

I Activité Antioxydante

I.1 Les radicaux libres oxygénés chez les végétaux

Les plantes produisent les espèces réactives d'oxygène (ROS) pendant un métabolisme normal et aux taux élevés pendant des périodes de stress. Bien qu'un excès de ROS (stress oxydatif) puisse résulter d'une oxydation non contrôlée entraîne des dommages des structures cellulaires comme l'ADN, les protéines et les lipides membranaires, on croit de plus en plus que la présence du ROS est essentielle dans les cellules car ils peuvent agir comme clef de signalisation des molécules pour l'activation des réponses au stress et des voies de la défense (Foyer et Noctor, 2005 ; Halliwell, 2006). Il est probablement que les composés phénoliques agissent avec d'autres molécules protectrices, y compris les extracteurs enzymatiques et non enzymatiques du ROS, afin de régler étroitement le niveau du ROS dans les cellules de la plante dans les réponses au stimulus environnemental (Grace, 2005).

I.2 Le rôle antioxydant des polyphénols

Chez l'Homme, les polyphénols des plantes consommées par le régime sont de plus en plus considérés comme des agents protecteurs efficaces contre les ROS (Virgili et Scaccini, 2003 ; Kris-Etherton et al., 2004).

Plusieurs études épidémiologiques dont la célèbre «ZUTPHEN Study » aux Pays-Bas indiquent qu'il existe une association inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et l'incidence de cancers et des maladies cardio-vasculaires (Hertog et al., 1993). Les polyphénols constituent en fait une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elle comprend plus de six mille molécules. Ils sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement tel que O_2 (anion superoxyde), HO_2 (radical perhydroxyle), H_2O_2 (peroxyde d'Hydrogène), OH (radical Hydroxyle), O_2 (oxygène singulet), ROO (radical peroxyde), Ro (radical alkoxyde) (Middleton et al., 2000).

I.3 Les polyphénols dans l'alimentation

L'alimentation fournit environ 1 g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruit et en jus de fruit et, dans une moindre mesure, en légume et en céréales. Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes: Les composés non flavonoïdes (Acides phénoliques, lignanes et stilbènes dont la molécule la plus connue est le resvératrol très abondant dans le raisin) et les composés

flavono des (flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols dont les plus importants repréSENTANTS sont les cathéchines du thé vert et du chocolat)

(Edeas, 2007).

Des études très récentes ont montré que plus le contenu en polyphénols dans les fruits et légumes était important, plus grande était la capacité antioxydante totale de ces aliments (Ou et al., 2002 et Statil et al., 2006). Les fruits et légumes les plus riches en anthocyanines (fraises, framboises, prunes rouges) présentent généralement une capacité antioxydante totale plus importante que ceux riches en flavanones (orange, raisin) et en flavonols (oignon, épinards, poireaux, chou vert)

(Proteggente et al., 2002).

Dans une excellente revue sur le sujet, Scalbert et Williamson (2000) indiquent que le contenu en polyphénols totaux de divers aliments mesuré par chromatographie suit l'ordre décroissant suivant :

50 g de cerises (276 mg) > à 200 g de pomme (239 mg) > à 200 ml de café (150 mg) > 200 ml de Thé vert (138 mg) > à 20 g de chocolat noir (102 mg) > à 125 ml de vin rouge (97mg) > à 10 g de blé (50 mg) > à 200 g de pomme de terre (28mg) > à 100 ml de jus d'orange (22mg) > à 100 g de tomate, 100 g de laitue et 20 g d'oignon (± 9 mg) (Pincemail et al., 2007).

I.4 Méthode d'étude des antioxydants

I.4.1 Test de réduction du DPPH

Le 1,1- Diphényl 1-2 picrylhydrazyle (DPPH) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) est un radical stable et présente une absorption spécifique à 517 nm qui lui confère une couleur violette.

Lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux, sa couleur disparaît. L'activité des substances anti-radicalaire est mise en évidence par la révélation sur des chromatogrammes de tâches décolorées sur un fond violet à l'aide de DPPH (Ekoumou, 2003).

I.4.2 Test ORAC

Récemment, le test standardisé ORAC « Oxygen Radical Absorbance Capacity » a été développé par des chercheurs en collaboration avec le ministère de l'agriculture Américain dans le but d'évaluer la capacité antioxydante totale (principalement liée aux polyphénols), que représentent 100 g de divers fruits et légumes frais (Wu et al., 2004). Les valeurs exprimés en unité ORAC (μ mol équivalent TROLOX /100g d'aliments frais) sont reprises pour quelques aliments dans le tableau 2.

Les chercheurs de l'université de Tufts (Etats-Unis), qui sont à la base de la création du test ORAC, estime « qu'il faudrait se procurer 3000 à 5000 unité ORAC par jour pour espérer avoir un impact significatif sur la capacité antioxydante du plasma et des t issus ».

Les mécanismes par lesquels les polyphénols peuvent avoir des effets protecteurs sur la santé *via* une action antioxydante ne sont toute fois pas très clairs et cela en raison de la relative faible biodisponibilité de ces molécules (Spencer et al., 2001). L'ingestion de polyphénols en quantité ($\pm 1g/J$) se trouvant dans l'alimentation habituelle se traduit par une concentration plasmatique ne dépassent pas la quantité de $1 \mu M$ en molécules appartenant aux divers sous-groupes des polyphénols. Par rapport aux concentrations en vitamine C ($60-80 \mu M$), en α -Tocophérol (5 à $36 \mu M$) et en β -carotène, la contribution des polyphénols entant que telle à l'activité antioxydante totale du plasma serait donc plus que limité. Comme le suggèrent toute fois Schabert et Williamson (2000), les molécules appartenant à la grande famille des polyphénols peuvent former *in vivo* divers métabolites qui pourraient contribuer à augmenter la capacité antioxydante totale du plasma.

Les chercheurs de « Linus Pauling Institute » estiment plutôt que l'augmentation de la capacité antioxydante du plasma observée après l'ingestion de fruits est en fait due à l'effet métabolique bien connu du fructose sur la concentration d'acide urique (un puissant antioxydant) et qu'elle n'est donc aucunement liée à l'activité antioxydante des polyphénols (Lotito et Frei, 2004). Si les polyphénols peuvent exercer réellement un effet protecteur à de si faibles concentrations, c'est plus que probablement parce que la réponse doit être recherchée dans un effet antioxydant indirect conditionné à la sur-ou sous-expression de gènes codant pour diverses protéines impliqués dans la régulation du glucose (protéines gluconogéniques), des défenses antioxydantes (métallothionéines, glucose-6-phosphate déshydrogénase, glutathion peroxydase) et des effets pro-inflammatoires (Interleukine 1- α , métalloprotéinases) (Ahmed et al., 2004 ; Shay et Banz, 2005).

Tableau 2: Capacité antioxydante totale de plusieurs fruits et légumes mesurée par le test ORAC et exprimée en unité ORAC (μmol equ TROLOX /100 g d'aliments frais) (Pincemail et al., 2007) .

Aliments	Valeur ORAC (unités/100 g d'aliment frais)	Aliments	Valeur ORAC (unités/100 g d'aliment frais)
Pruneau sec	5770	Orange	750
Raisin sec	2830	Raisin rouge	739
Myrtille	2400	Poivron rouge	710
Cresson	2223	Cerise	670
Mûre	2036	Kiwi	602
Ail	1939	Pamplemousse	483
Airelle	1750	Oignon rouge	450
Chou frisé	1700	Haricot rouge	460
Fraise	1540	Citrouille	404
Épinard	1260	Maïs	400
Framboise	1220	Aubergine	390
Asperge	1200	Mangue	302
Chou de Bruxelles	980	Pomme de terre	301
Prune	949	Chou vert	298
Luzerne	930	Banane	221
Brocoli	890	Pomme	218
Betterave	840	Carotte	207
Avocat	782	Tomate	189
Abricot	164	Laitue	148
Pêche	162	Melon	148
Poire	150	Concombre	65

II L'activité antimicrobienne

II.1 Principales méthodes de diffusion

II.1.1 Méthode de disque

Son dispositif essentiel est le placement des disques en papier filtre avec l'antibiotique sur la surface de l'agar juste après l'inoculation de l'organisme testé. Durant la nuit; des cultures non diluées de bouillon devraient ne jamais être employées comme inoculum. Application directe de routine des disques aux plats semés avec le matériel clinique n'est pas recommandé en raison des problèmes avec la commande d'inoculum et les cultures mélangées. Cette technique était à l'origine normalisée par Bauer et al., (1966) et par Ericson et Sherris (1971) et alors changé dans le rapport de l'OMS (1977) (Tableau 3).

Tableau 3: Mesure de l'activité antibactérienne par la méthodes de disque.

Méthode générale	échantillons	Références
Des Disques en papier filtre (Wattman numéro 2 de 6.5 mm de diamètre saturé par la solution d'antibiotique sont placés sur la surface d'un agar de sang semé avec un spécimen clinique (deux disques / plaque).	Antibiotiques en période d'isolement primaire Extraits aqueux et méthanolique	Bondi et al. (1947) Ajao et al. (1984)
La surface d'agar est semée avec le spécimen clinique; 6 µl de chaque HE sont ajoutés au disque; 6- 12 disques sont placés sur chaque plaque (boite de pétri).	HE	Valnet et al. (1978)

II.1.2 Méthode de Trou

La vérification de cette méthode dépend de la diffusion de l'antibiotique d'un trou vertical par la couche solidifiée d'agar.

Dans la boîte de Pétri ou plaque à tel point que la croissance du micro-organisme supplémentaire est empêchée entièrement dans un secteur ou une zone circulaire autour du trou contenant une solution de l'antibiotique (Tableau 4).

Tableau 4: Mesure de l'activité antibactérienne par la méthode de trou.

Méthode générale	échantillons	Références
Cinq puits de 1cm de diamètre, 0.1 ml des fractions sont bien placées dans chacun.	Les extraits méthanoliques	Lynch-Brathwaite et al.(1975)
Des plaques pour l'analyse sont uniformément préparées par l'ensemencement d'agar stérile, partiellement refroidi, fondu avec des dilutions du micro-organisme d'essai développé dans le bouillon. Le milieu semé d'agar est versé dans Les boîtes de Pétri Stériles. Trous ayant un diamètre de 11 mm sont remplis avec 100 ml d'une solution ou d'une suspension d'un extrait fractionné ou composé pur.	Extraits des flavonoïdes Alcaloïdes isolés Flavonoïdes	Hufford et al. (1975,1980) Hufford et Lasswell (1978)
Le résidu de chaque extrait est traité avec l'eau distillée pour faire 50.25.20.10 et 5% solutions (m/m).Trois gouttes de chaque extrait, equilibration à une température ambiante.	Extraits aqueux et alcoolique.	Ajao et al. (1985)

II.1.3 Méthode de cylindre

Cette méthode est semblable à la méthode de trou-plaque. Des cylindres d'acier inoxydable ou de porcelaine sont utilisés pour l'analyse. Après l'incubation, les cylindres sont enlevés, et le diamètre moyen de chaque zone d'inhibition de croissance est mesuré et enregistré (Tableau 5).

Tableau 5: Mesure de l'activité antibactérienne par la méthodes de cylindre.

Méthode générale	Echantillons	Références
Six cylindres sont distribués sur le Mueller Hinton Agar de 0.1 ml de l'antibiotique sur chaque cylindre.	Antibiotiques	USP XIX (1975)
Le solvant peut être l'eau, méthanol. ou solutions tampon de phosphate du pH différent.	Extraits polaires	Laurens et al. (1982)
	Extraits hydroacétonique	Mourey et al. (1985)
Des inoculums sont préparés dans l'antibiotique liquide (difco), 0.2 ml de l'inoculum dilué est semé et mélangé à 10 ml de L'antibiotique. 1 et 10 ml du milieu d'antibiotique n°11 de milieu (Difco) et maintenu à 45 °C dans un bain thermostatique.	Extraits de polarité croissante	Barbagallo et al. (1982)
	Extraits éthanoliques	Gutkind et al. (1981)
	Flavonoïdes isolés	Palacios et al. (1983)
Des cylindres stériles (6 /plaque) sont disposés sur la surface d'agar refroidie et boîtes de Pétri Sèches.0,15 ml d'extrait est ajouté sur chaque cylindre.		

II.2 Méthode de dilution

II.2.1 Méthode turbidimétrique de "tube"

Elle est basée sur la dispersion homogène d'un échantillon, dissoute dans l'eau pure, méthanol, l'eau/méthanol, solutions tampon de phosphate, dans la culture de bouillon exigée pour l'organisme ont analysé, et après l'incubation de 3 à 4 heures. La transmittance ou absorbance est lue dans un spectrophotomètre approprié à 530 nm (USP XIX, 1975 ; PE, 1971) (Tableau 6).

Tableau 6: Mesure de l'activité antibactérienne par la méthodes turbidimétrique de "tube".

Méthodes générales	L'échantillon	Références
0.25 g d'extrait /10 ml de l'eau stérile sont dilué en série pour donner les concentrations désirées. 1 ml d'un extrait de plante dilué en série est ajouté. Les tubes sont incubés et mesurés spectrophotométriquement l'HE est diluée avec du Tween 20 à un rapport de 10%.	L'extrait alcoolique HE	Twaij et al. (1986) Fournier et al. (1978)
Une Dilution double en bouillon. La concentration des composés purs dans le tube initial est 50 mg/ml. 10 g de chaque alcaloïde est suspendu en 10 ml de l'eau. 5 ml de chaque dilution sont dilués à 25 ml avec le milieu de culture.	Flavonoïdes Alcaloïdes	Hufford et Lasswell (1978) Lumonadio et al. (1986)

II.2.2 Méthode de dilution d'agar

L'échantillon est dissous ou suspendu dans un solvant approprié et mélangé au milieu d'agar. Les résultats obtenus, avec cette méthode doivent être équivalents à ceux obtenus avec des méthodes de diffusion et de dilution (Tableau 7).

Tableau 7: Mesure de l'activité antibactérienne par la méthodes turbidimétriques de "tube".

Méthodes générales	L'échantillon	Références
10 mg extrait/0,2 ml du solvant (l'eau, méthanol, acétone) ou autre solvant sans activité antimicrobienne à une concentration finale de (2%). Avant la congélation, 10 ml d'agar de Mueller-Hinton sont ajoutés aseptiquement à chacune des plaques et elles sont tourbillonnées soigneusement jusqu'à ce que l'agar commence à fixer. Cette méthode peut être utilisée dans la détermination de MIC (concentration minimale de l'extrait).	Extraits de méthanol Alcaloïdes, Flavonoïdes Alcaloïdes CHCl ₃ , et méthanol Sesquiterpènes	Mitscher et al. (1972) Mitscher et al. (1975), (1980) Al-Shamma et al. (1981) et (1982) Rios et al. (1987) Calzada et al. (1980)
Semblable à la méthode de Mitscher ci-dessus, mais appliqué aux HE. Tween 80/ huile essentielle à un rapport 1:5. Le mélange est dilué avec l'agar, dilutions entre 1/100 à 1/800. Tampon de phosphate (pH 7.4) pour faire une solution à un rapport 1:1 (m/m). 1 ml de chaque extrait est ajouté à chaque plaque stérile avec le milieu ou le sang d'agar avant congélation	HE Extraits aqueux	Villar et al. (1986) El-Said (1971)

I.3 Méthodes bioautographiques

II.3.1 Bioautographie de contact

Elle est basée sur la diffusion des composés séparés par CCM ou CP des feuilles ou des chromatoplaques. Ceux-ci sont placés sur la surface de grandes plaques d'agar nutritif inoculé avec les micro-organismes qui sont sensibles aux antibiotiques étant analysés. Après 15 à 30 min, les feuilles ou les chromatoplaques sont enlevées. Dans les deux exemples, les antibiotiques répan dent dans la couche d'agar et empêchent la croissance des micro -organismes d'essai. Les plaques sont alors incubées à une température appropriée jusqu'à ce qu'une couche mince des micro -organismes grandissants soit visible sur la surface. Les zones de l'inhibition sont alors clairement évidentes. Des zones d'inhibition peuvent être rendues plus remarquables et évidentes plus tôt en employant des indicateurs de l'activité déshydrogénase (Tableau 8).

Tableau 8: Méthodes Bioautographiques.

Méthodes générales	L'échantillon	Références
Les boîtes de Pétri avec les chromatoplaques sont congelé à 4 °C. La plaque est enlevée de l'agar après 24 H et après la boîte de Pétri est incubée.	Extraits et composés Sesquiterpéniques Extraits de polarité croissante Alcaloïdes	Callion et al. (1982) Zahir Shah et al. (1986) Verpoorte et al. (1982.1983) Van Beek et al. (1984b,1985)
Le papier wattman n°1 est placé et pressé. retiré après 15min, placé une surface d'agar inoculé. La plaque est incubée. Les zones d'inhibition correspondent aux substances actives séparées par chromatographie.	Antibiotiques et des substances rliées.	Wallhiuser (1969)

II.3.2 Bioautographie directe

Une suspension de micro-organisme dans le milieu liquide est pulvérisée sur un chromatoplaque développé après enlèvement des solvants. Elle est alors incubée avec cette méthode, il n'y a aucune diffusion et les problèmes de la méthode de contact sont éliminés (Tableau 9).

Tableau 9: Bioautographie directe.

Méthodes générales	L'échantillon	Références
La plaque de CCM est pulvérisée avec une suspension du germe dans le TSB. Des zones d'inhibition sont intensifiées par l'utilisation de sels de tétrazolium (indicateur de l'activité déshydrogénase). Les résultats prouvent que la méthode peut être appliquée avec succès aux composés dans un extrait brut du tissu végétal.	Extrait aqueux et méthanoliques.	Lund et Lyon (1975)

II.3.3 Bioautographie d'immersion

Dans cette méthode le chromatoplaque doit être inclus dans le milieu. La plaque développée est couverte d'agar fondu. L'agar solidifié est inoculé avec les micro-organismes et les plaques sont laissées à 4 °C dans le congélateur ou à la température ambiante. Après 4 H, les plaques sont inoculées et incubées.

Tableau 10: Bioautographie d'immersion.

Méthodes générales	L'échantillon	Références
Les plaques de CCM sont inondées avec l'agar contenant des spores du micro-organisme. Après une rediffusion pendant une période de 24 H à 4 °C les plaques sont incubées et les zones d'inhibition sont enregistrées	Alcaloïdes.	Verpoorte et al. (1978)