Corresponding author: E-mail: houalitizi@yahoo.fr;

against promastigotes of *L. infantum* (MON-1/DZ/01/LIPA1227/01) by *in vitro* promastigote cell assay. The extract of the studied leaves showed remarkable antileishmanial *in vitro* activity (74% mortality at 100 µg/ml) against the promastigotes of *Leishmania infantum*, in a concentration dependent manner.

Keywords: *Leishmania infantum*; *Arbutus unedo*; aqueous extract.

1. INTRODUCTION

Leishmaniasis constitutes a heterogeneous set of diseases all due to the infection of the host by a protozoan transmitted by a vector insect, the sandfly.

In Algeria, leishmaniasis has been marked by a considerable increase, particularly visceral leishmaniasis, due to *L. infantum* which infect particularly young children between one and four years of age [1,2].

The treatment, in addition to being very expensive, generates many side effects. Because of its numerous biological activities already proven [3] and for the sake of remediation we try in this study to evaluate the effect of the aqueous extract of *Arbutus unedo* against *L. infantum*.

Through the literature over 239 natural molecules that have been tested for their antileishmanial effect [4].

The active compounds, which have been isolated and identified, belong to the classes of alkaloids, triterpenes, sesquiterpenes, miscellaneous lactones, quinoids, flavonoids, diterpenes, steroids, lipids, iridoids, oxygen heterocycles, benzenoids, carbohydrates, depsides, a sulfur compound, and a monoterpene [4].

Arbutus unedo is known to contain many of these natural compounds [5]. This rich and varied composition is on the one hand at the origin of the numerous biological effects (antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-cancer) of the plant extract and on the other hand could be potentially at the origin of an antileishmanial activity.

Furthermore, there is no scientific works dealing with the antileishmanial activity of the aqueous extract of *Arbutus unedo* have been carried out, which motivated us for the realization of this study.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Plant Collection

Arbutus unedo L. (Ericaceae) leaves were collected in December 2014 from Tizi-Ouzou, Algeria. A voucher specimen was deposited in the herbarium of Mouloud Mammeri University of Tizi-Ouzou, Department of Vegetal Biology (FSBSA/MK/2105). The sample was dried and then ground to obtain a powder that was stored at room temperature and in the dark until extraction.

2.2 Extract Preparation

Twenty grams of powder of *A. unedo* leaves were dissolved in an erlenmeyer with 200 ml of distilled water. The flask was fully coated with aluminum foil and was placed on a magnetic stirrer. After 24 h of maceration at room temperature, and stirring at 40 rpm. Then, extract was filtered by using glass wool followed by Whatman № 1 filter paper. Finally the filtrate was lyophilized.

2.3 *In vitro* Antileishmanial Activity

L. infantum MON-1/DZ/01/LIPA1227/01 promastigote grown on NNN medium. The cultures were centrifuged for 10 min at 2.500 rpm and then undergo 3 washes with physiological water and transferred to RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum for mass cultivation [6].

The screening was performed in flat-bottomed 96-well plastic tissue-cultured plates maintained at 25°C.

Promastigote forms from a logarithmic phase culture were suspended to yield 1 million of cells/ml. The test was carried out on 96 well microplates, each well was filled with 100 µl of the parasites suspension, and the plates were incubated at 25°C for 1 h before drug addition.

Finally the extract to be tested was dissolved in DMSO and added to each well in order to obtain

the final concentrations of 12.5, 25, 50 and 100 µg / ml.

The incubation was carried out at 25°C for 72 h [7]. The viability of promastigotes was assed by propidium iodide colorimetric method and *A. unedo* activity was evaluated by comparing the mortality rates of the test wells with an untreated control.

3. RESULTS

The lyophilized extract was diluted in 1% DMSO and DMSO control was found to be inactive.

Results showed the antileishmal activity of the *A. unedo* leaves aqueous extract in a dose dependent manner at concentrations 12.5 – 100 µg/ml. The maximum activity of the extract was evaluated at 74% mortality of promastigotes for the concentration of 100 µg/ml.

The collected data (Fig. 1) clearly indicate that the inhibitory concentration for the extract is lower than 12.5 µg/ml.

4. DISCUSSION

In recent years, the interest in scientific research for plant extracts has grown and it is aimed at the search for compounds with a powerful leishmanicidal effect.

In a recent study conducted in Turkey, *in vitro* testing of antileishmania activity against

Leishmania. tropica promastigote was carried out. Ethanol, water and n-hexane extracts of *A. unedo* leaves have been tested and the ethanol extract was found to be more effective than the other extracts [8].

There are few studies in the literature that report on the activity of *A. unedo* aqueous extract against *L.infantum*, which does not allow us to compare our results.

But as a point of comparison we can cite the work of Khademvatan [9], on *L. infantum* promastigotes, which relate an IC₅₀ of 53.5 ± 2.5 µg/ml, obtained through the extract of *Holothuria leucospilota*.

In another study carried out by Mansour [10], on the anti-*Linfantum* activity of *Vitis vinifera* L. leaves aqueous extract, report an IC₅₀ of 12.53 µg / ml.

Many studies have been interested in the compounds of medicinal plants such as polyphenols, triterpenes, saponins [11,12,13,14], resveratrol [15], tannins [16], alkaloids [17], and quinines [18].

The antileishmanial action of these natural compounds has not yet been elucidated; never theless [19], report that the antileishmanial action of the flavonoids is done by inhibition of the parasitic topoisomerase II.

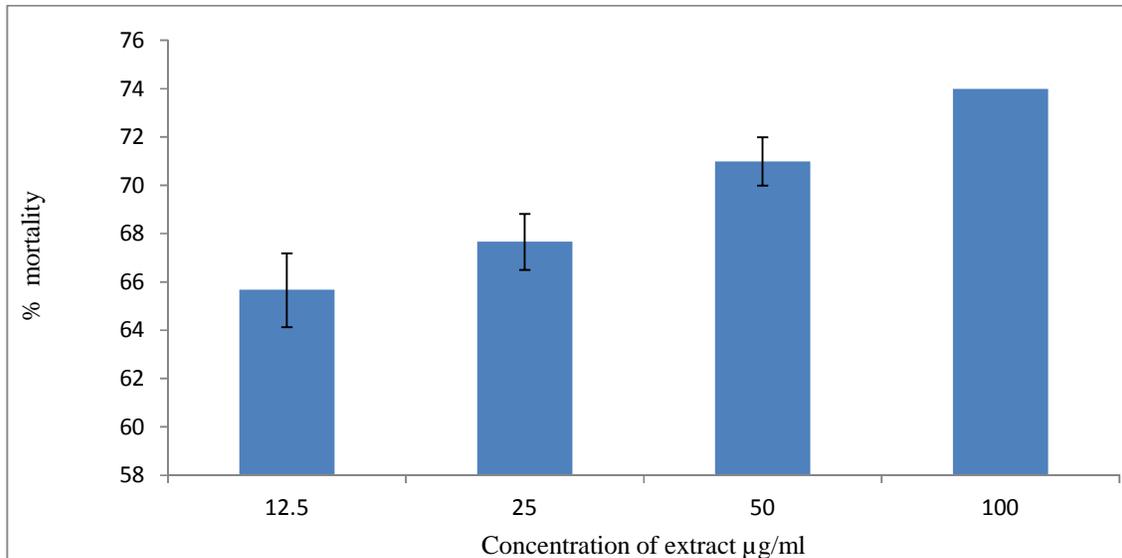


Fig. 1. Antileishmanial activity of *A. unedo* aqueous extract

5. CONCLUSION

In the search for novel antiprotozoal agents at a time when there is an urgent need for new innovative drug leads.

The results obtained suggest that the aqueous extract of *A. unedo* leaves can lead to the development of an effective treatment against leishmaniasis.

The antileishmanial activity of the studied extract may be due to its composition, rich in phenolic compounds.

The perspective of applying this extract to therapeutics involves the determination of its active fraction and its evaluation by *in vivo* tests.

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Adel A, Boughoufalah A, Saegerman C, DeDecken R, Bouchene Z, Soukehal A, Boelaert M. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Algeria: An update. *PloS ONE*. 2014;9:e99207.
2. Marty P. Leishmaniose viscérale: Epidémiologie, diagnostic et traitement. *La Lettre de l'infectiologue*. 2010;25:186-190.
3. Moualek I, Aiche GI, Guechaoui NM, Lahcene S, Houali K. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6:937-944.
4. Rocha LG, Almeida JRGS, Macedo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*. 2005;12:514-535.
5. Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. *Arbutus unedo* L.: Chemical and biological properties. *Molecules*. 2014;19:15799-15823.
6. Gomes CD, Alegrio LV, de Lim MEF, Leon LL, Araujo CA. Synthetic derivatives of curcumin and their activity against *Leishmania amazonensis*. *Arzneimittelforschung*. 2002;52:120-124.
7. Mbongo N, Loiseau P, Lawrence F, Bories C, Craciunescu D, Robert-Gero M. *In vitro* sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. *Parasitology Research*. 1997;83:515-517.
8. Kivcak B, Mert T, Ertabaklar H, Balcioglu C, Ozensoy Toz S. *In vitro* activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. *Turkiye Journal of Parasitology*. 2009;33:114-115.
9. Khademvatan S, Eskandari A, Saki J, Foroutan-Rad M. Cytotoxic activity of *Holothuria leucospilota* extract against *Leishmania infantum in vitro*. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2016;6. Article ID: 8195381
10. Mansour R, Haouas N, Kahla-Nakbi AB, Hammami S, Mighri Z, Mhenni F, Babba H. The effect of *Vitis vinifera* L. leaves extract on *Leishmania infantum In-vitro*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:349-355.
11. Sawadogo WR, Maciuk A, Banzouzi JT, Champy P, Figadere B, Guissou OG. Mutagenic effect, antioxidant and anticancer activities of six medicinal plants from Burkina Faso. *Natural Product Research*. 2012;26:575-579.
12. Tan N, Kaloga M, Radtke OA, Kiderlen AF, Öksüz S, Ulubelen A, Kolodziej H. Abietane diterpenoids and triterpenoid acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*. 2002;61:881-884.
13. Ridoux O, Di Giorigi C, Delmas F, Elias R, Mshvildadze V, Dekanosidze G, Kemertelidze E, Balansard G, Timon-David P. *In vitro* antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, α -hederin, β -hederin and hederacolchiside a1, in association with pentamidine and amphotericin. *Phytotherapy Research*. 2001;15:298-301.
14. Kolodziej H, Kayser O, Kiderlen AF, Ito H, Hatano T, Yoshida T, Foo LY. Proanthocyanidins and related compounds: Antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α release in the murine macrophage like cell line RAW 264.7. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2001;24:1016-1021.
15. Ferreira C, Soares DC, do Nascimento MTC, Pinto-da-Silva LH, Sarzedas CG, Tinoco LW, Saraiva EM. Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: *In vitro* effect of its association with

- amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58:6197-6208.
16. Kiderlen AF, Kayser O, Ferreira D, Kolodziej H. Tannins and related compounds: Killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor α in macrophages *in vitro*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2001;56:444-454.
17. Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Pinto A, Henriques AT, Bou-Habib DC, Saraiva EM. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45:1349-1354.
18. González-Coloma A, Reina M, Sáenz, Lacroix R, Ruiz-Mesia L, Arán VJ, Sanz J, Martínez-Díaz RA. Antileishmanial, antitrypanosomal, and cytotoxic screening of ethnopharmacologically selected Peruvian plants. *Parasitology Research*. 2012;110:1381–1392.
19. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. 2002;139:1-21.

© 2017 Moualek et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:
The peer review history for this paper can be accessed here:
<http://sciencedomain.org/review-history/18820>