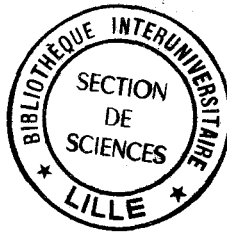


50376
1995
77

50376
1995
77



Numéro d'ordre : 1508

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

Theeshan BAHORUN

**LES POLYPHENOLS DE *CRATAEGUS MONOGYNA* Jacq. *IN VIVO* ET *IN VITRO* :
ANALYSE ET ACTIVITES ANTIOXYDANTES**

Soutenu le 21 Avril 1995 devant la commission d'examen

M. J. VASSEUR	Professeur, Université de Lille I.....Président
Melle M. PINKAS	Professeur, Université de Lille II.....Rapporteur
M. R. BROUILLARD	Professeur, Institut de Chimie, Strasbourg.....Rapporteur
M. O.I. ARUOMA	Professeur, King's College, Université de Londres.Rapporteur
M. F. TROTIN	Maître de Conférences, Université de Lille II.....Examineur
M. B. GRESSIER	Maître de Conférences, Université de Lille II.....Examineur

A mon père Hemraz et ma mère Lalita qui ont consenti à d'énormes sacrifices pour permettre l'aboutissement de ce travail. Je leur en suis infiniment reconnaissant. Mes pensées vont également à ma soeur, Dorina et à toute ma famille à l'île Maurice.

AVANT-PROPOS

Cette étude a été réalisée grâce à la collaboration entre le Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Morphogenèse Végétale de l'Université de Lille I (Professeur J. VASSEUR) et le Laboratoire de Pharmacognosie (Professeur M. PINKAS) de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lille II. Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur J. VASSEUR, Président, pour m'avoir accueilli dans son Laboratoire, conseillé au cours de ce travail et lors de la rédaction de ce manuscrit. Mes remerciements vont également à Mademoiselle le Professeur M. PINKAS, directrice du Laboratoire de Pharmacognosie, qui m'a cordialement accueilli dans son Service.

J'exprime ici ma très profonde gratitude à Monsieur Francis TROTIN qui a énormément investi à la mise en place de ce sujet et pour son encadrement très compétent. Je lui exprime tous mes remerciements pour sa confiance, ses précieux conseils et surtout pour ses qualités humaines, très rares de nos jours, qui m'ont permis de surmonter les problèmes rencontrés au cours de mes travaux de recherche et lors de la rédaction de cette thèse.

Je remercie vivement Mademoiselle le Professeur M. PINKAS (Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lille II), Monsieur le Professeur R. BROUILLARD (Université Louis Pasteur, Institut de Chimie, Strasbourg), Monsieur le Professeur O.I ARUOMA (King's College, Londres) d'avoir accepté d'être les Rapporteurs de cette thèse ainsi que Monsieur B. GRESSIER, Maître de Conférences (Laboratoire de Pharmacologie et de Pharmacie Clinique) d'examiner ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur BRUNET, ainsi que S. LEBEGUE (Laboratoire de Pharmacologie et de Pharmacie Clinique), Monsieur J. POMMERY (Laboratoire de Toxicologie) pour m'avoir accueilli dans leurs Laboratoires de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lille II et beaucoup aidé à la réalisation de cette étude.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur J. DUBOIS qui a toujours su se rendre disponible pour prodiguer des conseils qui m'ont été très précieux.

François (l'éternel bon conseiller!), Catherine et Stéphane (les râleurs!), Christelle, Magalie, Béatrice (les bonnes soeurs!), Vincent (le timide!), Anne-Sophie et Christel n'ont jamais hésité à m'apporter leur soutien dans les moments difficiles de cette thèse. Eric (toujours en léthargie!) et Bruno (le grand méticuleux!) m'ont toujours été d'une aide précieuse pour la manipulation des différents logiciels et leurs conseils. Je n'oublierai surtout pas Sandra (la plus belle!) qui a contribué à l'élaboration finale de ce manuscrit.

Je les associe à ces remerciements ainsi que toutes les personnes des différents Laboratoires (chercheurs, étudiants, stagiaires, personnel technique) pour leur aide, leurs conseils et leur bonne humeur.

ABBREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
AMP : adénosine monophosphate
ANA : acide naphtalène acétique
BHA : butylhydroxyanisol
BHT : bromohydroxytoluène
CAT : catalase
CI 50 : concentration inhibitrice à 50%
CLHP : chromatographie liquide haute pression
CoA : coenzyme A
2,4-D : acide 2,4- dichloro phénoxy-acétique
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
G6PDH : glucose-6-phosphate-déshydrogénase
GPx : glutathion-peroxydase
GR : glutathion-réductase
HRP : Horseradish Raifort Peroxidase
KIN : kinétine
MDA : malondialdéhyde
MeOH : méthanol
MS : masse sèche
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
PBS : phosphate buffer saline
RP : reverse phase (phase inverse)
SOD : superoxyde-dismutase
TBA : acide thiobarbiturique
TNF : tumor necrosis factor
v/v : volume/volume
Wm⁻² : watt par mètre carré

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

A. LES POLYPHENOLS3

I. METABOLISME3

1. Acides phénols, Flavonoïdes et Anthocyanes3

2. Proanthocyanidines5

II. COMPARTIMENTATION ET SITES DE BIOSYNTHESE.....8

III. STRUCTURE.....9

1. Les Composés en C₆, C₆-C₁, C₆-C₂ et C₆-C₃9

2. Les Composés en C₆-C₃-C₆ 11

2.1 Flavonoïdes au sens strict..... 11

2.1.1) Chalcones 11

2.1.2) Aurones..... 11

2.1.3) Flavanones 12

2.1.4) Dihydroflavonols ou 3-hydroxyflavanones 13

2.1.5) Flavones et flavonols 13

2.2 Anthocyanes 15

2.3 Flavane-3-ols et dérivés 16

2.3.1) Flavane-3-ols 16

2.3.2) Flavane-3-ols estérifiés par l'acide gallique 17

2.3.3) Dérivés hétérosidiques 18

2.3.4) Flavane-3,4 diols 18

2.3.5) 5-déoxyflavane-3-ols 19

2.3.6) Proanthocyanidines 19

IV. ROLE, IMPORTANCE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES COMPOSES PHENOLIQUES..... 23

1. Dans la plante..... 23

2. Chez l'animal 24

B. L'AUBEPINE.....	26
I. BOTANIQUE.....	26
II. ACTIONS PHARMACOLOGIQUES.....	27
Domaine thérapeutique officiel	27
III. EMPLOIS ET INDICATIONS EMPIRIQUES ACTUELS.....	28
1. Emplois empiriques traditionnels.....	28
2. Officiels	28
3. Dans les ouvrages de Pharmacognosie	29
4. Emplois médicamenteux et formes pharmaceutiques	29
IV. COMPOSITION CHIMIQUE.....	30
1. Les polyphénols.....	30
2. Les amines	31
3. Les triterpènes et les acides triterpéniques.....	31
4. Autres composés	31

C. RADICAUX LIBRES 32

I. LES RADICAUX LIBRES.....	32
II. SOURCES CELLULAIRES DE RADICAUX LIBRES	35
III. PATHOLOGIES ENGENDREES PAR LES RADICAUX LIBRES.....	35
IV. DEFENSE CONTRE LES RADICAUX LIBRES	36

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	40
1. Le matériel végétal <i>in vivo</i>	40
2. Le matériel végétal <i>in vitro</i>	40
3. Les Préparations Pharmaceutiques d'Aubépine	43
II. EXTRACTION ET PURIFICATION.....	44
1. A partir de tissus <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	44
1.1 Les dérivés triterpéniques.....	44
1.2 Les polyphénols.....	44
2. A partir du milieu liquide des suspensions cellulaires.....	45

3. A partir de préparations pharmaceutiques	45
III. SEPARATION.....	46
1. Chromatographie sur couche mince.....	46
2. Chromatographie sur colonne	47
3. Chromatographie liquide haute pression	47
IV. DOSAGE	48
1. Colorimétrie.....	48
2. Chromatographie liquide haute pression	50
V. DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES.....	51
1 Détermination des activités antilipoperoxydantes	51
2. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	54
3. Piégeage de l'anion superoxyde (O ₂ ^{o-})	55
4. Piégeage de l'acide hypochloreux (HOCl)	56

CHAPITRE III : RESULTATS

A. LES POLYPHENOLS <i>IN VIVO</i>	59
I. ANALYSE QUALITATIVE	59
1. Chromatographie sur couche mince.....	59
2. Chromatographie liquide haute pression	60
II. ANALYSE QUANTITATIVE.....	60
1. Phénols totaux.....	60
2. Proanthocyanidines	61
3. Catéchines	62
4. Flavonoïdes.....	63
5. Acide chlorogénique	64
B. LES POLYPHENOLS <i>IN VITRO</i>	66
I. MISE EN PLACE ET CHOIX DES COLONIES TISSULAIRES.....	67
1. Cultures sur milieu ANA /Kinétine	67
2. Cultures sur milieu 2,4-D /Kinétine.....	68
II. CINETIQUE DE PRODUCTION DES POLYPHENOLS DANS LES COLONIES TISSULAIRES ISSUES D'OVAIRES	71

1. A l'obscurité	71
2. Sous une photopériode 16h lumière / 8h obscurité.....	71
3. En lumière continue	74
III. ANALYSE DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION EN POLY-PHENOLS DE COLONIES TISSULAIRES CULTIVES EN LUMIERE CONTINUE.....	77
1. Evolution des polyphénols au cours d'une subculture de 40 jours.....	77
2. Influence des acides shikimique et gallique sur la production en polyphénols.....	79
IV. ETUDE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.....	84
1. Mise en place	84
2. Evolution des polyphénols au cours d'une subculture de 40 jours.....	84
V. COMPARAISON ENTRE SUSPENSIONS CELLULAIRES ET COLONIES TISSULAIRES	87
C. CONCLUSIONS COMPARATIVES SUR LES CARACTERISTIQUES DU BOUTON FLORAL <i>IN VIVO</i>, DES COLONIES TISSULAIRES ET DES SUSPENSIONS CELLULAIRES <i>IN VITRO</i>.....	
	89
D. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES POLYPHENOLS <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i>.....	
	91
I. AUBEPINE <i>IN VIVO</i>	92
1. Activité antilipoperoxydante	92
1.1 Polyphénols de référence	92
1.2 Extraits totaux	93
1.3 Phases acétate d'éthyle	95
1.4 Phases aqueuses résiduelles	97
2. Activités de piégeage des espèces réactives de l'oxygène	98
2.1 Polyphénols de référence	98
2.2 Extraits totaux	99
II. FORMES ET PREPARATIONS COMMERCIALES PHARMACEUTIQUES.....	102
III. CULTURES CELLULAIRES	106

CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION

I. LES POLYPHENOLS DE L'AUBEPINE <i>IN VIVO</i>	109
II. LES POLYPHENOLS DE L'AUBEPINE <i>IN VITRO</i>	114
III. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES POLYPHENOLS <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i>	120
BIBLIOGRAPHIE	126
ANNEXES	148

INTRODUCTION

Les métabolites secondaires des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie, mais ils se sont surtout illustrés en thérapeutique. La Pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, des modèles moléculaires ou des matières premières pour la semi-synthèse.

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. L'isolement de principes actifs à partir du XIX^{ème} siècle en améliorant la connaissance des structures a fait progressivement se séparer et parfois s'opposer une Phytothérapie traditionnelle souvent empirique avec une Thérapeutique officielle incluant les principes chimiques et végétaux dont la pharmacologie était mieux connue. Cette Thérapeutique officielle accepte parfois avec une certaine méfiance l'emploi de végétaux ou d'extraits complexes de végétaux dont l'action est confirmée par l'usage sans être attribuée de façon certaine à une molécule-type.

L'Aubépine entre précisément dans ce cadre et ses emplois comme neuro- et cardiosédatif reçoivent depuis quelques années un appui de la part des médecins généralistes qui la prescrivent pour éviter l'emploi des tranquillisants. Comme elle est utilisée sous forme de tisanes, extraits ou préparations complexes, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains des effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués aux polyphénols présents, flavonoïdes et dérivés de flavane-3-ols.

Les polyphénols végétaux sont largement utilisés en Thérapeutique comme vasculoprotecteurs, en particulier les flavonoïdes (rutine...) et les proanthocyanidines oligomères. Ils sont également des inhibiteurs enzymatiques et ont diverses autres activités parfois récemment prouvées comme : inhibition de la lipoxigénase et de la cycloxygénase, effet antiélastase, stabilisation du collagène, inhibition de l'AMP cyclique-phosphodiesterase, et de l'enzyme de conversion, inhibition de la promotion des tumeurs, etc...

Des travaux ont enfin montré leurs potentialités comme antioxydants et antiradicalaires, la liste des phénomènes biologiques et pathologiques dans lesquels sont impliqués les radicaux libres justifiant cet intérêt. On trouve également des emplois en Cosmétologie contre le vieillissement et en alimentation comme antioxydant-conservateurs.

On voit donc que toute plante riche en polyphénols peut être étudiée et devenir une source de molécules intéressantes tournée vers d'autres emplois potentiels qui ne seraient pas

forcément les mêmes que ceux préconisés initialement. Il semble que ce soit le cas de l'Aubépine.

Par ailleurs, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures *in vitro* de tissus végétaux. Après que soit retombé l'optimisme initial lié à l'espoir de la production industrielle et à bas prix, on s'oriente pour les cultures végétales *in vitro* vers l'étude de leurs potentialités.

On peut étudier la production de molécules ayant une très forte valeur ajoutée (colorant du Safran), ou un fort intérêt thérapeutique (antitumoraux : taxol, composants des dimères de la Pervenche tropicale), ou tenter d'éviter, par culture *in vitro*, le pillage des ressources naturelles. Des cas de productivité plusieurs fois supérieure à celle de la plante ont été obtenus *in vitro* (acide rosmarinique, diosgénine, ajmalicine, shikonine).

L'expérience de notre laboratoire, en collaboration avec celui de la Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, concerne précisément les domaines qui viennent d'être évoqués. Des travaux antérieurs sur les tissus de Sarrasin *in vitro* ont permis d'obtenir un savoir-faire dans le domaine des cultures *in vitro* (colonies tissulaires, suspensions cellulaires, racines transformées), dans l'analyse, l'extraction-séparation, l'identification de molécules complexes comme certains dimères de proanthocyanidines et l'optimisation de leur production.

Nous avons donc approfondi la connaissance analytique de l'Aubépine dans le but d'établir des relations avec des effets antioxydants. De plus nous avons étudié parallèlement les cultures *in vitro* en vue d'optimiser leur production en phénols actifs dont les mesures d'activité ont été développées, rappelons le, en collaboration avec les laboratoires de Toxicologie et de Pharmacologie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille.

CHAPITRE I

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

A. LES POLYPHENOLS

Les composés phénoliques sont très nombreux et peuvent être divisés en plusieurs catégories. Ils possèdent par définition la structure des phénols avec au moins un groupement hydroxyle fixé sur un carbone appartenant lui-même à un cycle aromatique.

En fait, l'appellation courante des phénols végétaux recouvre majoritairement des dérivés possédant plusieurs groupements phénoliques, d'où le nom de polyphénols, avec ou non d'autres groupements (OH alcooliques, carboxyles etc...).

Ils sont souvent engagés dans des combinaisons notamment sous forme d'éthers, faisant intervenir une liaison C-O-C entre un OH alcoolique ou phénolique du noyau et un OH d'une molécule glucidique.

Une définition biogénétique à partir du métabolisme des composés phénoliques par la voie shikimique et des acétates avec combinaison de ces deux voies est souvent utilisée (Harborne, 1989).

I. METABOLISME

Les études sur la biosynthèse des composés phénoliques ont été conduites en utilisant des mutants ayant perdu la capacité de synthétiser certaines substances et ayant la possibilité d'en accumuler d'autres. Elles ont été conduites par des techniques *in vitro* permettant de modéliser des réactions biochimiques élémentaires à partir de systèmes enzymatiques isolés du végétal ainsi que des molécules marquées. Dans ce chapitre nous décrirons les principales étapes de formation des composés phénoliques comme les acides phénols, les flavonoïdes et les tanins condensés.

1. Acides phénols, Flavonoïdes et Anthocyanes

La formation des composés aromatiques à partir des glucides par l'intermédiaire de l'acide shikimique a été démontrée par Davis en étudiant la synthèse des acides aminés aromatiques à l'aide de certains microorganismes (Ribéreau-Gayon, 1968). Cette voie métabolique (**Figure 1**) qu'on appelle aussi la voie shikimate-chorismate est fonctionnelle chez les plantes, les bactéries et les champignons.

- Le phosphoénol pyruvate (1) est formé à partir des glucides par la chaîne de la glycolyse et réagit avec l'érythrose 4-phosphate (2) qui provient de la voie des pentoses pour donner par cyclisation l'acide céto-2- désoxy-3-phospho-7-glucoheptonique (3).

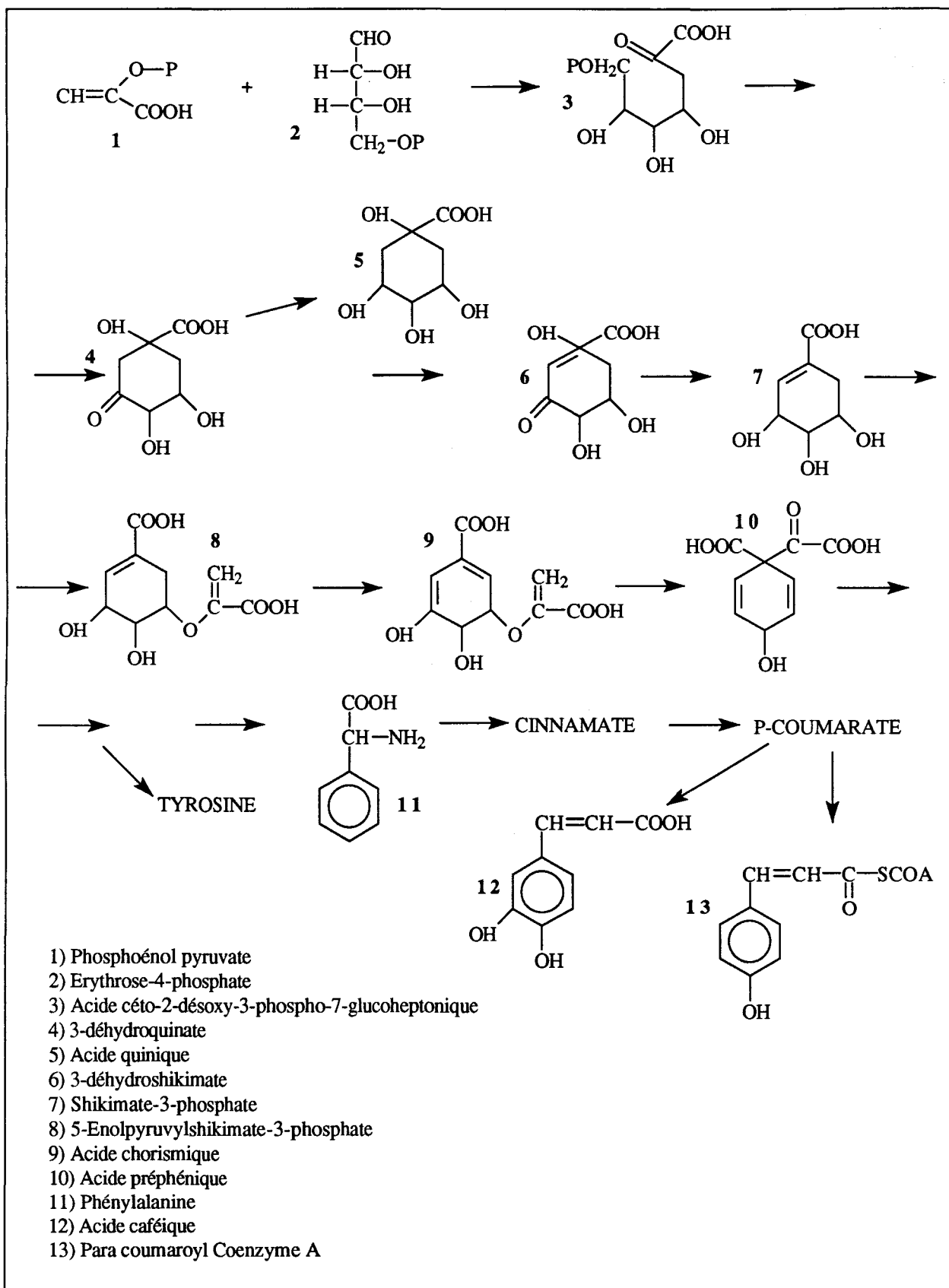
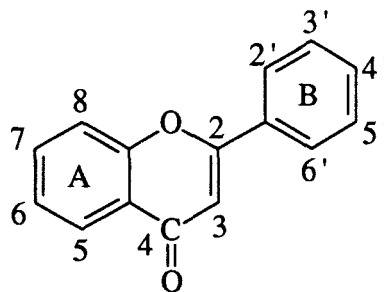


Figure 1 : Biosynthèse du Para-coumaroyl CoA à partir de la voie Shikimate-Chorismate

- ➔ Celui-ci est transformé en 3-déhydroshikimate (6) via la formation du 3-déhydroquinone (4) à partir duquel est formé un des composants de l'acide chlorogénique, l'acide quinique (5).
- ➔ Le 3-déhydroshikimate après une série de réactions enzymatiques va permettre la synthèse de l'acide chorismique (9) et de l'acide préphénique (10) qui sont les précurseurs de la phénylalanine (11) ou la tyrosine.
- ➔ La phénylalanine sous l'action de la phénylalanineammonialyase (PAL) va être transformée en cinnamate, p-coumarate et finalement en para-coumaroyl-CoA (13). Il est à noter que les coumarines dérivent de la cyclisation des acides cinnamiques et que le para-coumarate va permettre la synthèse de l'autre précurseur de l'acide chlorogénique, l'acide caféique (12).
- ➔ Avec la formation du para-coumarate, la biosynthèse des polyphénols ayant une structure en C6-C3-C6 est amorcée. Cet édifice de base est composé d'un noyau A (C6) et d'un noyau B où sont rattachés les carbones 2,3 et 4 (C6-C3).
- ➔ De nombreux travaux réalisés *in vivo* et *in vitro* (Neish *et al.*, 1964; Grisebach *et al.*, 1969, Kreuzaler *et al.*, 1972) ont permis de démontrer avec certitude que les 2 noyaux aromatiques A et B sont synthétisés par 2 voies différentes (**Figure 2**).
- ➔ Le noyau B ainsi que la chaîne intermédiaire à trois carbones proviennent d'une unité para-coumaroyl-CoA (13) dérivant de la voie shikimique.



- ➔ Le premier intermédiaire de réaction formé à ce niveau selon Heller *et al.*, (1980) est une molécule de la famille des **chalcones**, la naringénine chalcone (NC). Ce dernier semble être le point de départ des différentes classes de polyphénols.
- ➔ En effet, la chalcone-isomérase induit une cyclisation centrale et la formation de **flavones**, notamment la naringénine (NAR) qui sous l'action d'hydrolases, forment des **3-hydroxyflavones** ou **dihydroflavonols** avec 1, 2 ou 3 groupements OH sur le noyau B. Cette voie de biosynthèse est souvent décrite comme le "grid system"

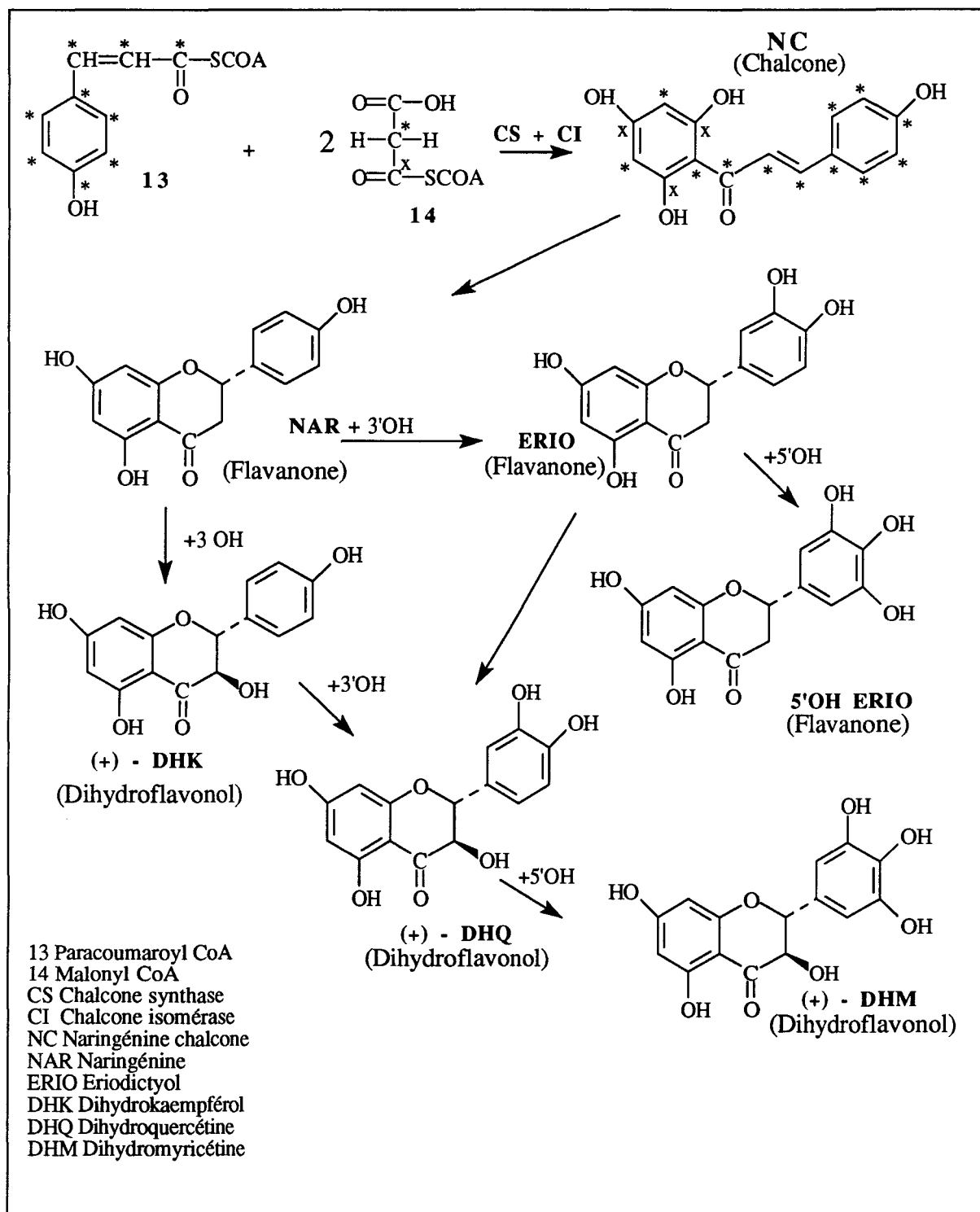


Figure 2 : Le "grid system" d'après Haslam *et al.*, (1986) : voie de biosynthèse des dihydroflavonols à partir des flavanones

(**Figure 2**) (Haslam *et al.*, 1986) car les hydrolases impliquées ne sont apparemment pas spécifiques et l'hydroxylation en position 3 et 3' peut s'effectuer de manière aléatoire dans la cellule.

- ➔ Les flavanones peuvent ensuite être oxydées (**Figure 3**) sous l'action des flavone-synthases I et II avec perte de 2 protons en position 2 et 3 pour conduire à la formation des **flavones** qui peuvent à leur tour, subir des réactions de glycosylation, acylation et/ou de méthylation.
- ➔ De leur côté, les 3-hydroxyflavanones ou dihydroflavonols peuvent être oxydés par la flavonol-synthase toujours par perte de deux protons en position 2 et 3 pour donner les **flavonols** qui seront par la suite eux aussi glycosylés, acylés ou méthylés. Sous l'action du NADPH, les dihydroflavonols peuvent être réduits sur le carbonyle en 4 pour aboutir à la formation des **anthocyanes** (**Figure 3**).

2. Proanthocyanidines

Avant que les structures définitives des proanthocyanidines ne soient connues, de nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer leur biogénèse. La difficulté majeure résidait dans l'explication de la formation des proanthocyanidines 2R, 3R (2,3 cis) qui prédominent dans les tanins des plantes.

- ➔ Certains chercheurs (Hathway *et al.*, (1957), Freudenberg *et al.*, (1959)) considèrent que les proanthocyanidines oligomères proviennent de la polymérisation oxydative d'un précurseur flavane-3-ol.
- ➔ Une autre hypothèse (Bate-Smith *et al.*, (1956), Geissmann *et al.*, (1965)) les considère comme le résultat de la condensation de flavane-3-4 diols avec un flavane-3-ol précurseur par catalyse acide.
- ➔ Birch proposa en 1963 une voie basée sur les intermédiaires chalcone et dihydroflavonol mais comme il n'y avait aucune certitude sur ces intermédiaires, d'autres séquences ont été envisagées.
- ➔ Roux *et al.*, (1974) proposèrent la transformation de l' α -hydroxychalcone en l'un ou l'autre des dihydroflavonols 2,3-cis ou 2,3-trans en passant par l'interconversion chalcone-flavone. Cependant la stéréochimie des dihydroflavonols de la plupart des plantes est 2,3- trans, alors que les proanthocyanidines 2,3-cis sont prédominantes.
- ➔ Foo *et al.*, (1986) conclut à partir des travaux sur le bois de coeur d'*Acacia malanoxylon* que les dihydroflavonols 2,3-cis et 2,3-trans sont formés après l'intervention d'une α - ou

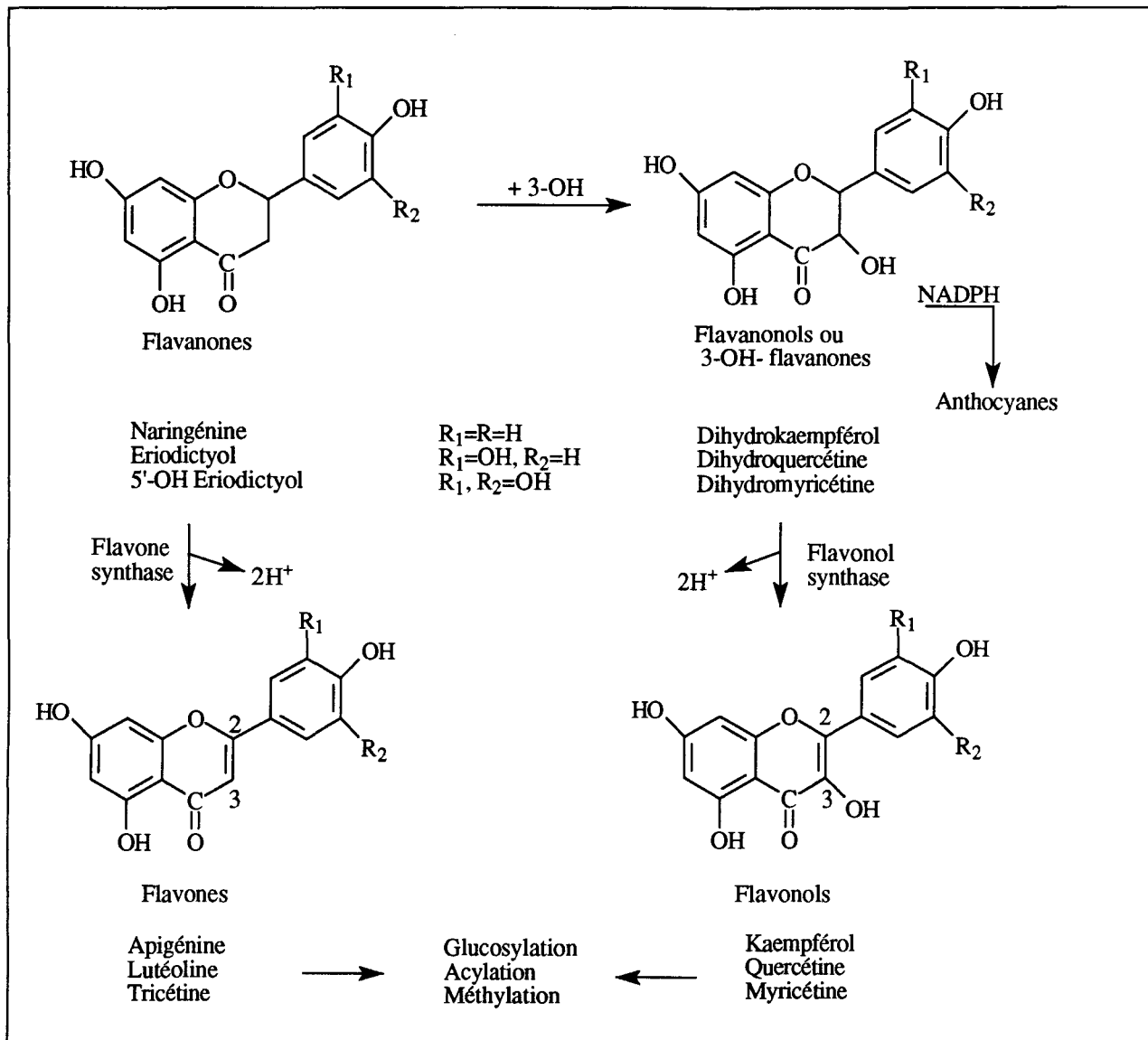


Figure 3 : Voie de biosynthèse des flavones, flavonols et anthocyanes à partir des flavanones et 3-OH-flavanones

β -hydroxylase, nécessaire à l'hydroxylation spécifique du carbone 3 de la flavanone sans exclure pour autant l'existence d'une C3 épimérase.

2.1 Schéma de Haslam

Les études de structure et les observations de la chimie des proanthocyanidines (Weinges *et al.*, (1968a), Thompson *et al.*, (1972)) amènent Jacques *et al.*, (1974) à proposer un premier schéma de biogénèse à partir du **flavanonol** formé à partir de l' α -hydroxychalcone (**Figure 4**).

Celui-ci serait synthétisé à partir de la condensation acétique de l'acide para-hydroxyphénylpyruvique conduisant ainsi au-delà, aux dérivés hydroxylés sur le carbone 3 (flavonoïdes). Le premier intermédiaire dans la voie menant aux flavanols serait le **flavénol**. Sous l'action d'une enzyme stéréospécifique, ce flavénol se transformerait en donnant l'un ou l'autre des 2 cations proanthocyaniques :

- soit avec la configuration de la (-) **épicatéchine** (2R, 3R)
- soit avec la configuration de la (+) **catéchine** (2R, 3S)

Les flavane-3-ols correspondent à l'étape ultime de la réduction du flavénol qui dépend de l'apport de NADPH (Haslam *et al.*, 1977a). En conséquence, si le milieu est :

- fortement réducteur : le cation est réduit en monomères (**catéchine, épicatéchine**)
- limité en NADPH : il y a formation de carbocations susceptibles de réagir avec un flavan-3-ol pour donner des **dimères**
- pauvre en éléments réducteurs : cela conduit à la formation **d'oligomères et de polymères**
- privé d'éléments réducteurs : on obtiendra des **d'anthocyanes**

Dans ce schéma de Haslam, l'existence de l'intermédiaire flavénol impose une stéréoisomérisation dans l'étape finale de la réduction, sous l'action d'une enzyme stéréospécifique. Certains des points dans ce schéma restent encore à démontrer. Plusieurs chercheurs ont proposé d'autres hypothèses.

C'est ainsi que Geissmann (1966) et Stafford (1982a) ont suggéré la formation d'un carbocation à partir des flavane-3-4-diols.

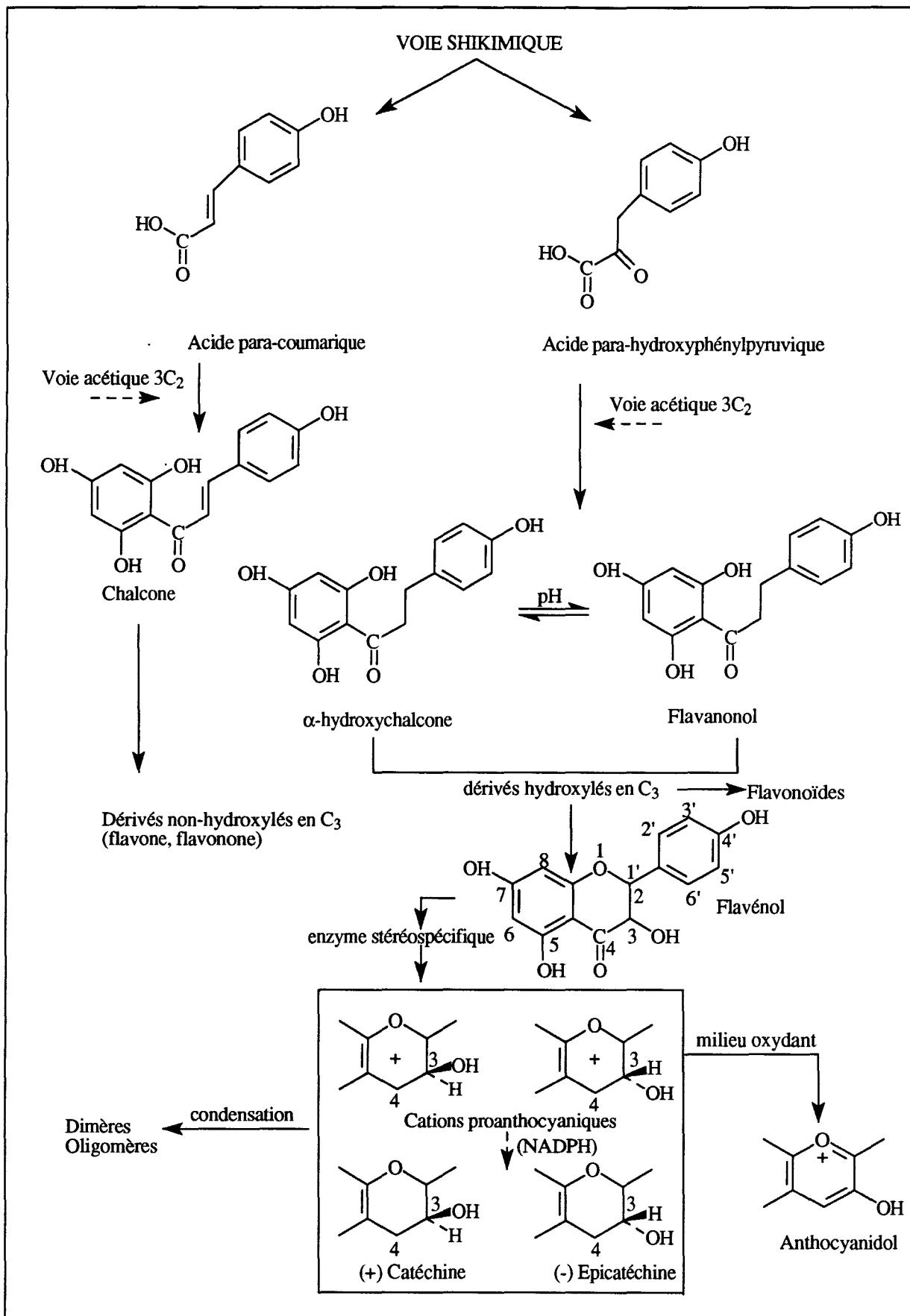


Figure 4 : Biogenèse des proanthocyanidines (hypothèses d'Haslam)

2.2 Schéma de Stafford et de Hemingway

Une série de travaux concernant le contrôle enzymatique des étapes de la biogénèse de proanthocyanidines a été effectuée avec des cultures de cellules de *Pseudotsuga menziesii* (Stafford *et al.*, (1982a,b, 1983, 1984)).

- ➔ L'intermédiaire clé dans le schéma proposé est la 2,3 trans (+) dihydroquercétine, véritable précurseur des flavane-3-ols. Mais si la 2,3-trans (+) dihydroquercétine est abondante dans les plantes, le dérivé 2, 3-cis n'a jamais été identifié. Stafford explique sa formation par la présence d'une épimérase qui transformerait donc la 2,3 trans-dihydroquercétine. L'épimérisation pourrait se produire également au niveau des flavane-3,4 diols qui se transformeraient en carbocations et seraient transférés à la surface des enzymes de condensation pour former avec les flavane-3-ols des oligomères à nombre d'unités flavanes variables (**Figure 5**).
- ➔ Hemingway *et al.*, (1985) ont proposé pour la biogénèse des proanthocyanidines 2,3- cis ou 2,3-trans, la voie quinone méthide pour remplacer la formation de flavane-4 carbocation (**Figure 5**).
- ➔ En accord avec le schéma de Stafford (**Figure 5**), la réduction enzymatique du dihydroflavonol donnerait le flavane-3,4 diol. Celui-ci, par élimination d'une molécule d'eau, formerait la quinone méthide qui par la suite, donnerait des oligomères et polymères.

En résumé en comparant les deux hypothèses généralement admises, la différence entre les biogénèses proposées par Haslam et par Stafford réside essentiellement dans la place de la réaction enzymatique et la stéréospécificité.

Haslam place cette séparation des isomères au niveau de la transformation du flavénol en carbocation optiquement actif, le précurseur unique étant le flavanonol (2,3-trans) naturel.

Stafford envisage plutôt la réaction chirale au niveau du précurseur. Cette deuxième hypothèse semble la plus acceptée malgré l'absence dans la nature de la 2,3-cis dihydroquercétine. De nombreux travaux se poursuivent dans ce domaine.

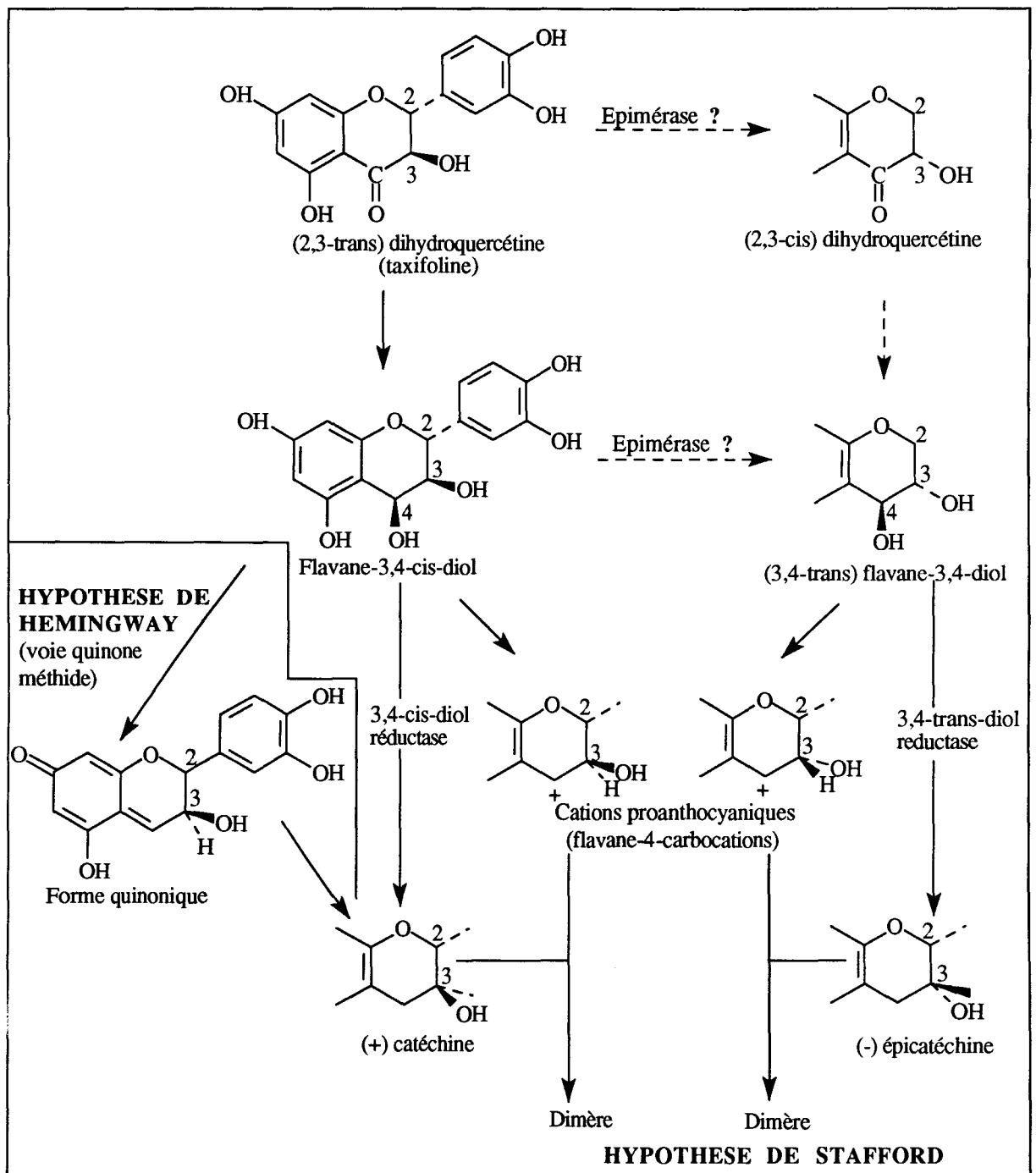


Figure 5 : Biosynthèse des proanthocyanidines (hypothèses de Stafford et de Hemingway).

II. COMPARTIMENTATION ET SITES DE BIOSYNTHESE

Les composés phénoliques peuvent s'accumuler dans tous les organes de plantes, notamment les feuilles, tiges, racines, fleurs et fruits. Différents travaux (Alibert *et al.*, 1977), (Hrazdina *et al.*, 1982) ont montré une localisation épidermique avec deux sites majeurs d'accumulation; la paroi cellulaire où sont déposées les lignines et la vacuole où sont accumulés les autres composés phénoliques. Les vacuoles sont probablement les sites d'accumulation de polyphénols tels que les anthocyanes, flavonoïdes et proanthocyanidines mais ne seraient pas les sites de biosynthèse (Wagner *et al.*, 1982a) qui devraient alors se situer à des endroits différents de la même cellule.

Hrazdina *et al.*, (1980) et Charrière-Ladreix *et al.*, (1981) ont montré que les chloroplastes ne sont pas impliqués dans la voie spécifique qui mène à la formation des lignines, des flavonoïdes et des proanthocyanidines alors qu'ils jouent un rôle dans le métabolisme d'autres composés phénoliques (Syrkin-Wurtele *et al.*, 1982).

Les travaux effectués sur *Catharanthus roseus* (Madyastha *et al.*, 1977) ainsi que les études menées par Wagner *et al.*, (1984) sur des protoplastes de *Hippeastrum* et des pétales de *Tulipa* ont permis, en isolant des enzymes comme la phénylammônia-lyase, la cinnamate-4-hydrolase, la chalcone-synthase, la chalcone-isomérase et une flavonoïde-glucosyl-transférase, de montrer leur association avec le réticulum endoplasmique.

Ces données biochimiques ainsi que des observations ultrastructurales suggèrent une compartimentation stricte de la synthèse et un système de transport spécifique des composés phénoliques dans la cellule. Ceci impliquerait que ces molécules ne soient pas présentes sous des formes libres et diffusibles dans le cytoplasme.

La voie métabolique pourrait être composée de complexes enzymatiques assemblés progressivement sur le réticulum endoplasmique pour donner en fin de synthèse des produits qui s'accumuleraient dans les vésicules et seraient transportés dans la vacuole centrale à des fins de stockage ou vers les membranes cellulaires pour sécrétion.

Ce modèle est de plus en plus utilisé pour expliquer la biosynthèse et l'accumulation des composés phénoliques. Les travaux de Conn (1979) montrent ainsi la présence d'un complexe multienzymatique sur le réticulum endoplasmique lors de la synthèse des hétérosides cyanogénétiques. Czichi *et al.*, (1977) signalent également la formation de l'acide paracoumarique par l'intermédiaire de complexes multienzymatiques dans les microsomes de la pomme de terre et du concombre. Cependant la présence de complexes enzymatiques pour l'ensemble de la voie des phénylpropanoïdes et des flavonoïdes reste à démontrer.

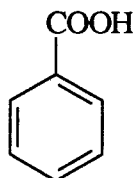
III. STRUCTURES

Les polyphénols peuvent être répartis en deux groupes. Cette classification rend compte des théories actuellement admises sur la biosynthèse de ces composés. Elle s'établit de la manière suivante :

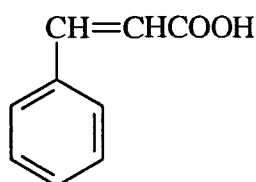
- Les acides phénols et dérivés composés en C₆, C₆-C₁, C₆-C₂, C₆-C₃
(acides benzoïques, acides cinnamiques, coumarines et dérivés).
- Les composés en C₆-C₃-C₆ flavonoïdes, anthocyanes, catéchines et leurs dérivés, proanthocyanidines et leurs dérivés.

1. Les Composés en C₆, C₆-C₁, C₆-C₂ et C₆-C₃

Parmi les **acides phénols**, les acides benzoïques (structure en C₇) et cinnamiques (structure en C₉) sont les plus répandus chez les végétaux (Harborne et Simmonds 1964a).

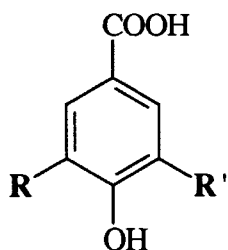


Acide benzoïque

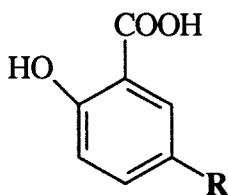


Acide cinnamique

Les acides benzoïques les plus représentés à la fois chez les Angiospermes et les Gymnospermes sont les suivants. Les radicaux sont représentés en gras.



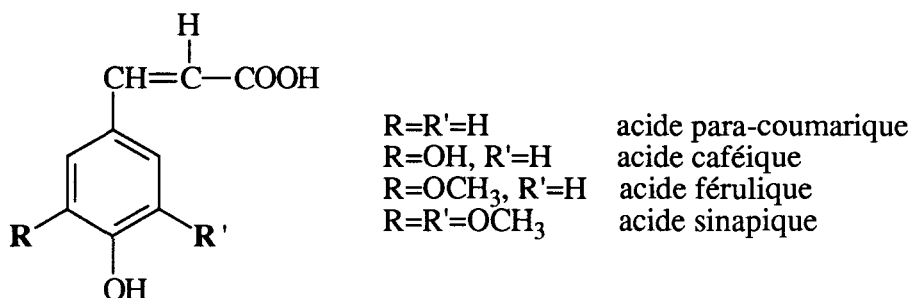
- R=R'=H acide para-hydroxybenzoïque
- R=OH, R'=H acide protocatéchique
- R=OCH₃, R'=H acide vanillique
- R=R'=OH acide gallique
- R=R'=OCH₃ acide syringique



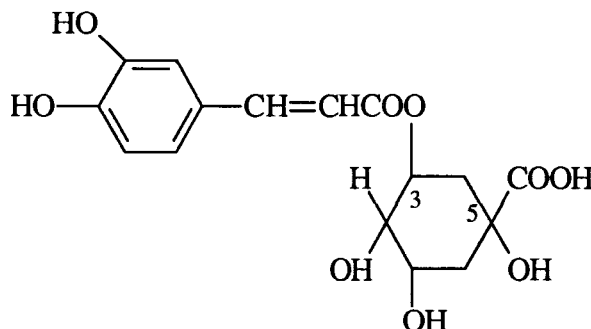
- R=H acide salicylique
- R=OH acide gentisique

Dans la série benzoïque les acides para-hydroxybenzoïque, vanillique et syringique sont des constituants des lignines. L'acide gallique très peu répandu à l'état libre dans les plantes, est plus souvent rencontré sous la forme dimérisée (acide ellagique) ou combinée avec des oses. Les dérivés d'acides gallique et ellagique sont des composants des tanins dits tanins hydrolysables ou tanins galliques.

Parmi les acides cinnamiques, les acides para-coumarique, caféique, férulique et sinapique sont bien connus et très largement répandus chez les végétaux. On les trouve également sous forme d'hétérosides.



Ces acides existent dans les tissus végétaux sous différentes combinaisons dont l'acide chlorogénique découvert dans le café (Ribéreau-Gayon, 1968). Cette molécule est un ester de l'acide caféique et d'un acide-alcool cyclique, l'acide quinique dont l'isomère le plus courant est l'acide caféyl-3-quinique. Ce type de combinaison est appelé depside.

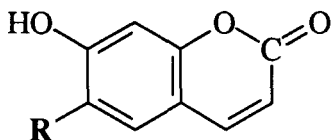


On connaît également d'autres dérivés de l'acide caféique et de l'acide quinique tels que l'acide néochlorogénique (l'acide caféyl-5-quinique) et l'acide isochlorogénique, qui est composé d'un mélange dont les trois principaux constituants sont des acides dicaféylquiniques.

Il existe par ailleurs, d'autres types de combinaisons des acides cinnamiques, en particulier avec des sucres. Parmi les exemples cités on trouve le mélilotoside (hétéroside de l'acide ortho-coumarique et du glucose), le para-coumaryl-1-glucose, le caféyl-1-glucose et le férulyl-1-glucose.

L'acide rosmarinique, qui tire son nom de *Rosmarinus officinalis*, résulte de la combinaison d'acides cinnamiques plus ou moins complexes. C'est un ester de l'acide caféique et de l'acide dihydroxy-3-4-phényl lactique. Un autre exemple cité est l'acide dicaféyltartrique plus connu sous le nom d'acide chicorique présent dans *Cichorium intybus*.

D'autres structures dérivées des acides phénols par cyclisation, telles que les coumarines, ont une répartition plus limitée dans la nature. Ces coumarines dérivent des acides cinnamiques ortho-hydroxylés et les plus fréquentes sont l'ombelliférone, l'aesculétine et la scopolétine. Elles sont le plus souvent présentes sous forme d'hétérosides.



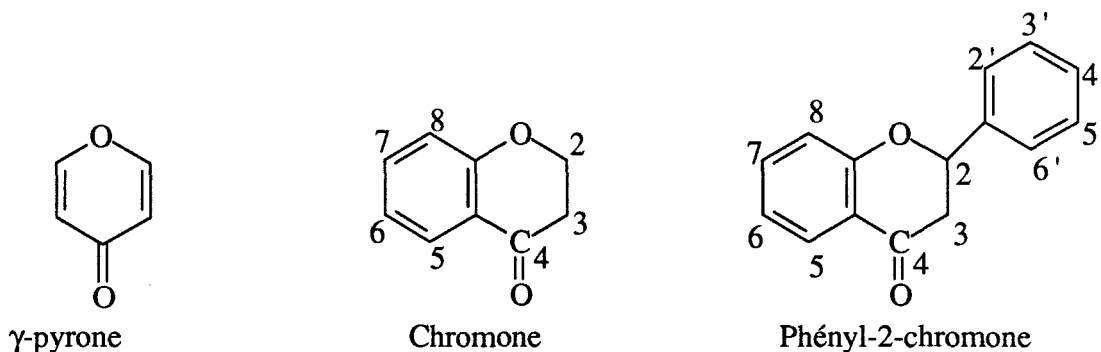
R=H ombelliférone
 R=OH aesculétine
 R=OCH₃ scopolétine

2. Les composés en C₆-C₃-C₆

2.1 Flavonoïdes au sens strict

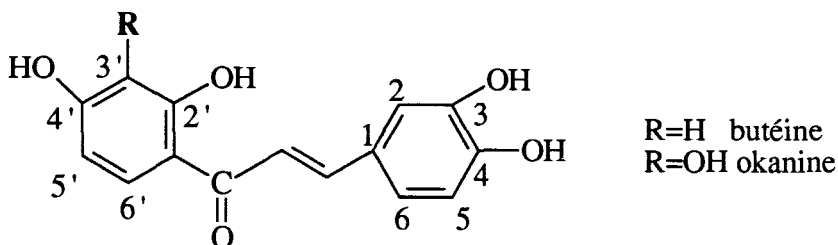
Les flavonoïdes sont des pigments généralement jaunes (latin = *flavus*) responsables de la coloration de nombreuses fleurs et de certains fruits. Largement distribués dans le règne végétal, ils existent le plus souvent sous la forme d'hétérosides. Ils sont très largement représentés chez les Angiospermes.

La majorité de ces composés (flavanones, dihydroxyflavanones ou dihydroflavonols, flavones et flavonols) ont comme noyau de base commun la phényl-2-chromone, la chromone étant le benzo- γ -pyrone.



2.1.1 Chalcones

Les **chalcones** et **dihydrochalcones** se distinguent des autres classes de flavonoïdes par l'absence d'hétérocycle central.

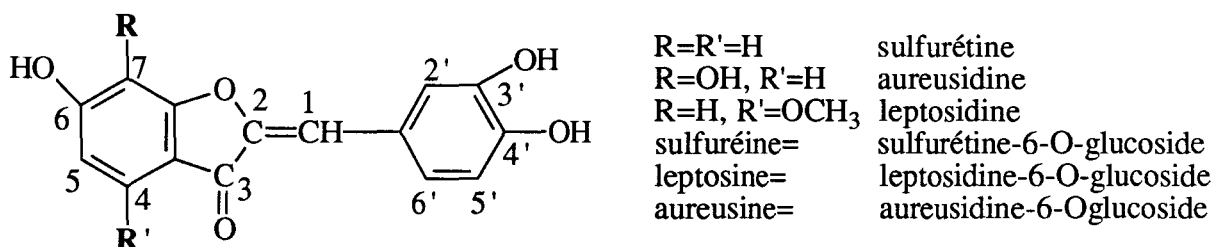


Ce sont des pigments jaunes à orangés, dont la coloration vire au rouge-orangé en présence de vapeurs d'ammoniaque. Ils sont responsables de la coloration des fleurs ou fruits chez certaines espèces de Composées, Oxalidacées, Liliacées Parmi celles-ci, on peut citer la butéine (des *Acacia* et de *Rhus*), l'isoliquiritigénine de la réglisse et l'okanine des *Acacia*.

Des études ont montré la présence de dérivés complexes hydroxylés, méthylés, étherifiés, prénylés et sous forme d'hétérosides. Les chalcones sont en général des composés instables et tendent à se cycliser pour former des flavanones.

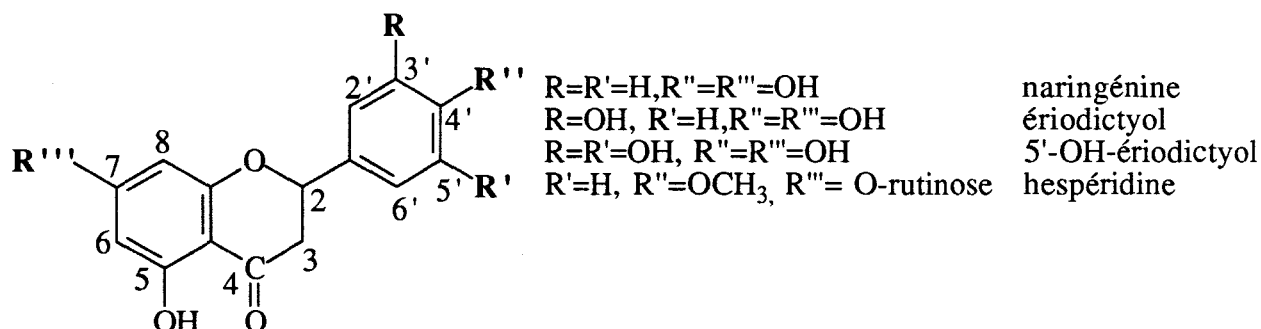
2.1.2 Aurones

Les **aurones** sont des molécules basées sur la structure de la 2-benzylidénecoumaranone et possèdent un hétérocycle central à 5 atomes. Jaunes, elles virent au rouge-orangé par exposition aux vapeurs d'ammoniaque.



Les aurones existent dans la nature sous forme de dérivés tels que la sulphurétine isolée par Harborne *et al.*, (1985) à partir d'espèces de *Cyperaceae*, l'aureusidine et la leptosidine, le plus souvent sous forme d'hétérosides notamment la sulfurétine identifiée dans *Zinnia linearis* (Harborne *et al.*, 1983) et dans *Clibadium trianae* (Bohm *et al.*, 1983), la leptosine rapportée dans des espèces de *Coreopsis* et l'aureusine dans *Mussaenda hirsutissima* (Harborne *et al.*, 1983)

2.1.3 Flavanones

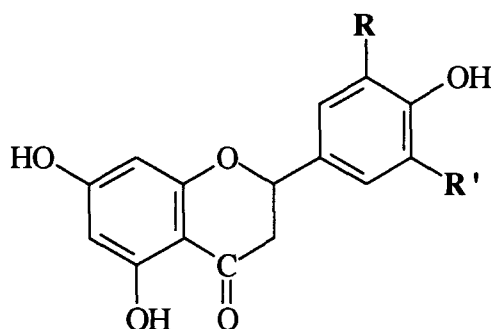


La structure des **flavanones** est caractérisée par la présence du noyau phényl-2-chromone et la saturation entre les carbones 2 et 3. Elles existent principalement sous forme d'hétérosides et sont diversement substituées. Les flavanones les plus fréquentes sont

l'hespéridine, la naringénine identifiée dans les *Citrus*, l'ériodictyol isolé dans les genres *Eriodictyon*, *Prunus* etc... (Shimokoriyama, 1962) et des espèces de *Mentha* (Bohm, 1988).

L'hespéridine est un des hétérosides de flavanones les plus connus; il s'agit du β -rutoside-7-hespéridine. Il a été mis en évidence depuis longtemps avec d'autres dérivés tels que la naringine, néohespéridine dans différentes espèces de *Citrus* dont les péricarpes d'oranges et de pamplemousses. Il sert notamment de matière première pour l'hémisynthèse des flavonoïdes vasculoprotecteurs utilisés en thérapeutique (diosmine : Daflon®).

2.1.4 Dihydroflavonols ou 3-hydroxyflavanones

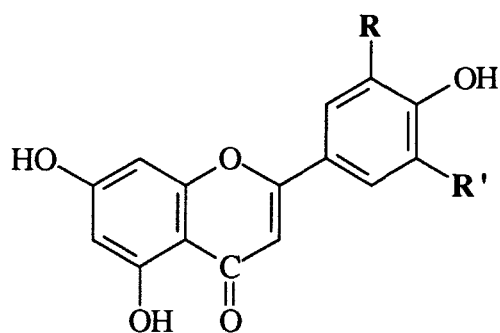


R=R'=H dihydrokaempférol
 R=OH, R'=H dihydroquercétine
 ou taxifoline
 R=R'=OH dihydromyricétine

Les **dihydroflavonols** sont caractérisés comme les flavanones par la saturation des C2 et C3 et par la présence d'un groupement hydroxyle sur le carbone 3. Les dihydroflavonols les plus courants dérivent du dihydrokaempférol, de la dihydroquercétine ou taxifoline trouvée dans les *Prunus* (Seshadri, 1962) et de la dihydromyricétine.

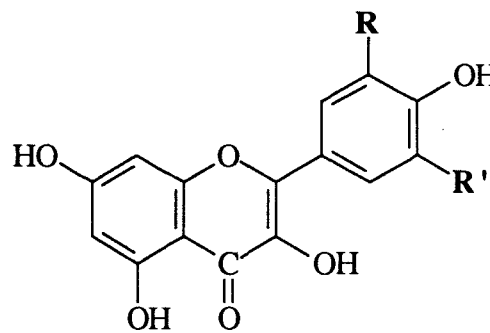
2.1.5 Flavones et flavonols

Les **flavones** et les **flavonols** sont les aglycones flavonoïdiques les plus répandus.



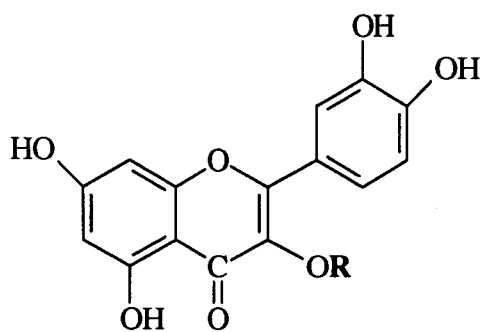
Flavone

R=R'=H Apigénine
 R=OH, R'=H Lutéoline
 R=R'=OCH₃ Tricine

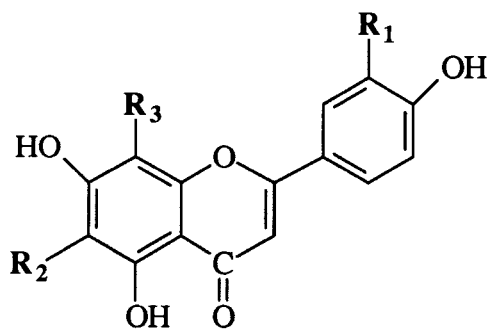


Flavonol

R=R'=H Kaempférol
 R=OH, R'=H Quercétine
 R=R'=OH Myricétine
 R=OCH₃, R'=H Isorhamnétine



	R
Quercétine	H
Hypéroside	Galactose
Rutine	Glucose +Rhamnose
Isoquercitrine	Glucose
Quercitrine	Rhamnose



	R1	R2	R3
Vitexine	H	H	Glucose
Orientine	OH	Glucose	H
Isovitexine	H	Glucose	H
Homoorientine	OH	H	Glucose

Figure 6 : Principaux dérivés de flavones et de flavonols

Ils diffèrent des flavanones par la présence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3. Ils existent majoritairement sous forme d'hétérosides, mais on rencontre aussi des aglycones chez les végétaux.

Les **flavones** sont dépourvues d'OH en 3 et les plus fréquentes sont l'apigénine, aglycone de l'apioside du Persil, la lutéoline de *Reseda luteola*, la tricine dans les graines d'*Orobancha ramosa* et la tricine 5-glucoside dans *Triticum vulgare* (Harborne, 1967).

Les **flavonols** se distinguent des flavones par l'existence d'un OH sur le carbone 3. Intervenant très peu dans la coloration jaune des fleurs et des fruits de par leur couleur jaunepâle ou incolore, ils sont les plus répandus de tous les flavonoïdes.

Les **aglycones** les moins hydroxylées ont pu être corrélées avec la production d'autres métabolites lipophiles tels que des terpénoïdes (Wollenweber et Dietz, 1981) et s'accumulent le plus souvent dans les tissus épidermiques (*Escallonia*, *Kalmia*, *Callistemon*) et dans les cires foliaires (*Eucalyptus*) (Wollenweber et Jay, 1988). De nombreux travaux ont montré l'existence d'aglycones comme le kaempférol à l'état libre dans *Citrus paradisi*. La quercétine a aussi été largement répertoriée dans de nombreuses familles dont les *Asteraceae*, *Passifloraceae*, *Rhamnaceae* et *Solanaceae* (Harborne, 1988).

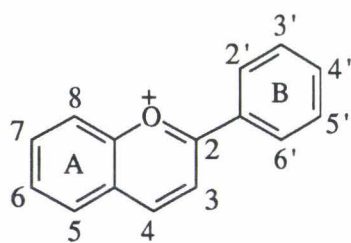
Dans le cas des **hétérosides**, les oses sont généralement fixés à l'aglycone par l'intermédiaire d'une liaison -C-O-C, établie par un OH phénolique, énoïque ou alcoolique du composé phénolique et un OH de la molécule glucidique. Les oses qui interviennent dans la structure des hétérosides sont le plus souvent des oses simples courants et aussi des acides uroniques (moins fréquents).

Les composés hétérosidiques les plus importants sont cités à la **figure 6**. Un des dérivés les plus connus, la rutine (quercétine-3-O-rutinoside) qui tire son nom de *Ruta graveolens* a été isolé chez de nombreuses espèces appartenant à des familles aussi différentes que les Polygonacées, Rutacées, Rosacées, Solanacées et Légumineuses (Paris, 1949). L'hypéroside (quercétine-3-O-galactoside) est très important dans les fleurs de *Crataegus monogyna* (Lamaison *et al.*, 1990a). D'autres composés comme la quercitrine (quercétine-3-O-rhamnoside) et l'isoquercitrine (quercétine-3-O-glucoside) sont largement répandus respectivement chez les *Quercus* et *Gossypium herbaceum* (Hattori, 1962). Des dérivés plus complexes tels que des flavonol-sulfates dérivés de quercétine, d'isorhamnétine, de rhamnétine et de kaempférol ont été mis en évidence dans des espèces d'Ombellifères (Harborne *et al.*, 1976).

Des travaux sur le pollen de *Crataegus monogyna* ont montré la présence de dérivés du kaempférol, le 8-méthoxykaempférol-3-néohespéridoside, le 8-méthoxykaempférol-3-glucoside, le 8-méthoxykaempférol et le kaempférol-3-néohespéridoside (Daughet *et al.*, 1993)

Il existe par ailleurs des **C-hétérosides** caractérisés par une liaison directe de l'aglycone avec l'ose par l'intermédiaire d'une liaison (-C-C-), de préférence sur le cycle A et souvent sur le carbone en position 6 ou 8. Les C-glucosylflavones ne s'hydrolysent pas dans les conditions habituelles d'hydrolyse acide des O-hétérosides.

Anthocyanidine	Substituants						
	3	5	6	7	3'	4'	5'
Structures répandues							
Pélagonidine	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Cyanidine	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Péonidine	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Delphinidine	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Pétunidine	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH
Malvidine	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
Structures plus rares							
Aurantidine	OH	OH	OH	OH	H	OH	H
6-Hydroxycyanidine	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H
5-Méthylcyanidine	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H
Rosinidine	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H
Pulchellidine	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH
Europinidine	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH
Capensinidine	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe
Hirsutidine	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe



Cation flavylium

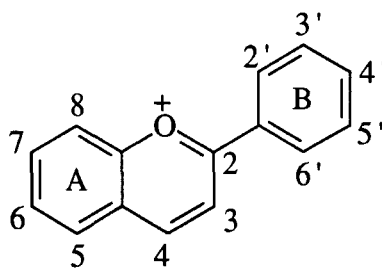
Tableau 1 : Structures et mode de substitution des anthocyanidines (Strack, 1989)

Les C-hétérosides les plus connus (**Figure 6**) sont la vitexine ou C-glucosyl-8-apigénine et l'orientine ou C-glucosyl-8-lutéoline. La vitexine et l'orientine ont été identifiées dans des espèces de *Spirodela* (Mac Clure *et al.*, 1968) et chez *Fagopyrum esculentum* (Margna *et al.*, 1967).

2.2 Anthocyanes

Les anthocyanes (du grec Anthos = fleur, Kyanis = bleu) sont des pigments hétérosidiques hydrosolubles responsables des colorations rouge, rose, pourpre, violette et bleue des fleurs et des fruits des plantes supérieures. On les trouve également dans d'autres organes comme des racines, des feuilles, des tiges et des hypocotyles où elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques ou subépidermiques (Wagner *et al.*, 1982) et plus précisément dans des organites décrits comme des anthocyanoplastes (Pecket *et al.*, 1980).

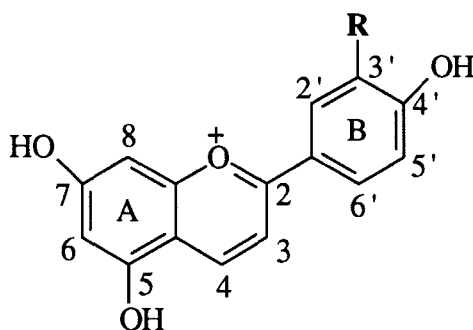
Les 6 anthocyanidines (aglycones) les plus fréquemment rencontrées sont : la pélargonidine, la cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine. La cyanidine est de beaucoup la plus fréquente. Tous ces composés ont le même squelette fondamental en C₆-C₃-C₆, le noyau phénylbenzopyrylium ou flavylium.



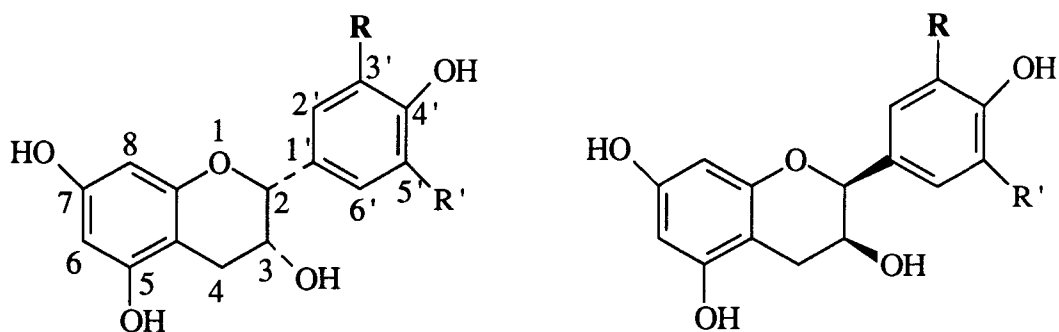
Cation flavylium

Toutes les anthocyanidines ont un groupement hydroxyle en position 3 et sont souvent di- ou tri- substituées sur le cycle B. Habituellement, les positions 4', 5 et 7 sont substituées par des OH phénoliques libres (**Tableau 1**).

A côté de ces structures principales, il existe des anthocyanidines moins connues pour lesquelles les OH en 5 ou 7 sont méthylés et d'autres, plus rares, sans OH en position 3, ont été rencontrées chez des fougères (Harborne, 1966).



R=H apigéninidine
R=OH lutéolinidine



- 1) R=OH, R'=H
- 2) R=R'=OH
- 3) R=R'=H
- 7) R=OH, R'=H
- 8) R=R'=OH
- 9) R=R'=H

- 4) R=OH, R'=H
- 5) R=R'=OH
- 6) R=R'=H
- 10) R=OH, R'=H
- 11) R=R'=OH
- 12) R=R'=H

- 1) : (-) Epicatéchine (2R, 3R)
- 2) : (-) Epigallocatechine (2R, 3R)
- 3) : (-) Epiafzéléchine (2R, 3R)
- 4) : (+) Epicatéchine (2S, 3S)
- 5) : (+) Epigallocatechine (2S, 3S)
- 6) : (+) Epiafzéléchine (2S, 3S)
- 7) : (+) Catéchine (2R, 3S)
- 8) : (+) Gallocatechine (2R, 3S)
- 9) : (+) Afzéléchine (2R, 3S)
- 10) : (-) Catéchine (2S, 3R)
- 11) : (-) Gallocatechine (2S, 3R)
- 12) : (-) Afzéléchine (2S, 3R)

Figure 7 : Structure et nomenclature des flavane-3-ols.

Les anthocyanes se trouvent principalement dans les tissus sous forme de 3-monosides comme la chrysanthémine ou kuromanine (cyanidine-3-O-glucoside), de 3-biosides, de 3-triosides et de 3,5-diosides comme dans les *Delphinium* (delphinidine-3,5 diglucoside) et aussi plus rarement sous forme de 3,7-diosides.

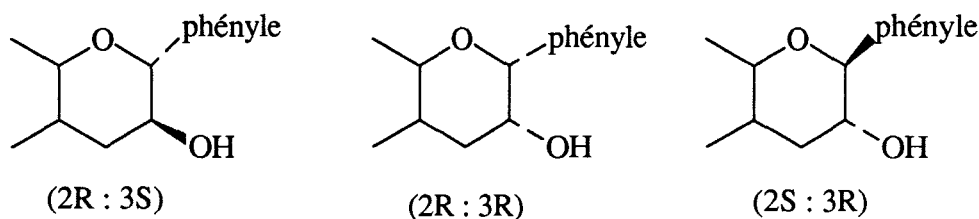
La présence d'anthocyanes sous forme acylée nécessite une mention particulière. Les groupements acyl impliqués sont généralement des acides phénols plus particulièrement l'acide para-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique et plus rarement des acides hydroxybenzoïques (Harborne, 1964b). Un bon exemple pour montrer la complexité de certaines anthocyanes est celle connue sous le nom de " heavenly blue anthocyanin" (HBA) isolée à partir des pétales bleus de *Volubilis* des jardins (*Ipomoea tricolor*) (Asen *et al.*, 1977) et qui est constituée de péonidine liée à 6 molécules de glucose et à 3 molécules d'acide caféique (péonidine-3-sophoroside-5-glucoside-tri (caféylglucose ester)).

L'acylation se fait également par l'intermédiaire d'acides aliphatiques notamment des groupements malonyl, succinyl et plus rarement par de l'acide oxalique et l'acide malique. Citons par exemple, la cyanidine-3-dimalonyl glucoside de *Coleostephus myconis*, la delphinidine-3,5-di(malonylglucoside) de *Cichorium intybus* (Takeda *et al.*, 1986), la cyanidine-3-(6"-succinylglucoside)-5-glucoside du Bleuet, *Centaurea cyanus* (Harborne et Grayer, 1988) et la cyanidine-3-(6"-oxalylglucoside) d'espèces d'*Ophrys* (Strack *et al.*, 1986)

2.3 Flavane-3-ols et dérivés

2.3.1 Flavane-3-ols

Les flavane-3-ols dérivent du chromane, ne comportent pas de carbonyle en C4 (remplacé par un groupement méthylénique en C4) et sont hydroxylés en C3. Leur hétérocycle central comporte 2 atomes de carbone asymétriques, les C2 et C3. Dans les différentes classes de flavane-3-ols on peut théoriquement toujours compter 4 stéréoisomères selon la configuration des groupements phényle et hydroxyle des centres asymétriques C2 et C3. La structure la plus souvent rencontrée est celle ayant la conformation (2R : 3R). Il existerait aussi des conformations (2S : 3S) et (2R : 3S).



Selon le degré d'hydroxylation du cycle B, on peut diviser en 3 classes courantes (Figure 7) :

→ Les flavane-3-ols tétrahydroxylés en 3,5,7 et 4'.

(+) Afzéléchine	(-) Afzéléchine
(-) Epiafzéléchine	(+) Epiafzéléchine

→ Les flavane-3-ols pentahydroxylés en 3,5,7, 3', et 4'.

(+) Catéchine	(-) Catéchine
(-) Epicatéchine	(+) Epicatéchine

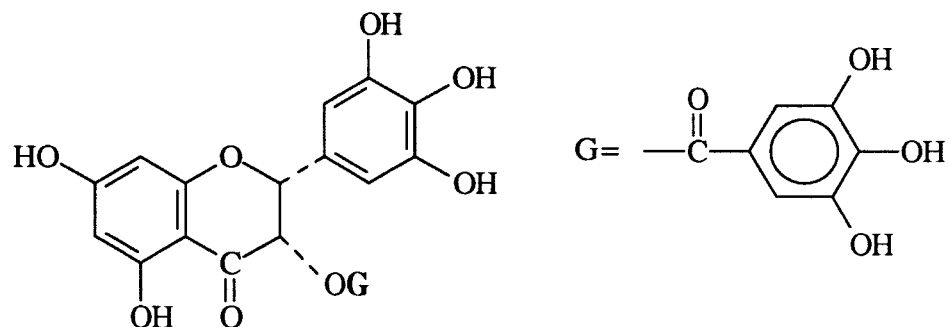
→ Les flavanes-3-ols hexahydroxylés en 3, 5, 7, 3', 4', et 5'.

(+) Gallocatéchine	(-) Gallocatéchine
(-) Epigallocatéchine	(+) Epigallocatéchine

Les plus répandus dans la nature sont la (+) catéchine, la (-) épicatéchine, la (+) gallocatéchine et (-) épigallocatéchine et on ne saurait ici énumérer les espèces qui en contiennent. On en trouve des quantités importantes dans *Uncaria gambir*, *Acacia catechu* et *Thea sinensis* (Bruneton, 1987) et ils sont le plus souvent à l'état libre. Quoique très rare, la (+) épicatéchine a été trouvée dans la famille des *Palmae* (Delle Monache *et al.*, 1972) et a aussi été isolée avec de la (-) catéchine sous la forme de gallate à partir de *Polygonum multiflorum* (Nonaka *et al.*, 1982). La (+) afzéléchine et la (-) épicatéchine ont été isolées à partir d'*Eucalyptus calophylla* par Hillis et des espèces d'*Afzélia* par King (Porter, 1988) tandis que la (+) épiafzéléchine a été trouvée dans *Livinstona chinensis* (Delle Monache *et al.*, 1972).

2.3.2 Flavane-3-ols estérifiés par l'acide gallique

Les flavane-3-ols peuvent exister sous forme d'esters de l'acide gallique qui est fixé le plus souvent sur l'OH en 3 et peut être détaché par hydrolyse soit enzymatique (action de la tannase) soit chimique.

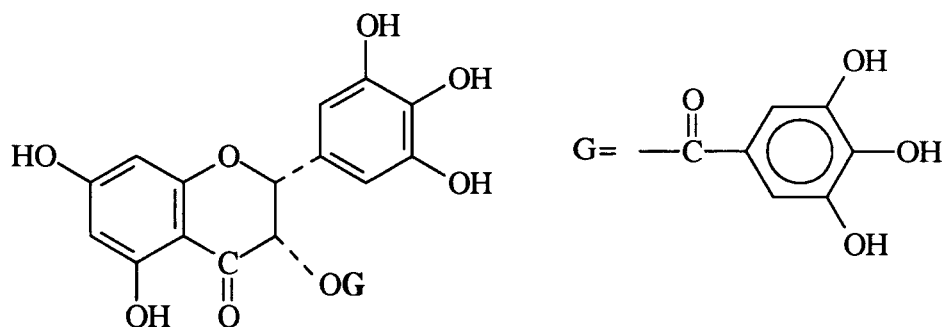


(-) Epicatéchine-3-O-gallate

Parmi ces composés, on peut citer la (+) catéchine-3-O-gallate isolée par Haslam en 1969 à partir du genre *Bergenia*. La (-) épicatechine-3-O-gallate est surtout abondante dans le thé (*Thea sinensis*) et se rencontre également dans le raisin (*Vitis vinifera*), les vins (Lea *et al.*, 1979) les racines de *Polygonum multiflorum* (Nonaka *et al.*, 1982) etc....

N.B : Il faut rappeler ici que l'appellation "**gallocatéchine**", "**épigallocatéchine**" correspond à un usage ancien, perpétué dans la littérature, qui peut être trompeur car voulant évoquer la trihydroxylation du cycle B sans préjuger d'une estérification par l'acide gallique.

L' épigallocatéchine-3-O-gallate est très abondante dans le thé.



(-) Epigallocatéchine-3-O-gallate

Il existe d'autres dérivés acylés plus rares où la galloylation n'intervient pas en position 3 comme la (+) catéchine-7-O-gallate de *Sanguisorba officinalis* (Tanaka *et al.*, 1983).

2.3.3 Dérivés hétérosidiques

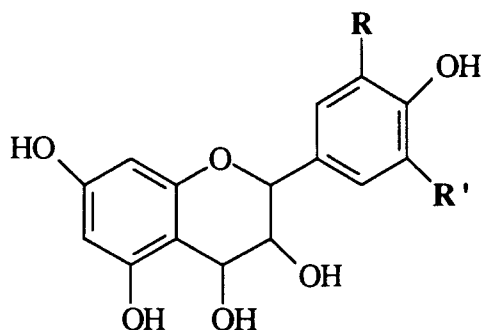
Les formes C- et O- hétérosidiques de flavane-3-ols ne se rencontrent qu'exceptionnellement avec une position variable de la liaison glucidique et n'ont été isolés que récemment. Des glucopyranosides de (+) catéchine, (-) catéchine, (-) épicatechine et (-) épiafzéléchine ont été identifiés dans les rhizomes de *Rheum* (Nonaka *et al.*, 1983a), chez *Raphiolepis umbellata* (Ezaki-Furuichi *et al.*, 1986) et *Crataeva religissa* (Sethi *et al.*, 1984).

Par ailleurs, Doskotch *et al.*, (1973) ont signalé la présence de la (+) catéchine-7- β -D xylopyranoside dans *Ulmus americana* et Bonnefeld *et al.*, (1986) ont isolé de la (+) catéchine-3-O- α -L-rhamnopyranoside à partir de tiges d'*Erythroxylum novogranatense*.

2.3.4 Flavane-3,4 diols

Initialement appelés "leucoanthocyanes" par Rosenheim (1920), les flavanes-3-4-diols ont été rattachés par la suite aux proanthocyanidines car ils donnent aussi une coloration rouge irréversible en milieu acide. Ce sont donc de vraies proanthocyanidines monomères. La première structure d'un flavane-3-4-diol de synthèse de la série catéchique a été établie par Swain en 1954 (Haslam, 1982).

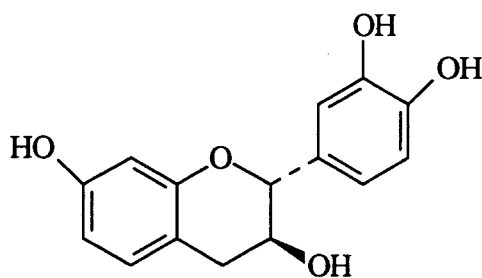
Ces composés ont été isolés principalement à partir d'espèces d'*Acacia*. Quelques exemples sont constitués par la (+) mollisacacidine, identifiée dans *Acacia mearnsii*, la leucofisetidine isolée de *Schinopsis lorentzii* et la (+) leucorobinetidine de *Robinia pseudoacacia*. La leucopélargonidine, la leucocyanidine et la leucodelphinidine ont été signalées dans *Ephedra helvetica* (Friedrich *et al.*, 1976).



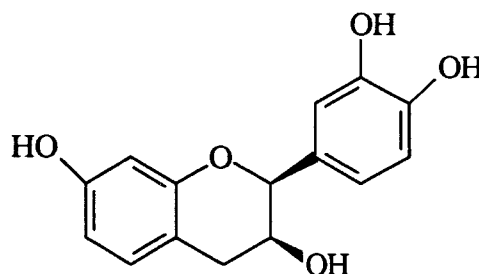
R=OH	flavane-3,4-diols
R=R'=H, R''=OH	leucofisetidine
R=H, R'=R''=OH	leucorobinetidine
R=OH, R'=R''=H	leucopélargonidine
R=R''=OH, R'=H	leucocyanidine
R=R'=R''=OH	leucodelphinidine
R=R'=H, R''=OH	mollisacacidine
R=H	5-déoxyflavane-3,4-diols

2.3.5 5-déoxyflavane-3-ols

Les 5-déoxyflavane-3-ols comprennent des composés comme la (-) fisétinidine et le (+) épifisétinidine qui ont été isolés du bois de coeur de *Colophospermum mopane* (Botha *et al.*, 1981a).



(-) Fisétinidine



(+) Epifisétinidine

2.3.6 Proanthocyanidines

Ces substances constituent les "tanins catéchiques" ou "tanins condensés" de nombreux végétaux, leur nom actuel de proanthocyanidines vient du fait qu'elles fournissent des anthocyanes notamment la cyanidine par chauffage en milieu acide, par exemple dans le butanol-chlorhydrique. Il existe par ailleurs des prodelphinidines qui par chauffage en milieu acide donnent de la delphinidine.

2.3.6.1 Oligomères : dimères

Les proanthocyanidines dimères, qui correspondent au degré de condensation le plus faible, peuvent schématiquement être considérées comme résultant de la condensation de deux

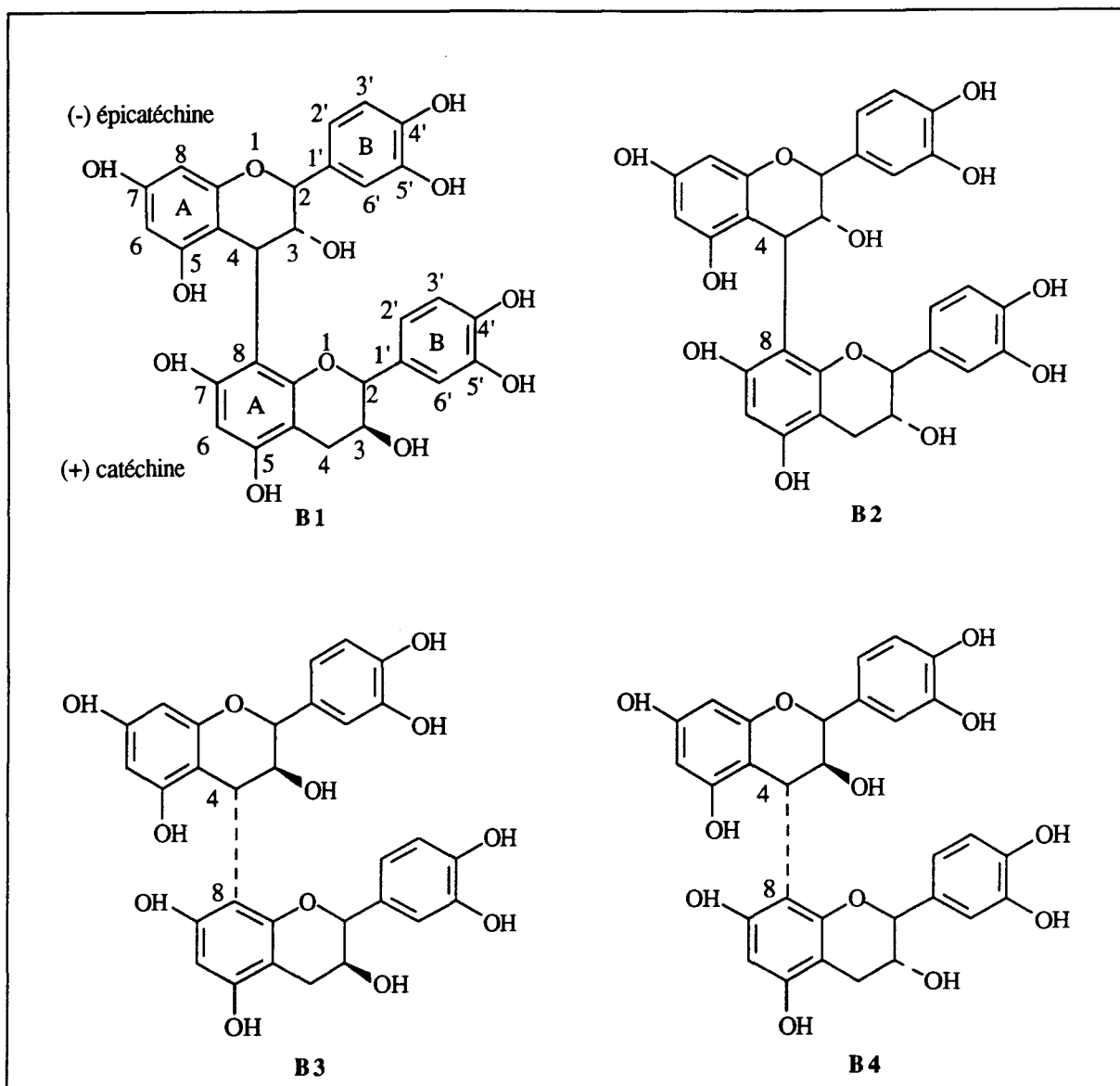


Figure 8 : Principaux dimères de proanthocyanidines

Type	Sous unité supérieure	Sous unité inférieure	Liaison interflavane	Configuration du C4
B1	(-) Epicatechine	(+) Catéchine	C4-C8	R
B2	(-) Epicatechine	(-) Epicatechine	C4-C8	R
B3	(+) Catéchine	(+) Catéchine	C4-C8	S
B4	(+) Catéchine	(-) Epicatechine	C4-C8	S
B5	(-) Epicatechine	(-) Epicatechine	C4-C6	R
B6	(+) Catéchine	(+) Catéchine	C4-C6	S
B7	(-) Epicatechine	(+) Catéchine	C4-C6	R
B8	(+) Catéchine	(-) Epicatechine	C4-C6	S

Tableau 2 : Proanthocyanidines dimères (d'après Metche, 1980)

sous-unités flavanes de type (+) catéchine, (-) épicatechine, (-) épicatechine gallate, (+) épigallocatechine etc..., liées entre elles par l'intermédiaire d'une liaison le plus souvent C4-C8 ou moins fréquemment C4-C6. Ce sont notamment les travaux de Geissman (1965), Weinges, (1968b), Thompson, (1972) et plus tard Engel (1978) qui ont démontré la présence des liaisons interflavoniques C4-C8 et C4-C6.

Dimères de la série B

Les dimères du groupe B, unis par une liaison C4-C8 ou C4-C6 possèdent cinq atomes de carbone asymétriques, ce qui suppose 32 isomères possibles. Les 2 épimères, (+) catéchine et (-) épicatechine sont presque les seuls rencontrés bien que les énantiomères (-) catéchine et (+) épicatechine aient été signalés dans la sève d'*Acacia catechu*.

Les quatre dimères à liaison C4-C8, les plus fréquents et les plus abondants, ont été isolés par Weinges (1968b) sous forme d'acétates désignés par les lettres B1, B2, B3, et B4. (**Figure 8**). En 1972, Thompson réussit à isoler ces 4 dimères sous forme phénolique et il les identifie aux dimères B1, B2, B3 et B4 de Weinges.

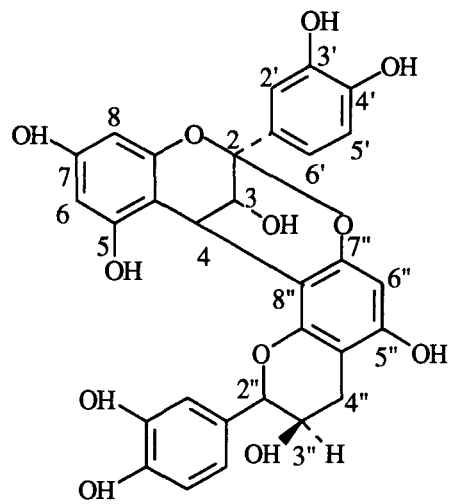
De plus, il identifie 4 autres dimères à liaison C4-C6 qu'il considère comme des isomères des premiers et qu'il nomme B5, B6, B7 et B8. Par la suite d'autres travaux ont été effectués sur la stéréo-isomérisation des dimères de procyanidines ou de celles de leurs homologues prodelphinidines.

Citons les études menées par Haslam *et al.*, (1977b), Fletcher *et al.*, (1977), Foo *et al.*, (1978), Barrett *et al.*, (1979), Delcour *et al.*, (1985), Kolodziej *et al.*, (1985, 1986). On connaît actuellement la structure exacte d'un nombre important de proanthocyanidines dimères dont les 8 principales figurent dans le **tableau 2**.

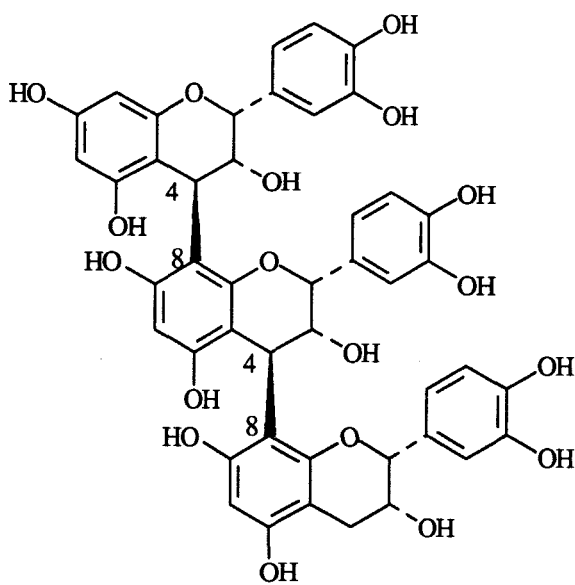
Il faut noter que ces huit dimères ont aussi été obtenus par synthèse à partir de flavanes-3,4-diols et de la (+) catéchine ou de la (-) épicatechine. Le flavane-3,4-diol-2,3-trans a été obtenu par réduction de la dihydroquercétine et le flavane-3,4-diol-cis à partir de la (-) épicatechine tétraméthyl éther dans le benzène anhydre en présence d'acétate de plomb (Kolodziej *et al.*, 1986)

Les liaisons C-C interflavanes sont facilement rompues en milieu acide et dans le cas du dimère B2 on obtient la (-) épicatechine provenant de la sous-unité flavane supérieure qui est un intermédiaire très réactif se transformant, avec perte de protons en flavène-3-ol-3 pour donner ensuite, par oxydation, **la cyanidine**.

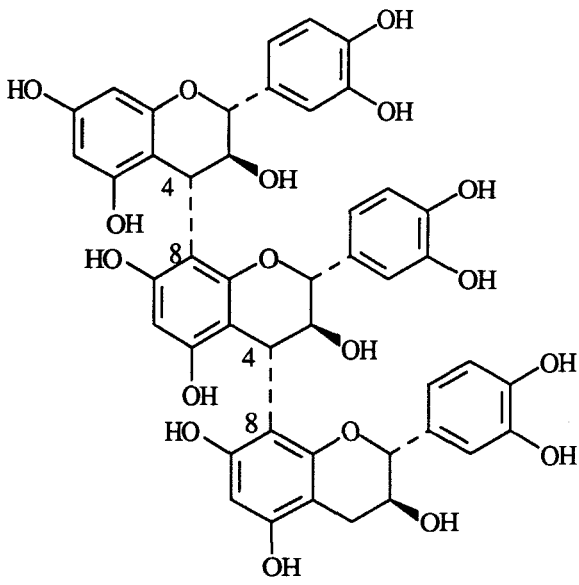
Les dimères sont généralement sous forme phénolique libre, mais des dimères gallates ont été signalés. Des dimères mono- et di-gallates coexistent dans des extraits contenant des flavanes-3-ols estérifiés. Ils sont abondants dans le thé vert, *Thea sinensis* et dans *Polygonum multiflorum* (Nonaka *et al.*, 1982).



Procyanidine A2



Trimère C1



Trimère C2

Figure 9 : Structures de la proanthocyanidine dimère A2 et des trimères C1 et C2

Les gallates de prodelphinidines sont ceux que l'on rencontre le plus souvent. A partir du thé vert, (*Thea sinensis*) Nonaka *et al.*, (1984), ont signalé la présence de la prodelphinidine dimère (-) épigallocatechine- (4→8)-(-) épicatechine-3-O-gallate. Sun et son équipe ont également isolé la prodelphinidine (-) épigallocatechine-3-O-gallate (4→8)-catéchine de *Quercus dentata* en 1987. Ces proanthocyanidines gallates sont trouvées dans un nombre limité d'espèces parmi lesquelles on peut citer la Rhubarbe de Chine *Rheum palmatum*, et la vigne *Vitis vinifera* (Boukharta *et al.*, 1988a).

Des dimères hétérosidiques ont été isolés, notamment la procyanidine B2-8-C-β-D-glucopyranoside et la procyanidine B2-6C-β-D-glucopyranoside de l'écorce de la Cannelle de Chine *Cinnamomum cassia* (Morimoto *et al.*, 1986) ainsi que les procyanidines B2-3-O-α-L-rhamnopyranoside et B3-3"-O-α-L-rhamnopyranoside de l'écorce de *Quercus miyagii* (Ishimaru *et al.*, 1987).

Dimères de la série A

Les procyanidines A semblent beaucoup moins répandues que les procyanidines B. Il existe ici une liaison interflavanique C2-O-C7 en plus de la liaison C4-C8. Les dimères A et notamment le dérivé A2 (**Figure 9**) ont été notamment isolés du marron d'Inde, *Aesculus hippocastanum* (Michaud *et al.*, 1978.), de la noix de cola (Weinges *et al.*, 1965), de *Vaccinium vitis-idaea* (Thompson *et al.*, 1972, Jacques *et al.*, 1974) et de la Cannelle de Ceylan *Cinnamomum zeylanicum* (Nonaka *et al.*, 1983b).

2.3.6.2 Autres oligomères

Le phénomène de condensation peut se poursuivre, donnant ainsi naissance aux autres oligomères, puis aux polymères. La complexité de la structure de ces molécules grandit avec l'augmentation du nombre d'unités constitutives et leurs substituants. L'usage distingue suivant l'hydroxylation du cycle B, des oligomères **homogènes**, dont toutes les unités ont la même formule globale, et des oligomères **non homogènes** ou **mixtes**. Parmi les dérivés homogènes on cite le plus souvent les procyanidines qui ne donnent que de la cyanidine par hydrolyse et les prodelphinidines qui donnent uniquement de la delphinidine.

Parmi les proanthocyanidines trimères homogènes de type B on peut citer le **trimère C1** (épicatechine-(4β→8)-épicatechine-(4β→8)épicatechine) et **C2** (catéchine-(4α→8)-catéchine (4α→8)-catéchine) comme ceux de *Theobroma cacao* et de *Salix caprea* (**Figure 9**).

De même des tétramères, pentamères et hexamères formés d'unités (+) catéchine et (-) épicatechine liées entre à liaisons C4-C6 et / ou C4-C8 ont été caractérisés dans l'écorce de *Cinnamomum cassia* (Morimoto *et al.*, 1986) et dans *Dioscorea cirrhosa* (Hsu *et al.*, 1985).

Des proanthocyanidines trimères homogènes de type A, notamment la D1 (épicatéchine-(4 β →8), 2 β →7)-épicatéchine-(4 α →8)-épicatéchine) et la D2 (épicatéchine-(4 β →8, 2 β →7)-épicatéchine-(4 α →8)- épicatéchine) ont été isolés de *Persea gratissima* et d'*Aesculus hippocastanum* (Jacques *et al.*, 1974).

Des trimères non homogènes comme la catéchine-(4 α →8)-gallocatéchine-(4 α →8)-catéchine et la gallocatéchine-(4 α →8)-catéchine-(4 α →8)-catéchine ont été signalées dans l'orge par Outtrup en 1981.

Par ailleurs, des trimères et tétramères à constituants monohydroxylés sur le cycle B telles que les profisetidines, prorobinétidines ont aussi été répertoriés chez les *Acacia* (Botha *et al.*, (1981b).

2.3.6.3 Polymères

La plus grande proportion de proanthocyanidines présentes dans les plantes correspond aux polymères. Dans certaines espèces de Légumineuses fourragères, Jones (1976) évalue la fraction polymère à 90-99% de l'ensemble des flavanols. La longueur moyenne des chaînes de proanthocyanidines est très variable. Elle peut atteindre 20-30 unités, sinon plus, dans certains cas. La connaissance de la structure de ces composés présente un intérêt pour la compréhension de leurs propriétés tannantes et astringentes.

Ces composés sont constitués soit uniquement de sous-unités procyanidines ou prodelfinidines soit plus souvent de structures mixtes. Des mesures en RMN indiquent que les polymères ont souvent des structures ramifiées contrairement aux structures linéaires anciennement proposées (Mattice *et al.*, 1984).

Foo *et al.*, (1980, 1982) ont signalé que la structure 2,3-cis (correspondant aux poly (-) épicatéchines) est la plus fréquente parmi 38 polymères identifiés à partir de 14 familles de plantes. Des résultats obtenus sur d'autres plantes, notamment des Légumineuses fourragères (Czochanska *et al.*, 1980) et des Monocotylédones (Ellis *et al.*, 1983) semblent conforter cette hypothèse.

D'autres polymères avec des unités galloylées ont été isolés de l'écorce de *Quercus dentata* (Sun *et al.*, 1987). Par ailleurs, des fruits de *Cydonia oblonga* et l'écorce de *Pinus brutia* et de *Picea abies* contiennent des tanins possédant des sous-unités hétérosidiques (Porter *et al.*, 1985).

IV. ROLE, IMPORTANCE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES COMPOSES PHENOLIQUES

1. Dans la plante

L'intégration du métabolisme phénolique dans le programme général de développement d'un organe végétal pose en elle-même la question d'un rôle éventuel de ces substances. Des travaux plus anciens (Nitsch *et al.*, (1961), Engelsma *et al.*, (1969), Paupardin *et al.*, (1972), Thakur *et al.*, (1977), Alibert *et al.*, (1977) ont montré que les phénols seraient associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation organogène, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation, lignification....

Les polyphénols interviennent dans la qualité alimentaire des fruits. Les anthocyanes (rouge et violacé) et certains flavonoïdes (jaune) participent à la coloration des fruits mûrs. A titre d'exemple, les diverses variétés de raisins présentent des proportions relatives variables entre les différentes anthocyanes, proanthocyanidines et catéchines. Les composés phénoliques déterminent également la saveur des fruits : les tanins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs (Macheix *et al.*, 1982), les flavanones sont responsables de l'amertume des Citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée (Dubois *et al.*, 1977).

Des composés phénoliques sont impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. Des phénols simples sont synthétisés et l'activité peroxydasique caractéristique des tissus en voie de lignification est stimulée. Ces réactions aboutissent à la formation au niveau de la blessure d'un tissu cicatriciel résistant aux infections (Fleuriet *et al.*, 1977).

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Rees *et al.*, 1985).

Dans certains cas, lorsque les végétaux sont soumis à des agressions parasitaires, des substances nouvelles peuvent apparaître et participer à la défense du végétal. Il s'agit de phytoalexines de nature phénolique (isoflavones) (Parberry *et al.*, 1984).

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs (insectes et oiseaux). La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et fruits (Koes *et al.*, 1994). La présence de composés phénoliques tels que des flavones, flavonols, flavanones et dérivés de flavanes serait un facteur important favorable à la ponte, (oviposition) de certains insectes (Feeny *et al.*, 1992).

Des études ont montré que les flavonoïdes s'accumulent préférentiellement au niveau de l'épiderme supérieur des feuilles et suggèrent le rôle de filtre anti-U.V. de ces composés (Middleton *et al.*, 1993).

Des polyphénols participeraient activement à la reproduction sexuelle des plantes. En effet des anthocyanes, des flavonols et des chalcones joueraient un rôle essentiel dans le développement du pollen et du tube pollinique (Koes *et al.*, 1994).

Les polyphénols, plus particulièrement des flavonoïdes, sont impliqués dans des interactions symbiotiques entre les nodules racinaires de certaines plantes et des bactéries du genre *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* dans des mécanismes de régulation de la fixation d'azote (Cooper *et al.*, 1993, Koes *et al.*, 1994.).

De manière plus générale Waterman et Mole, (1994) ont montré l'importance écologique des phénols dans l'interaction entre plantes et autres organismes.

2. Chez l'animal

Les polyphénols sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale. A titre d'exemple, l'homme consomme jusqu'à 1 g de flavonoïdes par jour. Ces substances, les acides phénols, les flavonoïdes, les anthocyanes et proanthocyanidines sont dotées de certaines activités qui seront abordées ci-dessous. De plus, la plupart de ces composés présentent des effets antioxydants et antiradicalaires.

2.1 Les acides phénols

Des acides phénols comme les acides cinnamiques et benzoïques ont un certain pouvoir antibactérien (Didry *et al.*, 1982) et antifongique (Ravn *et al.*, 1989). Les acides chlorogénique, ellagique, férulique et caféique sont des inhibiteurs de la glutathion-S-transférase *in vitro* (Das *et al.*, 1984) et ont des propriétés antitumorales (Mori *et al.*, 1986). Des coumarines et leurs dérivés ont été utilisés dans des médicaments protecteurs vasculaires et antioedémateux, (Mabry et Ulubelen, 1980), ainsi que comme photodynamisants dans des produits solaires et pour le traitement du Psoriasis (Bruneton, 1987).

2.2 Les flavonoïdes

Les travaux effectués sur les flavonoïdes, notamment la rutine et la diosmine ont permis de mettre en évidence leur capacité à augmenter la résistance capillaire et à réduire la perméabilité des vaisseaux. Des auteurs ont montré une faible toxicité et observé des effets

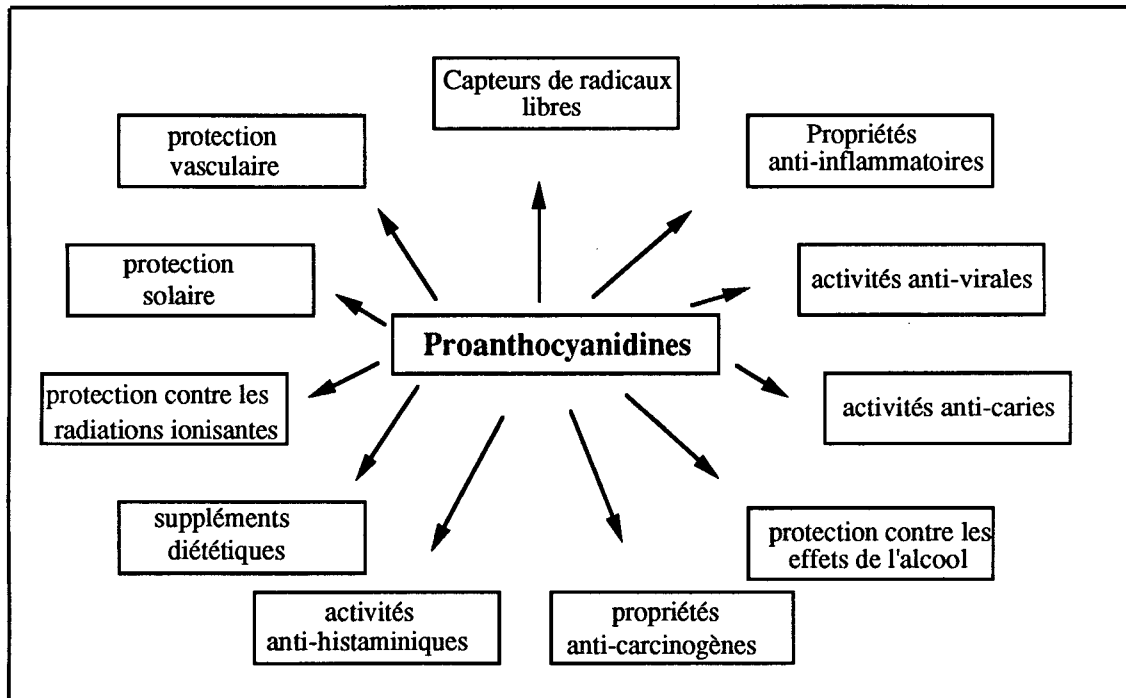


Figure 10 : Propriétés biologiques et utilisations potentielles des proanthocyanidines (d'après Masquelier, 1988)

antispasmodiques faiblement hypotenseurs et diurétiques pour certains flavonoïdes (Bruneton, 1987)

Outre ces propriétés, des flavonoïdes connus comme des phytoalexines qui sont souvent des isoflavones confèrent une activité antivirale aux plantes (Jurd *et al.*, 1971). De plus des actions antitumorales (Stavric *et al.*, 1992), anticarcinogènes (Hertog *et al.*, 1992, Das *et al.*, 1994), antifongiques (Weidenborner *et al.*, 1993), antimicrobiennes (Ghazal *et al.*, 1992), et oestrogènes (Miksicek *et al.*, 1993) ont été décrites pour différents flavonoïdes. Les flavonoïdes exercent une action sur de nombreux systèmes enzymatiques parmi lesquels les enzymes lysosomales et les enzymes du métabolisme de l'acide arachidonique. Ils possèdent des activités anti-inflammatoires, anti-allergiques, ont des effets analgésiques et antithrombotiques (Bidet *et al.*, 1987). Ils sont également connus comme inhibiteurs de l'AMP cyclique phosphodiesterase (Kuppusamy et Das, 1987).

2.3 Les anthocyanes

Comme les flavonoïdes, *sensu stricto*, les anthocyanes sont utilisées comme protecteurs capillaro-veineux. De plus elles induisent une augmentation de la régénération physiologique du pourpre rétinien (Bruneton, 1987).

Une autre application est liée à leurs propriétés colorantes. Composés atoxiques et ne présentant qu'un nombre réduit d'incompatibilité, elles sont autorisées comme colorant pharmaceutique et alimentaire mais sont souvent instables.

2.4 Les proanthocyanidines

Les proanthocyanidines sont utilisées dans des médicaments à propriétés vasculotropes pour des indications analogues à celles de la rutine. Des études sur des catéchines et oligomères de proanthocyanidines ont montré leurs effets stabilisants sur le collagène (Masquelier *et al.*, 1979). Des travaux *in vitro* ont montré des activités antibactériennes (Ikigai *et al.*, 1992) et anticollagénase des catéchines du thé vert (*Camellia sinensis*). Ils ont la particularité de diminuer le cholestérol sanguin en activant son métabolisme.

D'autres propriétés ont également été démontrées. Il s'agit d'activités antifongiques (Brownlee *et al.*, 1992), anti-inflammatoires (prodelphinidines) (Tits *et al.*, 1991), inhibitrices de l'élastase, antitumorales (De oliveira *et al.*, 1972) et antivirales (Okada *et al.*, 1971), d'actions sur divers systèmes enzymatiques notamment dans le métabolisme de l'acide arachidonique (Kreofsky *et al.*, 1992), sur les glycosyltransférases (Nakhara *et al.*, 1993), l'enzyme de conversion ainsi que de l'inhibition de L'ADN topoisomérase II (Kashiwada *et al.*, 1993) et de la transcriptase inverse (Kakiuchi *et al.*, 1991). De multiples activités biologiques (**Figure 10**), attribuées aux proanthocyanidines et résumées par Masquelier en 1988 ont été rapportées par Bourzeix en 1993.

B. L'AUBÉPINE

L'Aubépine a d'abord été employée comme aliment dans les temps préhistoriques comme le montrent des accumulations de noyaux de fruits trouvés dans des cités lacustres en Europe (Fournier *et al.*, 1947, Garnier *et al.*, 1961). Les baies séchées et broyées mélangées à la farine ont servi dans la préparation du pain jusqu'au début du XX^{ème} siècle en Europe centrale.

Les emplois médicaux sont plus récents (Garnier, 1961 et Leclerc, 1954). Les fleurs d'Aubépine auraient alors été employées au XIV^{ème} siècle contre la goutte, au XVI^{ème} siècle contre les pleurésies, aux XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècle pour leurs propriétés antihémorragiques et astringentes.

L'intérêt de l'Aubépine dans le domaine cardiovasculaire s'est développé après que deux médecins américains, Jennings (1896) et Clément (1898) aient signalé ses propriétés cardiotoniques (Garnier *et al.*, 1961). Puis, l'Aubépine fut étudiée durant la deuxième moitié du XX^{ème} siècle comme cardiotonique, hypotenseur, vasodilatateur, et parfois antiangoreux.

L'Aubépine a pris une place de choix dans l'arsenal thérapeutique par la meilleure connaissance scientifique de son action, par ses effets prouvés comme cardiosédatif et sa très faible toxicité comme en témoigne l'augmentation des prescriptions médicales.

I. BOTANIQUE

1. Classification

L'Aubépine appartient à l'embranchement des Phanérogames, au sous-embranchement des Angiospermes, à la classe des Dicotylédones, à la famille des Rosacées et au genre *Crataegus*. Celui-ci comporte 30 espèces (Coste *et al.*, 1937) dont les principales sont *Crataegus laevigata* et *Crataegus monogyna* Jacq..

2. Description générale de la plante

L'Aubépine est un arbrisseau buissonnant et épineux d'où son nom *Crataegus oxyacantha* des mots grecs Oxus et Akantha, qui signifient "aigü" et "épine" respectivement. En forme libre il peut atteindre la taille de 3 à 4 mètres (Bézanger-Beauquesne, 1990). L'écorce des rameaux jeunes est gris clair, lisse et devient brune et fendillée sur les rameaux plus âgés. Les feuilles, d'un vert brillant, sont lobées.

	<i>Crataegus monogyna</i>	<i>Crataegus laevigata</i> = <i>oxyacantha</i>
Habitat	toute la France	toute la France
Jeunes rameaux	pubescents	glabres
Feuilles	vert clair, dentées au sommet	vert foncé, luisantes, dentées dès la base
Fleur	odeur agréable, floraison milieu mai	odeur nauséabonde, floraison début mai
calice	dents lancéolées	dents triangulaires
Gynécée	1 seul style	2 ou 3 styles
Anthères	noires	rouges
Fruit	1 seul noyau	2 ou 3 noyaux

Tableau 3 : Principales différences entre *Crataegus monogyna* et *Crataegus laevigata*
(= *oxyacantha*)

Les fleurs blanches ou rosées, odorantes sont groupées en corymbes ramifiées. Ces fleurs présentent un calice à 5 sépales courts, une corolle à 5 pétales libres, concaves, blancs ou légèrement rosés. L'Aubépine est souvent cultivée comme plante ornementale.

Le fruit ou senelle est une drupe globuleuse, ovoïde, d'une coloration rouge plus ou moins foncée.

Crataegus laevigata a des feuilles qui ont de 3 à 5 lobes profonds et obtus, finement dentés; les anthères sont rouges et les fruits contiennent 2 à 3 noyaux.

Crataegus monogyna Jacquin a des feuilles qui comptent 3 à 7 lobes aigus, écartés et peu dentés. Les anthères sont noires et comme son nom l'indique, le style est unique et les fruits ne contiennent qu'un seul noyau.

Les principales différences existant entre les deux espèces figurent dans le **tableau 3**.

3. Localisation géographique

L'Aubépine est très commune en France et peuple largement les bois et les haies. On la trouve dans toute l'Europe, l'Asie occidentale, l'Afrique du Nord et elle est introduite en Amérique du Nord (Bézanger-Beauquesne et al., 1990). On la rencontre aussi bien en plaine qu'en montagne jusque 1600 mètres.

4. Autres dénominations

L'Aubépine est également connue sous d'autres noms. Entre autres, citons: l'Aubespain, l'épine blanche, le bois de mai, l'épine fleurie, le senellier.

En anglais: hawthorn, thorn, whitethorn.

En allemand: Weissdorn, Rotdorn, Christdorn, Heckdorn, Hagedorn, Gemeinerdorn.

II. ACTIONS PHARMACOLOGIQUES

Domaine thérapeutique officiel

Les effets pharmacologiques concernant l'Aubépine et les produits d'extraction ont été résumés notamment par Beretz *et al.*, (1978), Ammon et Handel, (1981), Wilquin, (1984) et réactualisées par Ammon et Kaul (1994a,b,c). Ils peuvent être résumés en 5 points.

1. Action sur le coeur et la fibre myocardique

Effet *inotrope positif*: augmentation de la contractilité myocardique, qui serait due aux flavonoïdes et aux dérivés de flavanols (Beretz *et al.*, (1978), Ammon *et al.*, (1981)). Les proanthocyanidines seraient plus actives (Leukel *et al.*, 1986).

Effets *chronotropes* (sur la fréquence) dûs aux flavonoïdes et aux polyflavanes (Ficarra *et al.*, 1983).

Effets sur la *conduction électrique* : effet dromotrope négatif d'un extrait aqueux titré en procyanidines (Hahn *et al.*, 1960).

Effet *protecteur contre les arythmies* expérimentales (Occhiuto *et al.*, 1986a).

Augmentation de la *résistance à l'effort* analogue à celle de certains médicaments comme le Captotril (Tauchert *et al.*, 1994).

2. Action sur les coronaires

L'Aubépine ainsi que sa fraction flavonoïde augmentent *le flux coronarien* et la pression de perfusion.

3. Action sur la pression artérielle

Effet *hypotenseur* des oligomères flavaniques.

4. Autres effets

Les effets *sédatifs* (consacrés par l'usage) ne sont guère étayés par des preuves pharmacologiques chez l'animal.

Des études ont montré des *activités antioxydantes et radicalaires* d'extraits d'Aubépine (Bonte *et al.*, 1990, Bahorun *et al.*, 1994).

5. Toxicité

Tous les auteurs indiquent *une toxicité faible*. *Per os*, pour la souris, elle serait de 1,6 g/kg (Beretz *et al.*, 1978).

III. EMPLOIS ET INDICATIONS EMPIRIQUES ACTUELS

1. Emplois empiriques et traditionnels

La partie de la plante la plus souvent usitée et citée dans les ouvrages de Phytothérapie est le **fleur** qui doit être récoltée selon Fournier (1947) "au début de la floraison et avant

Parties utilisées	Emplois empiriques et traditionnels
Fleurs	comme <i>tonicardiaque</i> dans la "faiblesse du coeur" et comme régulateur dans "la tachycardie et l'arythmie"
	contre <i>l'hypertension</i> et aussi <i>l'hypotension</i> , donc "équilibrante" en ramenant la tension à la normale
	comme <i>antispasmodique</i> chez les sujets nerveux (angoisses, insomnies, vertiges...)
	" dans <i>l'artériosclérose</i> et <i>l'angine de poitrine</i> "
	contre <i>l'obésité</i> ce qui indiquerait "des vertus diurétiques"
Baies	comme <i>antidiarrhéique</i> et en gargarismes contre les " <i>angines simples</i> "
Ecorce	comme <i>fébrifuge</i>

Tableau 4 : Emplois empiriques et traditionnels de l'Aubépine

l'épanouissement complet". Les **fruits**, ainsi que les écorces, sont moins souvent cités mais quelques emplois figurent dans la littérature et sont résumés dans le **tableau 4**.

2. Officiels

En France, l'Avis aux Fabricants concernant les demandes d'Autorisation de Mise sur le Marché de Médicaments à base de plantes du Ministère de la Santé et des Affaires Sociales 1990, (fascicule 90/22 bis) fournit deux indications officielles, chacune formulée de deux manières pour le Corps médical d'une part et pour le public d'autre part :

Indication O11

Corps médical : "Traditionnellement utilisée dans les troubles de l'éréthisme cardiaque de l'adulte (coeur sain)".

Public : "Traditionnellement utilisée pour réduire la nervosité des adultes, notamment en cas de perception exagérée des battements cardiaques (palpitations) après que toute maladie cardiaque ait été écartée".

Indication 095.

Corps médical : "Traditionnellement utilisée dans le traitement symptomatique des états neurotoniques des adultes et des enfants, notamment en cas de troubles mineurs du sommeil".

Public : "Traditionnellement utilisée pour réduire la nervosité des adultes et des enfants, notamment en cas de troubles du sommeil".

3. Dans les ouvrages de Pharmacognosie

Nous nous bornerons à énumérer les emplois et indications cités par Paris *et al.*, (1981), Bruneton (1993) et Bézanger- Beauquesne *et al.*,(1990).

Tous les auteurs s'accordent sur les indications comme sédatif nerveux et antispasmodique souvent associée à la Valériane et à la Passiflore, dans le traitement symptomatique des états neurotoniques chez l'adulte et l'enfant et dans celui des palpitations.

4. Emplois médicamenteux et formes pharmaceutiques

3.1 L'Aubépine seule

3.1.1 Formes non spécialisées

On trouve à la Pharmacopée Française les monographies de : fleurs et sommités fleuries séchées, teinture et extrait fluide d'Aubépine.

3.1.2 Formes spécialisées

Parmi les formes actuellement commercialisées on peut citer des nébulisats d'extraits dans l'éthanol aqueux comme le Titrex[®] (Laboratoires Derpha), de la poudre cryobroyée comme l'Arkotitrat[®] d'Aubépine (Laboratoires Arkopharma), une "suspension intégrale de plante fraîche "(S.I.P.F.[®]) d'Aubépine.

Il existe d'autres formes ou tisanes simples que nous n'énumérerons pas ici.

3.2 Associations

Les associations les plus fréquentes sont réalisées avec :

- ▣ des plantes sédatives connues comme la Valériane, la Passiflore et la Ballote.

Exemple : Spasmine[®] associe la Valériane et l'Aubépine est utilisée comme sédatif souvent proposé pour éviter l'emploi de tranquillisants comme les benzodiazépines.

- ▣ des sédatifs ou hypnotiques de synthèse comme le phénobarbital à petites doses, ou des antispasmodiques comme la papavérine.

Exemple : Felisédine[®] associe du phénobarbital, de l'Aubépine et de la Valériane.

IV. COMPOSITION CHIMIQUE

L'abondante littérature consacrée à l'Aubépine, fraîche ou sèche, montre une composition chimique assez complexe et certains constituants responsables de l'activité n'ont été clairement identifiés qu'au cours de ces dernières années.

1. Les polyphénols

Nous ne ferons ici qu'un bref rappel, le métabolisme et la chimie de ces composés étant abordés ultérieurement.

1.1 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont l'hypéroside (ou quercétine-3-O-galactoside) qui prédomine dans les fleurs ainsi que la vitexine (apigénine-8-glucoside) et son rhamnoside (acétylé ou non) qui

COMPOSES ISOLES	CRATAEGUS MONOGYNA
2''-O-rhamnoside d'isovitexine	traces
2''-O-rhamnoside d'orientine	traces
2''-O-rhamnoside d'isoorientine	traces
2''-O-rhamnoside de vitexine	+
2''-O-rhamnoside (4'''-O-acétyl) de vitexine	+
8-méthoxy-3-O-β-D glucoside de kaempférol	+
Rutoside	+
Spiraeoside	+
Isoschaftoside	+
Vicénine 1	+
Vicénine 2	+
Vicénine 3	+
Quercétol	+
Kaempférol	+
Hyperoside	+
Crataeside	+
7-O-glucoside de lutéoline	+
Vitexine	+
Orientine	+
Isoorientine	+

Tableau 5 : Présence de flavonoïdes chez *Crataegus monogyna* d'après Nikolov, (1982).

se trouvent en quantités importantes dans les feuilles (Lamaison et Carnat, 1990a , Rehwald *et al.*, 1994).

D'autres composés tels que la lutéoline, la lutéoline-3'-7-diglucoside, l'apigénine, l'apigénine-7-O-glucoside (Ficarra *et al.*, 1983) et des dérivés plus complexes de kaempférol (Daughet *et al.*, 1993) ont été signalés. Nikolov, en 1982, dresse un bilan des différents flavonoïdes trouvés dans *Crataegus monogyna* (Tableau 5).

1.2 Catéchines et Proanthocyanidines

L'Aubépine est riche en tanins catéchiques. Thompson *et al.*, (1972) ont répertorié des catéchines, des proanthocyanidines dimères (notamment les dimères B2 et B5), des trimères dont le dérivé C1.

2. Les amines

En 1982 Wagner *et al.*, ont isolé des fleurs de *Crataegus oxyacantha* L. de la β -phényléthylamine, de l'ortho-méthoxyphényléthylamine et de la tyramine. D'autres amines comme la triméthylamine, la diméthylamine et l'éthanolamine ont été caractérisées par Occhiuto *et al.*, (1986b).

Des composés comme la noradénaline, la dopamine et la 5-hydroxytryptamine seraient aussi présents dans l'Aubépine. Certaines activités ont été reliées à ces amines (Wagner *et al.*, 1982).

3. Les triterpènes et les acides triterpéniques

Des travaux récents nous montrent que l'Aubépine contient un mélange d'acides triterpéniques dont les principaux sont l'acide crataegolique, l'acide ursolique et l'acide oléanolique (Occhiuto *et al.*, 1986b).

4. Autres composés

Les fleurs contiennent une huile essentielle incluant de l'aldéhyde anisique qui participe à l'odeur particulière et agréable des fleurs.

C. LES RADICAUX LIBRES

Bouteille à l'encre, bouc-émissaire accusé de tous les maux, effet de mode? La liste des phénomènes biologiques dans lesquels les radicaux libres sont en cause ne cesse d'augmenter : vieillissement, ischémie, maladies inflammatoires, pathologies oculaires, cancer.... L'intérêt porté aux radicaux libres prend de plus en plus d'importance et les nombreuses recherches ont permis de mieux comprendre les modalités de leur formation et d'appréhender les mécanismes d'action.

Biologistes et médecins ne sont pas les seuls à se préoccuper de ces espèces réactives. L'industrie alimentaire est également concernée par la détérioration des aliments et l'industrie cosmétique se préoccupe de lutter contre leur action délétère sur la peau.

Parmi les substances naturelles connues, les polyphénols, figurent en bonne place en tant que piègeurs de ces radicaux libres et pourraient être retenus pour mettre au point de nouvelles thérapeutiques.

I. LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

Dans les molécules, les électrons sont habituellement réunis par paires. Ce sont des corpuscules chargés électriquement qui, par rotation sur eux-mêmes, induisent un champ magnétique (spin). Un doublet électronique est plus stable que deux électrons isolés car l'appariement de deux électrons de spin opposé permet l'annulation de leurs champs magnétiques réciproques.

Un radical libre est, au contraire, une espèce chimique, neutre ou chargée, dont la couche périphérique contient un électron non couplé dit célibataire. Le nombre total d'électrons d'un radical libre est donc impair. Cet électron célibataire confère au radical libre une certaine instabilité aussi bien au plan énergétique que cinétique.

Pour retrouver une certaine stabilité, les radicaux libres, qui sont très réactifs, ne doivent pas posséder d'électrons célibataires. Cet objectif peut être atteint :

- soit par perte d'un électron, le radical est alors réducteur. Tel est le cas du radical COO^\ominus .
- soit par gain d'électrons, le radical est alors oxydant, comme par exemple le radical hydroxyle (OH^\ominus).

Il peut arriver que, selon le composé qui lui est opposé, un radical puisse être soit oxydant, soit réducteur.

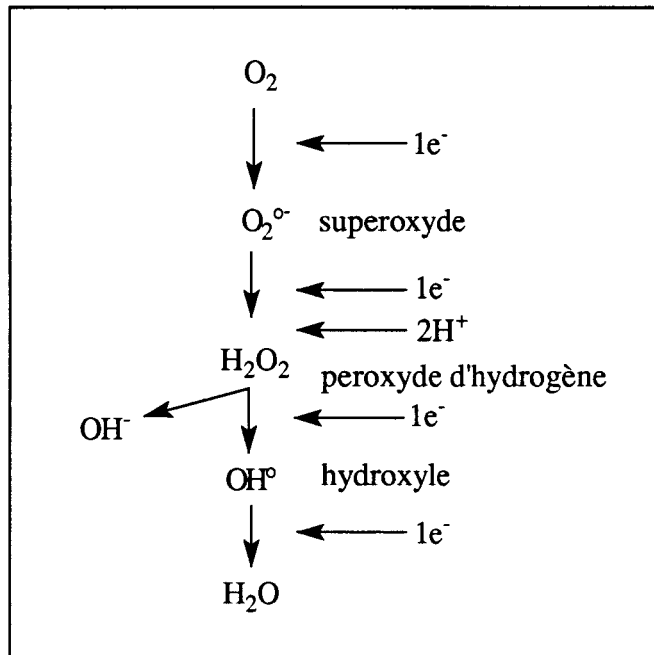


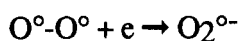
Figure 11 : Formation des radicaux libres de l'oxygène

Le fait que les radicaux libres aient un électron célibataire sur la couche périphérique favorise considérablement, lors des collisions biomoléculaires, leur rapprochement avec une autre molécule. Par conséquent les réactions radicalaires sont souvent très rapides.

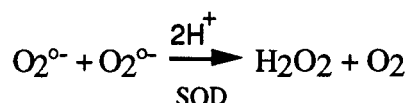
Principaux acteurs radicalaires de la biologie

□ Radicaux oxygénés et espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène moléculaire (O₂) que nous respirons présente, du fait de sa structure biradicalaire, un pouvoir oxydant très faible vis à vis des molécules biologiques. Par acquisition d'un électron, moyennant un apport énergétique par voie enzymatique ou non (photochimique ou radiochimique), l'oxygène donne naissance à un radical libre caractérisé par son électron célibataire, l'anion superoxyde O₂^{o-}. Dans ce symbole le signe "moins" rappelle la polarisation électrique et le "point", l'existence d'un électron célibataire.

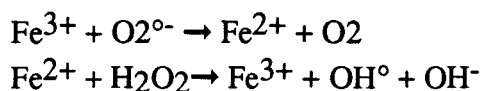


Radical majoritairement produit par l'organisme, l'anion superoxyde est un oxydant faible. En présence d'ions H⁺, l'anion superoxyde subit une réaction spontanée de dismutation avec formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène. Biologiquement, H₂O₂ est normalement formée à partir de O₂^{o-} dans une réaction considérée comme une défense naturelle contre la toxicité de O₂^{o-}. C'est la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation de O₂^{o-}.



L'effet destructeur de O₂^{o-} pourrait s'exercer indirectement car, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'oxygène serait le précurseur du radical hydroxyle OH^o par la réaction dite de Haber et Weiss.

Cette réaction, très lente, ne peut intervenir sans catalyse. Ce sont en fait les ions Fe⁺⁺ ou Cu⁺⁺ qui jouent le rôle de catalyseur.



Cette réaction est communément appelée réaction de Fenton. Les radicaux OH^o sont les espèces chimiques les plus réactives (durée de vie de l'ordre 10⁻⁹ secondes) (Pré *et al.*, 1992). La formation des radicaux libres par activation de l'oxygène est résumée dans la **figure 11**.

En milieu biologique ils réagissent sur le site de formation, c'est-à-dire là où la concentration en ions métalliques est importante. Ils attaquent les lipides, les protéines, l'ADN et les sucres, causant des dommages multiples en engendrant des radicaux secondaires par arrachement d'un atome d'hydrogène ou par transfert de l'électron célibataire. De ce fait, ils sont reconnus comme les plus puissants initiateurs naturels de la lipoperoxydation.

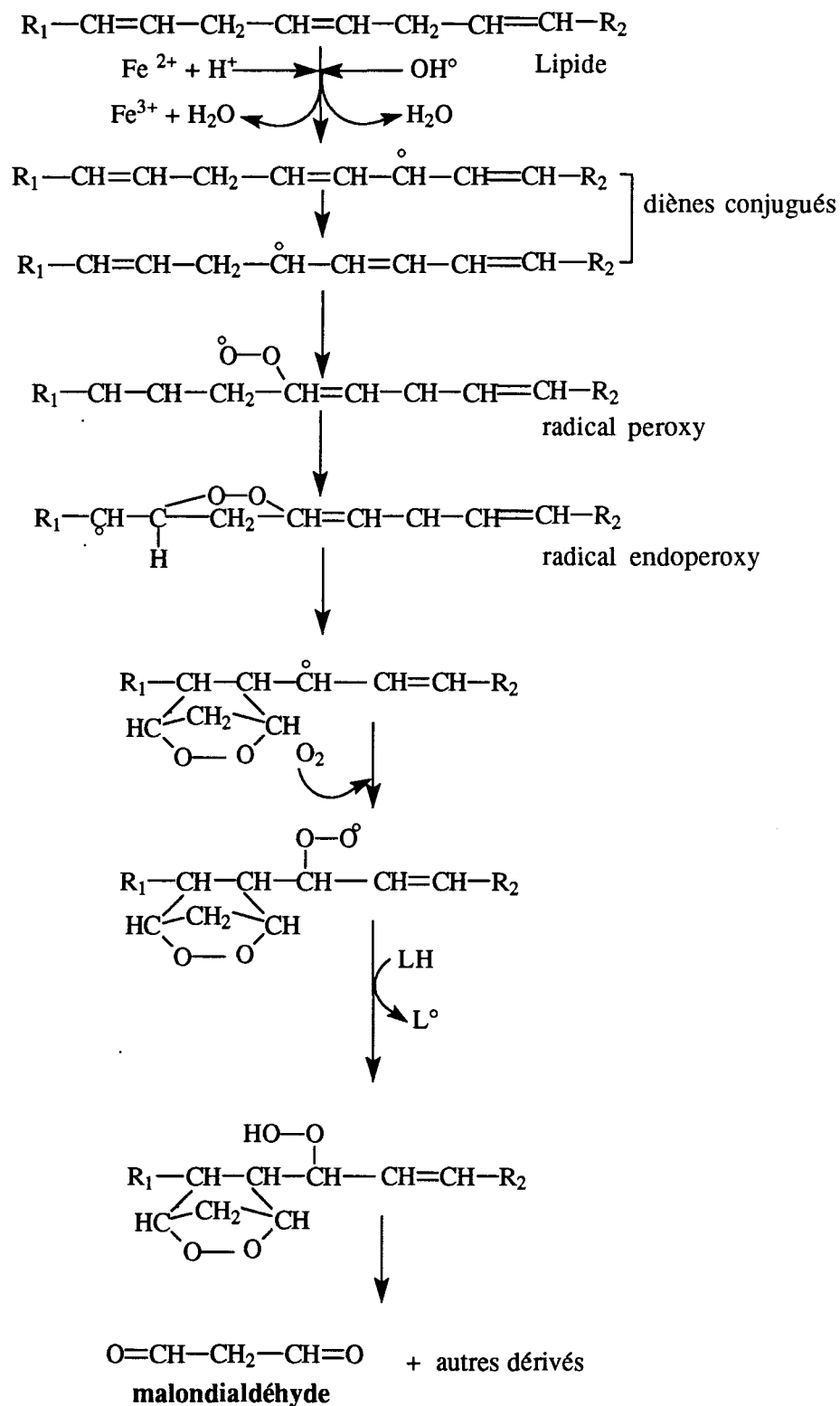


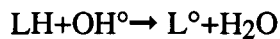
Figure 12 : Formation du malondialdéhyde au cours de la peroxydation d'un lipide par Fe II-O₂ ou OH[•]

□ La lipoperoxydation

La lipoperoxydation, phénomène engendré par l'oxydation des lipides, se subdivise en 3 phases : Initiation, propagation et terminaison (Wade *et al.*, 1985). Ce processus est schématisé dans la **figure 12**.

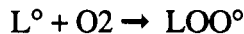
→ Phase d'initiation

In vivo, l'attaque par OH° de la chaîne acylée d'un acide gras polyinsaturé d'une structure lipidique (LH), conduit par rupture homolytique d'une liaison C-H à la formation d'un radical L° et à la formation de OH° sous forme H_2O



→ Phase de propagation

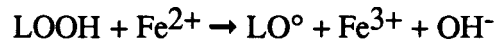
Au cours de cette étape utilisant l'oxygène, il se forme tout d'abord un radical lipoperoxyl.



Celui-ci en réagissant avec un autre LH génère simultanément un hydrolipoperoxyde (LOOH) et un nouveau L° assurant ainsi la propagation du processus.



Les formes ionisées des métaux de transition que sont le fer et le cuivre, participent activement à cette phase de propagation. Fe^{2+} et Fe^{3+} transforment respectivement LOOH en LO° et LOO° .

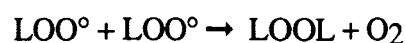
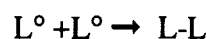


LOO° peut être directement produit par action de l'oxygène singulet sur les lipides insaturés. Beaucoup plus réactif que LOO° et aussi agressif que OH° , LO° perpétue énergiquement le processus oxydatif.



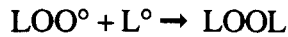
→ Phase de terminaison

On admet que chaque radical L° est à l'origine d'une centaine de molécules de LOOH avant que survienne la phase d'arrêt. Cette dernière étape consiste en la formation de composés stables issus de la rencontre de 2 espèces radicalaires.



Sources cellulaires des radicaux libres	Systèmes générateurs de radicaux libres	Radicaux libres
Composants cellulaires solubles	thiols, hydroquinones, catécholamines, flavines, tetrahydroptérines	$O_2^{\circ-}$, H_2O_2
Systèmes enzymatiques	xanthine-oxydase, aldéhyde-oxidase, dihydroorotate-déhydrogénase, flavoprotéine-déhydrogénase, tryptophane-dioxygénase	$O_2^{\circ-}$
Chaîne respiratoire mitochondriale	ubiquinone-cytochrome C réductase, NADH déhydrogénase	$O_2^{\circ-}$
Membrane reticulum endoplasmique	complexe oxy-cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 réductase	$O_2^{\circ-}$, OH°
Membrane cytoplasmique	enzymes liées au métabolisme de l'acide arachidonique, phénomènes de phagocytose, myeloperoxydase	OH° , $O_2^{\circ-}$, $HOCl$,
Peroxisomes	oxydases	$O_2^{\circ-}$

Tableau 6 : Sources cellulaires des radicaux libres



Cette phase ne survient qu'au bout d'un certain temps car la probabilité de rencontre des radicaux libres est beaucoup plus faible que celle observée avec les acides gras polyinsaturés dont les concentrations sont relativement très supérieures.

En fonction de l'insaturation de la structure acylée lipidique, la peroxydation conduit à la formation de différents hydrolipoperoxydes (LOOH) qui, du fait de leur instabilité en présence d'ions de métaux de transition, sont notamment à l'origine de dérivés comme des aldéhydes, des acides et de traces d'hydrocarbures (éthane, pentane), ces derniers retrouvés dans l'air expiré. Parmi les aldéhydes, on trouve le malondialdéhyde (MDA) qui est utilisé comme indice de peroxydation d'un tissu et qui est le plus courant des marqueurs de la peroxydation lipidique.

II. SOURCES CELLULAIRES DE RADICAUX LIBRES

La production de radicaux libres est permanente au sein de la matière vivante. Mais l'essentiel de la production radicalaire est associé au métabolisme cellulaire de l'oxygène et aux réactions d'oxydo-réduction. Les principales sources cellulaires de radicaux libres sont résumées dans le **tableau 6**.

III. PATHOLOGIES ENGENDREES PAR LES RADICAUX LIBRES

Lorsque les systèmes antiradicalaires (enzymes spécifiques et piègeurs de radicaux libres) sont dépassés, soit en raison d'une diminution de l'activité enzymatique, soit en raison d'une exagération de la production radicalaire (**Tableau 7**), la neutralisation des radicaux libres fait intervenir d'autres systèmes cellulaires tels que les membranes, les acides nucléiques et les protéines.

En s'attaquant aux constituants cellulaires, les radicaux libres participent à l'apparition de nombreuses maladies (**Tableau 8**), comme le cancer (Emerit, 1994), la cataracte (Iwata *et al.*, 1987), l'athérosclérose (Riemersma, 1994), dont plusieurs sont des maladies classiquement liées au vieillissement (Harman, 1994).

Leurs actions sont aussi très nocives lors des reperfusions post-ischémiques notamment au niveau du cœur lors de l'infarctus du myocarde avec l'apparition d'anions superoxydes suivie de la formation d'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles (Samaja *et al.*, 1994). Ils sont aussi responsables de la dégénérescence précoce de tissus greffés et de lésions postchirurgicales dues à une interruption momentanée de la circulation suivie d'une reperfusion (Dodet *et al.*, 1991).

Les radicaux libres participent à la réaction inflammatoire et l'amplifient. En augmentant la perméabilité vasculaire, ils favorisent l'afflux de nouvelles cellules inflammatoires. Ils aident à la destruction du collagène, et agissent avec le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) qui par

FACTEURS AUGMENTANT LE TAUX DE RADICAUX LIBRES		
Augmentation de la formation intracellulaire	Augmentation de la production extracellulaire	Augmentation intra- et extracellulaire
<ul style="list-style-type: none"> - Hyperoxygénation : oxygène hyperbare, hyperoxygénation par trou, hyperplasie rétrolentale, dysplasie pulmonaire du nouveau-né; reperfusion - Hypo-oxygénation : choc cérébral, infarctus du myocarde, ischémies - Chimique : paraquat CCl₄, benzopyrène, nitrofurantoïne - Anémie hémolytique médicamenteuse : phénylhydrazine - Déficit en vitamines : E et A, Se, Zn - Vieillesse 	<ul style="list-style-type: none"> - Inflammation : aigüe : brûlures, infections chroniques : arthrite rhumatoïde, colites ulcératives, vascularites - Troubles immunologiques : maladies autoimmunes 	<ul style="list-style-type: none"> - Rayonnement : UV, radiothérapie, mal des rayons - Carcinogènes chimiques : polluants atmosphériques, ozone NO, NO₂, tabac

Tableau 7: Facteurs augmentant le taux de radicaux libres (D'après A. Favier (Dodet, 1991))

son action, induit la formation de dérivés actifs de l'oxygène (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radicaux hydroxyles) et active la destruction des bactéries par les polynucléaires neutrophiles (Dodet *et al.*, 1991). Les radicaux libres exerceraient, par ailleurs, une activité immunosuppressive, notamment dans le cas du sida. (Favier *et al.*, 1994).

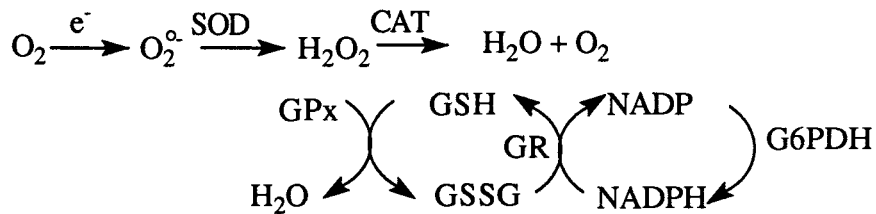
IV. DEFENSE CONTRE LES RADICAUX LIBRES

□ Première ligne de défense

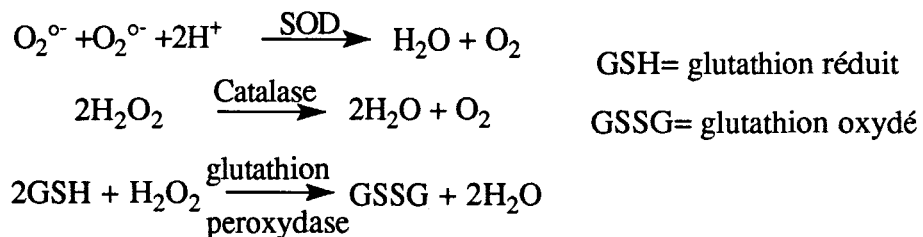
En dehors des états pathologiques ou du vieillissement, la toxicité de l'oxygène ne s'exerce pas. Il existe donc des systèmes protecteurs. Différentes enzymes, en première ligne de défense, constituent la clé de voûte de cette protection. Ces enzymes, présentes aux lieux de production maintiennent les radicaux libres et le peroxyde d'hydrogène, à de très faibles concentrations.

Ce sont :

→ différentes superoxyde-dismutases (SOD) : la Cu, Zn SOD et la Mn SOD, la catalase (CAT), la glutathion-péroxydase (5GPx), la glutathion-réductase (GR) et la glucose-6-phosphate-déhydrogénase (G6PDH). Elles interviendraient selon le schéma suivant.



Les 3 enzymes protectrices les plus fréquemment citées sont la superoxyde-dismutase, la glutathion-péroxydase et la catalase. La SOD accélère la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, tandis que la catalase et la glutathion-péroxydase catalysent les réactions d'inactivation de ce dernier.



La SOD est présente dans tous les organismes animaux et végétaux vivant en aérobiose. Il y a chez l'homme, 2 superoxyde-dismutases; l'une est cytoplasmique, son site actif contient du cuivre et du zinc, l'autre est mitochondriale et renferme du manganèse. L'action de la SOD doit obligatoirement être couplée à celle des catalases/péroxydases pour éviter l'accumulation du peroxyde d'hydrogène.

Pathologies chroniques	Pathologies aiguës
Athérosclérose	Lésions de reperfusion post-ischémiques
Cancer	Hyperoxygénation (O ₂ hyperbare)
Emphysème	Brûlures étendues
Cirrhose éthylique	Choc septique
Diabète	Inflammation
Cataracte	Allergie
Dystrophie musculaire	Arthrite
Trisomie 21	Fibroplasie rétrolentale
Maladie de Crohn	-
Arthrose	-
Maladie d'Alzheimer	-
Maladie de Parkinson	-
Vieillissement cellulaire	-

Tableau 8 : Etats pathologiques ou situations physiologiques associés à un déséquilibre lié aux radicaux libres.

La catalase est une enzyme localisée à l'intérieur des peroxysomes et est composée de 4 sites actifs identiques renfermant du Fe^{3+} dans le noyau héminique. Elle est d'autre part, relativement peu efficace dans l'élimination des peroxydes à dose faible de peroxyde d'hydrogène contrairement aux peroxydases.

Certaines peroxydases animales comme le glutathion-peroxydase, une enzyme cytosolique et mitochondriale qui contient du sélénium, dégradent la plus grande partie de peroxyde d'hydrogène en le transformant en présence de glutathion réduit, en eau et en glutathion oxydé. La glutathion-peroxydase limite également la proportion radicalaire en réduisant les hydroperoxydes ROOH instables en acides gras hydroxylés ROH.

□ **Seconde ligne de défense : les piègeurs de radicaux libres**

Si les systèmes de défense enzymatiques sont débordés, il y a accumulation d'ions superoxydes, de peroxyde d'hydrogène et production de radicaux OH° contre lesquels il n'existe aucun système enzymatique naturel de défense. Un ensemble de composés dits piègeurs de radicaux libres sont néanmoins susceptibles de ralentir considérablement les réactions d'oxydation en chaîne et constituent ainsi une deuxième ligne de défense. Ce système de protection complémentaire est à la fois cytosolique et membranaire. La caractéristique commune de ces composés est d'être aisément oxydables.

L'exemple type est l'action *in vivo* de l'acide ascorbique (vitamine C) qui forme un radical ascorbyl stable lorsqu'il rencontre un radical libre (Chan *et al.*, 1992). Le glutathion joue un rôle antioxydant en captant les radicaux libres puis en réalisant une dismutation (Younes *et al.*, 1981). L'alpha-tocophérol ou la vitamine E s'oppose efficacement à la lipidoperoxydation des membranes cellulaires (Fryer *et al.*, 1992). L'acide urique, en milieu aqueux, piège les radicaux RO_2° ou OH° . De plus il forme des complexes avec Fe^{3+} qui n'oxydent pas l'ascorbate, ce qui entraîne un autre type d'effet protecteur, en soustrayant le fer à la réaction de Fenton (Fontecave *et al.*, 1991). Le β -carotène prévient des oxydations photochimiques ; il intercepte également les radicaux oxygénés et inhibe la peroxydation des lipides.

A des pH physiologiques, des protéines comme la transferrine et la céruléoplasmine sont des puissants antioxydants au niveau plasmatique. Certains auteurs ont proposé la participation possible de molécules dans les réactions radicalaires, du fait de leur aptitude à se lier avec le fer. Il s'agit de composés non hémiques tels que la ferritine et la céruléoplasmine (De Silva *et al.*, 1993), l'hémossidérine, la lactoferrine et la transferrine et des substances hémiques comme l'hémoglobine, la myoglobine ou le cytochrome C (Halliwell *et al.*, 1986). Le rôle de l'albumine comme piègeur de radicaux peroxydes a été démontré. De plus, elle peut fixer les acides gras libres et les protéger ainsi de la peroxydation (Halliwell *et al.*, 1988).

Des études ont été menées sur des composés qui seraient susceptibles de combattre les effets nocifs des radicaux libres. La liste de substances douées d'activité antioxydante n'est pas limitative. Citons les travaux de Aruoma *et al.*, (1989) et Gressier *et al.*, (1993) qui ont montré l'efficacité de la N-acetylcystéine pour protéger l' α_1 -antitrypsine contre les effets néfastes de l'acide hypochloreux. Celui-ci serait produit par des neutrophiles par l'intermédiaire de la

POLYPHENOLS	SYSTEME DE MESURE D'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	AUTEURS
Tanins galliques et catéchiques	Peroxydation lipidique sur microsomes de souris	Okuda <i>et al.</i> , 1983
Acide phénols (acides cafféique, 4-O-cafféoylquinique, chlorogénique et isochlorogénique	Peroxydation lipidique (système acide linoléique)	Hayase <i>et al.</i> , 1984
Proanthocyanidines dimères B1 et B3	Système acide linoléique- β -carotène	Ariga <i>et al.</i> , 1988
Rutine, quercétine	Peroxydation lipidique sur microsomes de souris	Afanas <i>et al.</i> , 1989
Proanthocyanidines oligomères et anthocyanes	Peroxydation lipidique Système NADPH/Phénazine méthosulfate (piégeage de $O_2^{\circ-}$)	Meunier <i>et al.</i> , 1989
Quercétine, rutine, morine, acacétine, hispiduline, hespéridine, naringine	Système NADPH/Phénazine méthosulfate (piégeage de $O_2^{\circ-}$)	Yuting <i>et al.</i> , 1990
Proanthocyanidines et catéchines	Piégeage de $O_2^{\circ-}$ et OH°	Ricardo da Silva <i>et al.</i> , 1991
C-glucosyl flavones	Peroxydation lipidique sur microsomes de souris	Budzianowski <i>et al.</i> , 1991
Acide tannique, acide ellagique, myricétine, quercétine, morine, kaempférol et rutine	Peroxydation lipidique	Das et Ramanathan, 1992
(+) catéchine, kaempférol, quercétine et des flavones et hydroxyflavones	Système xanthine-xanthine oxidase	Decharneux <i>et al.</i> , 1992
Coumarines	Piégeage du radical alkyl peroxy	Paya <i>et al.</i> , 1992
Tanins galliques, spiraeoside, hypéroside, isoquercitrine, myricétine	Système xanthine-xanthine oxidase	Okamura <i>et al.</i> , 1993
Rutine, quercétine, morine, quercitrine, fisétine, rhamnétine, dihydroquercétine, (+) catéchine, (-) épicatechine	Inhibition de la chemiluminescence	Krol <i>et al.</i> , 1994
Flavonoïdes sulfates	Système xanthine-xanthine oxidase	Yagi <i>et al.</i> , 1994
Acide ellagique, acide tannique, esculétine, acide vanillique, (+) catéchine, (-) épicatechine, quercétine, morine, fisétine, myricétine	Piégeage du radical peroxy	Aruoma <i>et al.</i> , 1995

Tableau 9 : Quelques polyphénols dotés d'activité antioxydante analysés dans des systèmes de mesure couramment utilisés.

myéloperoxydase en présence du peroxyde d'hydrogène. L' α_1 -antitrypsine est un inhibiteur de certaines protéases telles que l'elastase, qui par hydrolyse de l'elastine engendre la formation d'emphysèmes pulmonaires. D'autres travaux sur des composés tels que les ions vanadate (Saxena *et al.*, 1993) et des amino-stéroïdes (Ryan *et al.*, 1993) comme antioxydants et antiradicalaires ont aussi été effectués. Par ailleurs, il existe d'autres antioxydants, dits de référence, parfois utilisés dans l'industrie alimentaire comme le BHA (butylhydroxyanisol), le BHT (bromohydroxytoluène) et des gallates de propyle, d'octyle ou de dodécyle (Alary *et al.*, 1984).

Parmi les composés naturels extraits de plantes, la famille des polyphénols, comprenant principalement des acides phénols, flavonoïdes, catéchines, proanthocyanidines et anthocyanes, est l'une des plus citée.

Parmi des acides phénols, des composés tels que l'acide chlorogénique et ses dérivés (Hayase *et al.*, 1984), les acides gallique, gentisique, vanillique, ellagique, coumarique, caféique, sinapique, férulique, syringique (Montesinos *et al.*, 1991, Toda *et al.*, 1991) et l'acide rosmarinique (Lamaison *et al.*, 1990b) ont montré leurs pouvoirs antioxydants et antiradicalaires.

Des flavonoïdes, comme des chalcones, des flavanones, des flavones, des hydroxyflavonols, des flavonols et les dérivés (aglycones et / ou hétérosides) ont été largement cités comme piègeurs de radicaux libres et antioxydants (Pincemail *et al.*, 1985, Torel *et al.*, 1986, Ratty *et al.*, 1987, Robak *et al.*, 1988, Yuting *et al.*, 1990, Das *et al.*, 1992, Hertog *et al.*, 1994).

D'autres composés de la même voie métabolique, les tanins condensés sont des substances connues pour leurs propriétés antioxydantes et antiradicalaires. Des études menées soit sur des composés individuels tels que les flavane-3-ols de types catéchines et ses dérivés galloylés ou sur des tanins de faible poids moléculaires comme des dimères ou oligomères et leurs dérivés ont montré l'efficacité de ces substances (Okuda *et al.*, 1983, Tanizawa *et al.*, 1984, Uchida *et al.*, 1987, Ariga *et al.*, 1988, Meunier *et al.*, 1989, Hatano *et al.*, 1989, Ricardo da Silva *et al.*, 1991, Facino *et al.*, 1994). Tamura et Yamagami (1994) ont également rapporté des activités antioxydantes d'anthocyanes acylées isolées à partir de *Vitis vinifera*.

Okuda *et al* (1983) et d'autres chercheurs ont montré des activités intéressantes aussi pour des composés issus de la famille des tanins hydrolysables ou galliques. Le **tableau 9** donne quelques exemples de polyphénols, dotés d'activités antioxydantes, étudiés dans des systèmes de mesure couramment utilisés.

D'autres substances telles que la rosmaridiphénol isolée de *Rosmarinus officinalis*, la curcumine extrait de *Curcuma longa*, des alcaloïdes comme la caféine extraite du thé (*Thea sinensis*) et du café (*Coffea arabica*) et des dérivés de la chlorophylle ont démontré leurs aptitudes en tant qu'antioxydants et antiradicalaires (Larson *et al.*, 1988).

D. PRESENTATION DES OBJECTIFS

Dans le contexte scientifique de cette synthèse bibliographique, notre démarche découle de trois lignes d'intérêt :

- ☞ L'équipe de notre Laboratoire, "Métabolites Secondaires" avait déjà acquis une expérience sur les cultures cellulaires *in vitro* et l'analyse des polyphénols, plus spécialement sur les proanthocyanidines,
- ☞ L'intérêt nouveau pour les dérivés naturels antioxydants parmi lesquels les polyphénols occupent une place importante,
- ☞ L'intérêt de l'Aubépine en tant que plante pharmaceutique, riche en polyphénols.

Ces éléments nous ont incité à initier des **cultures d'Aubépine *in vitro*** en complétant par des études *in vivo*, à **analyser les constituants polyphénoliques** en fonction de différents facteurs et à **vérifier les activités antioxydantes** des fractions ou des composés isolés.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

Au cours de ce travail nous avons utilisé l'Aubépine (*Crataegus monogyna* Jacq.) et plus particulièrement **4 sources** de matériel biologique :

- Différents organes de la plante.
- Des colonies tissulaires induites à partir de cals issus d'explantats cultivés *in vitro*.
- Des suspensions cellulaires cultivées *in vitro* en milieu liquide agité.
- Des préparations pharmaceutiques commerciales à base d'Aubépine.

□ 1. le matériel végétal *in vivo*

Des organes de *Crataegus monogyna* ont été cueillis à des stades variables de leur développement durant l'année 1992 dans la région de Valenciennes. Le **tableau 10** et la **Planche 1 (en annexe)** indiquent la nature des différents organes récoltés ainsi que les dates de prélèvements.

Les feuilles, fleurs et fruits, cueillis le matin, ont été séparés, pesés et conservés au congélateur à -20°C au plus tard 2 heures après.

STADES DE DEVELOPPEMENT		DATES DE RECOLTE
Parties végétatives	Parties reproductives	Année 1992
bourgeon (F1)		29 mars
jeune feuille (F2)		10 avril
feuille mature (F3)	bouton floral (A)	12 mai
feuille mature (F4)	fleur épanouie (B)	27 mai
feuille mature (F5)	fruit vert (C)	21 juin
feuille mature (F6)	fruit rouge (D)	15 septembre

Tableau 10 : Correspondance entre les organes respectifs, leur période de récolte et la désignation adoptée. Tous les organes foliaires y compris les bourgeons ont été désignés "F" ; le chiffre le plus élevé indiquant le stade le plus tardif. Pour les organes reproducteurs, l'ordre A, B, C, D commence au stade le plus précoce.

Macroéléments (B5 de Gamborg)	Quantité mg l⁻¹
KNO ₃	2500
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	150
MgSO ₄ , 7H ₂ O	250
CaCl ₂ , 2H ₂ O	150
Microéléments (B5 de Gamborg)	
MnSO ₄ , 4H ₂ O	10
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	3
Na ₂ Mo ₄ , 2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,25
KI	0,75
Fe-EDTA	19,4
Hydolysat de caséine	100
Myoinositol	100
Glycocolle	2
Saccharose	30000
Vitamines (Murashige et Skoog)	
Pyridoxine HCl (Vit.B6)	0,5
Acide nicotinique	0,5
Thiamine 2HCl (Vit. B1)	0,1
Substances de croissance :	
2,4-D et Kinétine	2 et 0,5
ANA et Kinétine	2 et 0,5

Tableau 11: Composition des milieux utilisés pour la mise en place des cultures cellulaires

□ 2. le matériel végétal *in vitro*

Les résultats concernant la distribution des phénols dans les organes végétatifs et reproducteurs à différents stades du développement *in vivo* ont montré que les **jeunes feuilles (F2)** et les **boutons floraux (A)** (**tableau 10**) étaient les plus riches. Nous avons donc choisi de mettre en culture des **limbes** et des **pétioles** de ces **feuilles** ainsi que des **ovaires** avec leur réceptacle floral provenant des **boutons floraux**.

En ce qui concerne les feuilles, les pétioles semblent plus aptes que les limbes à former des cals notamment en raison de la présence du parenchyme associé aux éléments conducteurs qui contiennent des cellules plus susceptibles de proliférer.

2.1 Prélèvement et aseptisation

Des boutons floraux fermés et des feuilles avec leurs pétioles sont prélevés et lavés à l'eau courante pendant 3 heures. Ils sont ensuite aseptisés pendant 7 minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium (210° chlorométriques) à 70 g.l⁻¹ avant de subir 4 rinçages successifs de 5, 10, 15 et 20 minutes à l'eau stérile.

2.2 Mise en culture

Le milieu de base est dans tous les cas le milieu minéral B5 de Gamborg (1968) additionné de saccharose, d'hydrolysate de caséine, de myoinositol, de glycolle et des vitamines du milieu de Murashige et Skoog (1962) (**Tableau 11**). Le pH est ajusté à 5,6 avant autoclavage et avant l'addition d'agar Biokar (5 g.l⁻¹) lorsque la culture se fait en milieu solide.

- ➔ Les **pétioles** et les **limbes** de **jeunes feuilles** sont excisés et placés sur des milieux de culture gélosés en boîte de Pétri contenant soit du 2,4-D (2 mg.l⁻¹) et la kinétine (0,5 mg.l⁻¹) soit de l'ANA (2 mg.l⁻¹) et de la kinétine (0,5 mg.l⁻¹).
- ➔ Les sépales, pétales, anthères, stigmates et pistils sont détachés des **boutons floraux** pour ne conserver que les **ovaires** avec leurs réceptacles qui sont coupés transversalement avant d'être mis sur les mêmes milieux de culture.

Les explantats issus de **pétioles**, **limbes** et **d'ovaires** sont placés à 22 ± 2°C, tout d'abord à l'obscurité, afin de limiter la formation de phénols néfastes au développement des cultures *in vitro* initiales.

2.3 Etablissement et entretien des colonies tissulaires

Six semaines après la mise en culture des explantats primaires à l'obscurité, nous avons observé une prolifération importante de cals friables sur les nervures des limbes et aux

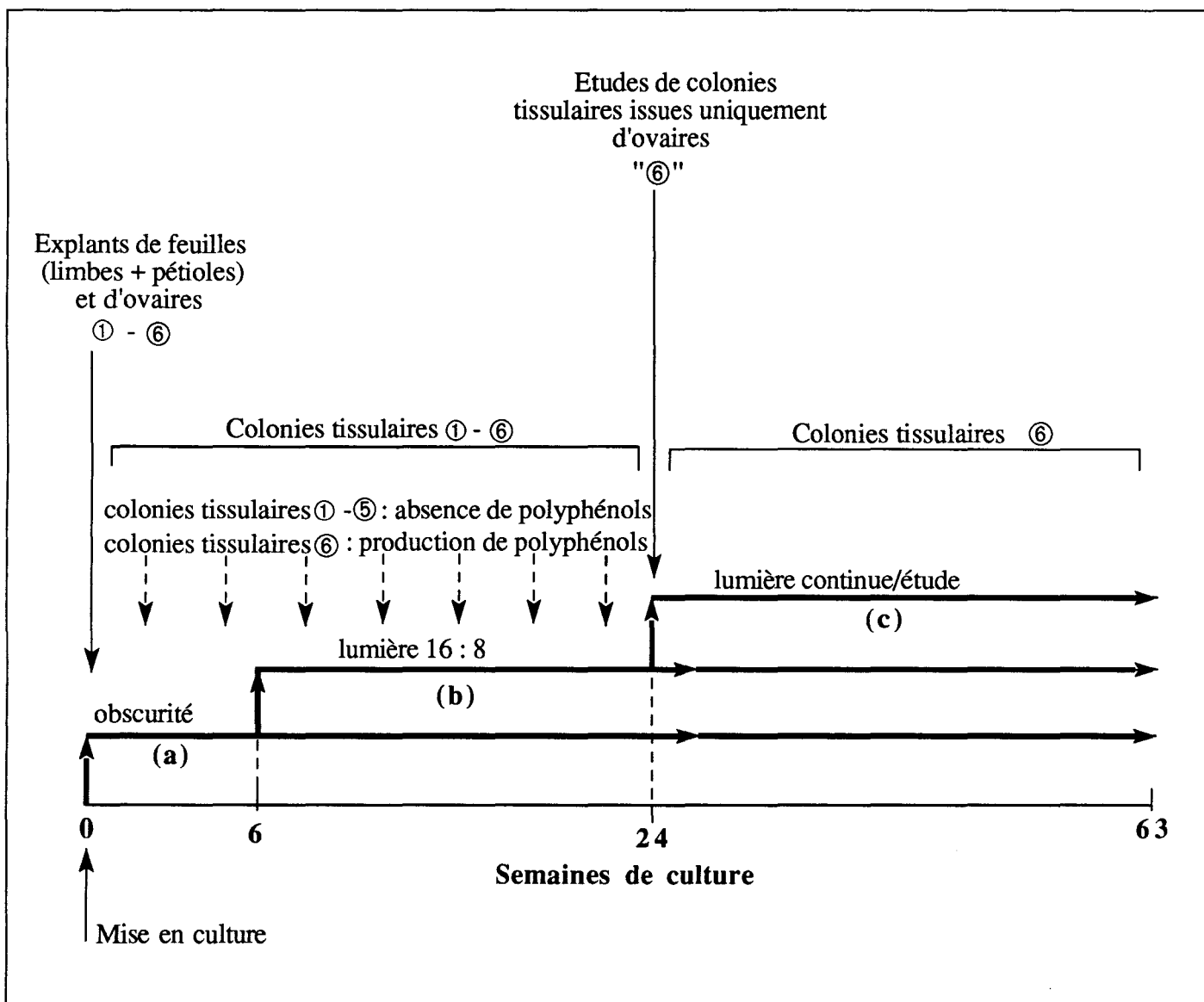


Figure 13 : Mise en place des colonies tissulaires issues de feuilles (limbes + pétioles) et de boutons floraux sur le milieu B5 de Gamborg contenant soit du 2,4-D et de la kinétine, soit de l'ANA et de la kinétine. Les colonies tissulaires d'ovaires ⑥ induites sur du 2,4-D et de la kinétine sont ensuite entretenues par repiquages successifs tous les 21 jours sur les mêmes milieux pendant 63 semaines à $22 \pm 2^\circ\text{C}$, soit à l'obscurité (a), ou en lumière 16 : 8 à partir de la 6ème semaine (b) ou en lumière continue à partir de la 24ème semaine de culture (c).

Les colonies tissulaires ① - ⑤, non-productrices en polyphénols, sont entretenues dans les mêmes conditions et ne sont plus étudiées après la 24ème semaine de culture.

extrémités des pétioles pour les **organes foliaires** ainsi que sur pratiquement toute la surface des **tissus ovariens**. Les cals formés sont repiqués sur les mêmes milieux. Dès lors, nous avons eu à notre disposition **six souches** désignées ① à ⑥ dans la suite de ce travail (**Figures 13 et 14**).

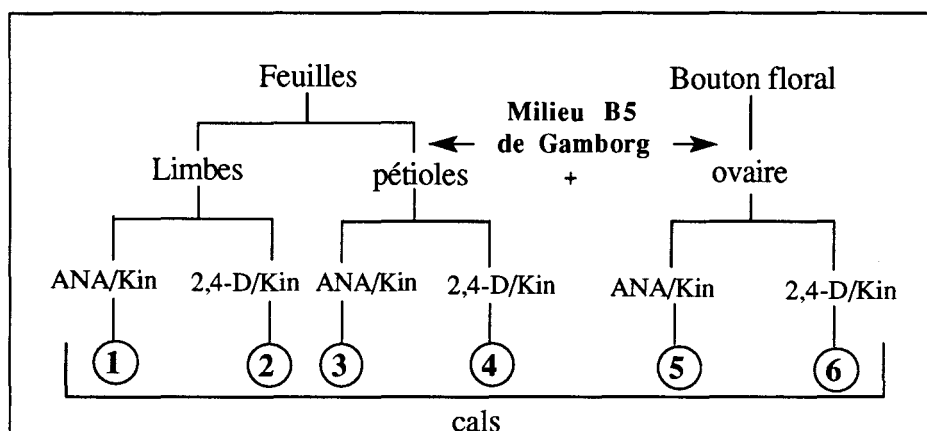


Figure 14 : Mise en place de cals ① - ⑥ à partir d'explantats de jeunes feuilles (limbes et pétioles) et de boutons floraux d'Aubépine sur un milieu B5 de Gamborg en présence soit d'ANA/Kinétine, soit de 2,4-D/Kinétine. Les cals sont formés 6 semaines après la mise en culture à l'obscurité et à 22°C .

Chaque souche est ensuite transférée (semaine 6-24) dans des conditions d'éclairage de 16 heures de lumière (tubes fluorescents Cool White Deluxe, 16 Wm⁻²) (**Figure 13, ligne (b)**) à 22 ± 2°C et entretenue par repiquages successifs dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant 25 ml de milieu (3 ou 4 amas cellulaires de 150 ± 25 mg par boîte). Sauf spécification contraire, la périodicité des repiquages est de 21 jours. Pour éviter une évaporation trop importante, les boîtes sont scellées par du Parafilm®.

Toutes les souches ① - ⑥ ont été suivies, plus particulièrement, entre la semaine 6-24. A partir de la 6^{ème} semaine jusqu'à la 24^{ème}, les colonies tissulaires ⑥ (issues du bouton floral) ont montré de plus en plus nettement, en fin de chaque subculture, des zones pigmentées en rouge dans la couche superficielle.

En raison de l'expérience acquise au laboratoire avec les colonies tissulaires de Sarrasin (Moumou *et al.*, 1987) qui produisent une quantité accrue de polyphénols en lumière continue nous avons effectué, lors des différents repiquages, une sélection à partir de ces tissus colorés et avons transféré à la 24^{ème} semaine une partie des colonies sous 24 h de lumière (tubes fluorescents Cool White Deluxe, 16 Wm⁻²) (**Figure 13, ligne (c)**) dans les mêmes conditions de température, l'autre partie restant sous 16 h d'éclairage (**Figure 13, ligne (b), semaine 24-63**). Les colonies ①-⑤ (non productives en polyphénols Cf. résultats) ont simplement été entretenues à partir de la 24^{ème} semaine sans que leur étude ne soit poursuivie. La démarche expérimentale globale concernant le développement de ces colonies tissulaires à différentes conditions de culture est schématisée dans la **figure 13**.

2.4 Etablissement et entretien des suspensions cellulaires

Des suspensions cellulaires ont été établies à partir des colonies tissulaires âgées de deux ans cultivées en lumière continue à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (tubes fluorescents Cool White Deluxe, 16 Wm^{-2}) sur un agitateur tournant à $70 \text{ tours min}^{-1}$ avec une inclinaison de 40° . Ces cultures cellulaires sont préalablement filtrées et repiquées tous les 30 jours dans des fioles contenant 200 ml d'un milieu liquide ayant la même composition que celle utilisée pour les cals (**Tableau 11**).

2.5 Croissance au cours d'une subculture de 40 jours

Pour l'étude de la composition phénolique des colonies tissulaires et des suspensions cellulaires, une subculture a été suivie durant 40 jours en évaluant la croissance tous les quatre jours.

Dans le cas des **colonies tissulaires** la masse de matière fraîche est déterminée en pesant le contenu de 3 boîtes de Pétri (moyenne \pm écart type) et pour les **suspensions cellulaires** on prend en compte la masse des cellules issues de 2 fioles de culture à chaque fois.

Le poids de matière sèche est évalué après passage des échantillons à l'étuve (110°C) jusqu'à l'obtention d'une valeur constante.

□ 3. les préparations pharmaceutiques d'aubépine

Nous nous sommes procurés dans le circuit Pharmaceutique (Officine ou Fournisseur Grossiste) des formes couramment vendues soit parce qu'elles sont la matière première de tisanes et de gélules, soit parce qu'elles correspondent à des préparations spécialisées connues sous un nom déposé et ne contenant que de l'Aubépine ou ses extraits. Nous appellerons ces différents produits "Formes et Préparations Pharmaceutiques".

Elles présentent les caractéristiques suivantes :

3.1 Plante sèche

N.B. : Le terme de "drogue" est celui employé en Pharmacie pour caractériser la partie utilisée de la plante matière première.

- Sommités fleuries séchées (Coopération Pharmaceutique Française, référence. P 52234)). Indication de provenance : Italie
- Fleurs séchées (Coopération Pharmaceutique Française, référence. P 52263). Même provenance.

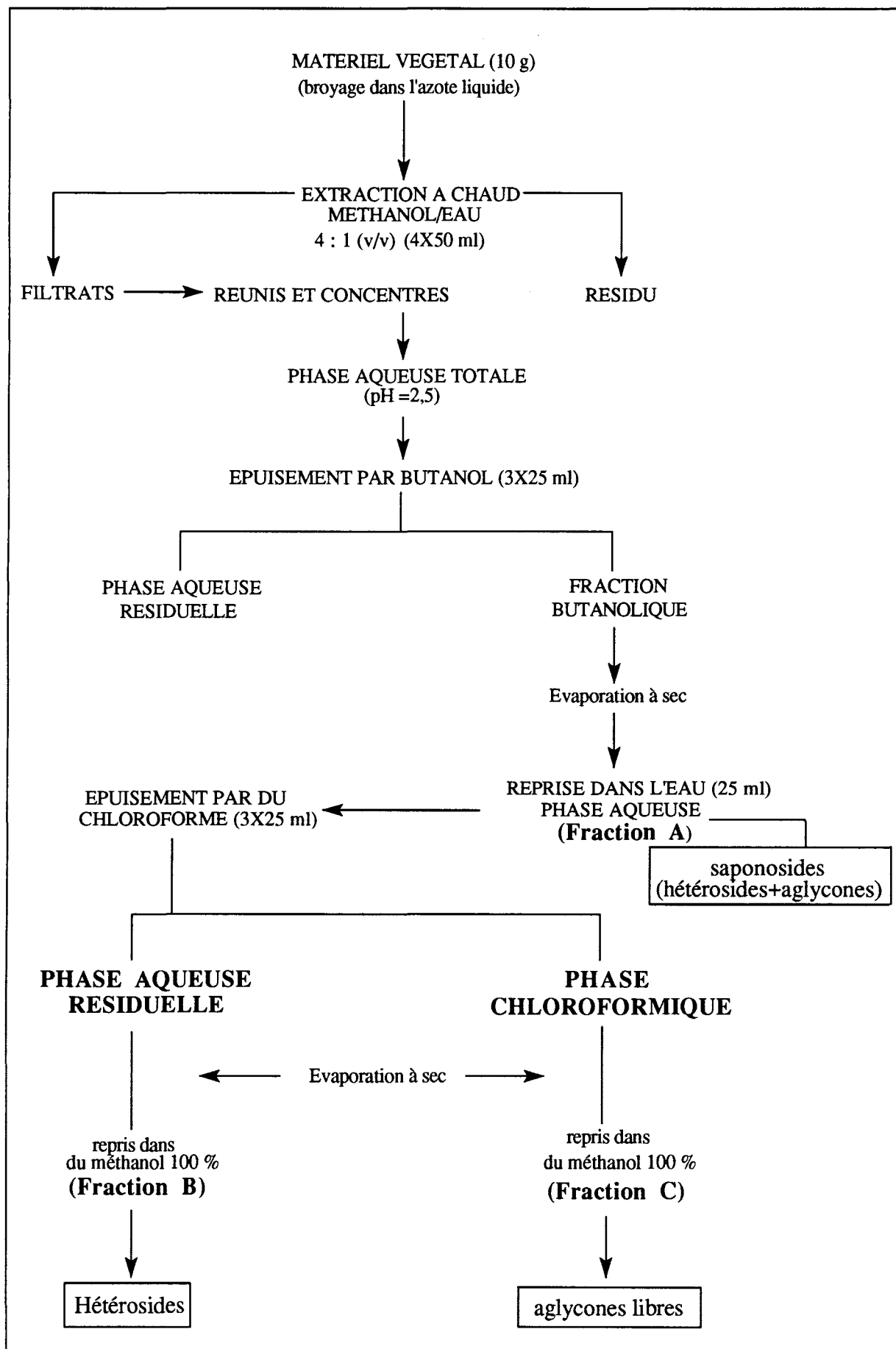


Figure 15 : Protocole d'extraction des dérivés triterpéniques (d'après Tschesche, 1973)

3.2 Formes galéniques

N.B : Les formes galéniques étudiées sont des extraits dont le mode de préparation est légalement normalisé par la Pharmacopée Française.

- ➔ Extrait Fluide : défini selon les normes de la Pharmacopée Française par une extraction à l'alcool à 45% des sommités fleuries; 1g de liquide équivaut à 1 g de plante sèche (Laboratoires Vernin, Lot 32657).
- ➔ Teinture : définie selon la Pharmacopée par une extraction à l'alcool à 60% des sommités fleuries; 1g de liquide équivaut à 0,2 g de plante sèche (Laboratoires Vernin, Lot 32657).

3.3 Spécialités

- ➔ Titrex[®] : nébulisats d'extraits hydroéthanoliques (à 30%) d'Aubépine (*Crataegus oxyacantha*); 1 g de nébulisat équivaut à 5 g de plante sèche. (Laboratoires Vernin, Lot 33949, T 102).
- ➔ Arkotitrat[®] : poudre cryobroyée de sommités fleuries d'Aubépine; 1 g de poudre Arkotitrat[®] équivaut à 5 g de plante sèche. (Laboratoires Arkopharma, Lot A 09807).

II. EXTRACTION ET PURIFICATION

□ 1. A partir de tissus *in vivo* et *in vitro*

1.1 Les dérivés triterpéniques

Le protocole utilisé (**Figure 15**) est adapté du procédé décrit par Tschesche (1973) pour les saponosides triterpéniques. Le matériel végétal (10 g) est broyé dans de l'azote liquide. Après un lavage avec de l'éther de pétrole, on extrait à chaud avec un mélange méthanol/eau 4 : 1 (v/v). Les filtrats réunis sont concentrés sous vide pour éliminer le méthanol. La phase aqueuse totale, ajustée à un pH 2,5 avec de l'acide chlorhydrique est épuisée par du butanol.

Les fractions butanoliques sont évaporées à sec et le résidu est repris par 25 ml d'eau qui constitue **une phase aqueuse (fraction A)** contenant des saponosides (hétérosides et aglycones libres). Pour séparer les aglycones des hétérosides, cette phase aqueuse est épuisée à 3 reprises par 25 ml de chloroforme pour donner **une phase aqueuse résiduelle** à l'origine de la **fraction B** (hétérosides) et **une phase chloroformique** qui donnera la **fraction C** (aglycones libres) dont les concentrations finales seront amenées à 1g de matière fraîche/5 ml de méthanol. Ce sont les fractions **A, B, et C** qui seront utilisées pour l'analyse des dérivés triterpéniques.

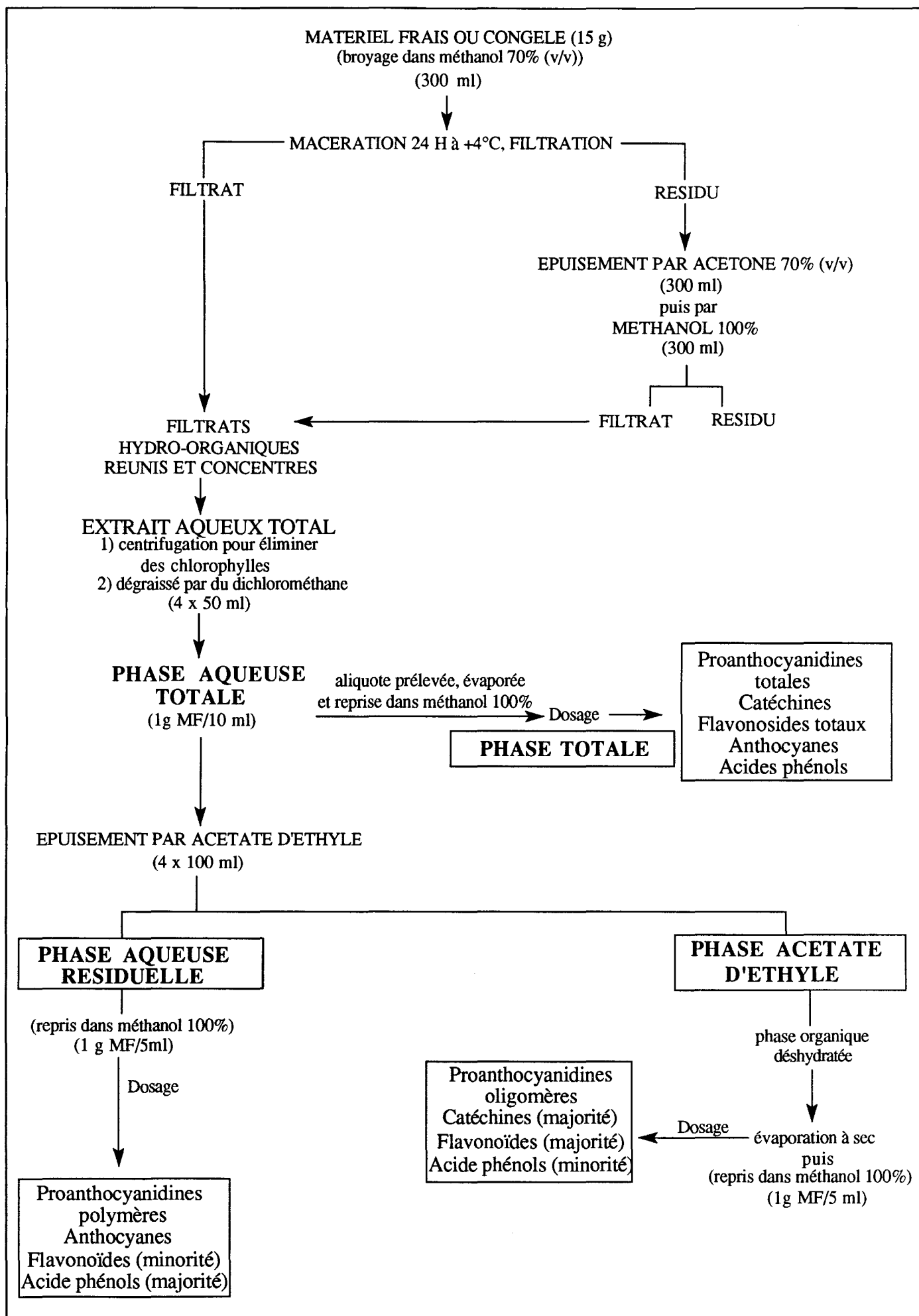


Figure 16 : Protocole d'extraction des polyphénols

1.2 Les polyphénols

Le matériel végétal (15 g) est broyé directement dans un mélange méthanol/eau (70/30 (v/v)) (300 ml) et le contact dans le solvant est maintenu 24 heures à 4°C (**Figure 16**). Après filtration, on renouvelle l'extraction dans un mélange acétone/eau (70/30 (v/v)) (300 ml) puis finalement dans du méthanol absolu (300 ml); 24 heures à chaque fois et à 4°C. Les filtrats réunis sont concentrés sous vide à une température inférieure à 40°C.

Après élimination des solvants organiques, l'extrait aqueux total est centrifugé et lavé par du dichlorométhane pour enlever les chlorophylles et les lipides. La **phase aqueuse totale** obtenue est divisée en 2 parties égales.

La 1ère partie est évaporée à sec et le résidu est repris dans du méthanol absolu, pour constituer **une phase totale** contenant l'ensemble des polyphénols, qui est amenée à la concentration de 1 g de matière fraîche pour 10 ml de solvant.

La 2ème partie est épuisée plusieurs fois par de l'acétate d'éthyle donnant une **phase acétate d'éthyle** et une **phase aqueuse résiduelle**. Les fractions acétate d'éthyle sont séchées sur du sulfate de sodium avant d'être évaporées à sec et reprises dans du méthanol à une concentration de 1 g de matière fraîche pour 5 ml de solvant. La **phase aqueuse résiduelle** est évaporée et reprise dans du méthanol à une concentration de 1 g de matière fraîche pour 5 ml de solvant.

Note : Pour les besoins de l'analyse des portions aliquotes des phases totales ont été peracétylées selon la méthode de Engelshowe *et al.*, (1983) de la façon suivante :

20 ml d'extrait correspondant à 2 g de masse fraîche de matériel végétal sont évaporés à sec, dissouts dans 0,8 ml de pyridine anhydre puis additionnés de 1 ml d'anhydride acétique. On laisse 24 heures à température ambiante à flacons bouchés. Les peracétates formés sont ensuite précipités par addition de 20 ml d'eau distillée glacée. Après centrifugation on lave 3 à 5 fois par 10 ml d'eau glacée. Le précipité blanc de peracétate est alors dissout dans de l'acétone. Des témoins (+) catéchine, (-) épicatechine et dimères de proanthocyanidines sont également peracétylés par cette méthode et sont co-chromatographiés avec les peracétates des extraits végétaux.

□ 2. A partir du milieu liquide des suspensions cellulaires

Le milieu liquide des suspensions cellulaires (100 ml) est épuisé à 3 reprises par 100 ml d'acétate d'éthyle. Les **phases acétate d'éthyle**, séchées sur du sulfate de sodium sont évaporées et le résidu repris par 10 ml de méthanol. La **phase aqueuse résiduelle**, évaporée à sec, est reprise par 25 ml de méthanol et filtrée. Les fractions serviront à l'analyse des différents polyphénols.

□ 3. A partir de préparations pharmaceutiques commerciales

Les extractions conduites sur les préparations commerciales pharmaceutiques ont été réalisées rapidement après l'achat. Un extrait global brut de sommités fleuries séchées, de fleurs séchées, de Titrex® et de l'Arkotitrat® a été obtenu par le même mode d'extraction (Figure 16) que pour les organes de plante et les cultures cellulaires. Pour l'Extrait Fluide et la Teinture, les portions aliquotes prélevées ont été évaporées à sec puis reprises par du méthanol absolu (200 ml) et filtrées pour éliminer les dépôts.

Les concentrations finales sont ramenées à 1 g de plante sèche pour 10 ml de méthanol pour les Sommités fleuries séchées, les Fleurs séchées, le Titrex®, l'Extrait Fluide et la Teinture et à 1 g de plante sèche pour 25 ml de méthanol pour l'Arkotitrat®.

III. SEPARATION

□ 1. Chromatographie sur couche mince

Les extraits végétaux ont été analysés en chromatographie sur couche mince de cellulose et sur gel de silice. Les systèmes utilisés ont été choisis dans la littérature et adaptés en fonction des composés à séparer : flavones/flavonols (Markham *et al.*, 1982, Lamaison *et al.*, 1991, Markham *et al.*, 1989), proanthocyanidines (Thompson *et al.*, 1972, Engelshowe *et al.*, 1983, Lea *et al.*, 1979), acides phénols (Das *et al.*, 1972, Van sumere *et al.*, (1989)).

■ En chromatographie monodimensionnelle

Les solvants de migration diffèrent selon la nature du support :

Sur **Silice** (Merck), nous avons utilisé 4 types de solvants

- toluène/acétone/acide formique 3 : 3 : 1 (v/v)
- benzène/acétone 4 : 1 (v/v) (après peracétylation des extraits)
- acétate d'éthyle/acide formique/eau 8 : 1 : 1 (v/v)
- chloroforme/méthanol/eau 65 : 35 : 10 (v/v) (couche inférieure)

Sur **Cellulose** (Merck) les solvants retenus sont constitués de :

- acide acétique 15% (v/v)
- butanol/acide acétique/eau 4 : 1 : 5 (v/v) (couche supérieure)

■ En chromatographie bidimensionnelle sur cellulose (Merck)

- acide acétique 6% puis
butanol-2/acide acétique/eau 14 : 1 : 5 (v/v)

Réactifs	-		AlCl ₃		NH ₃		Diphénylborate de-β-aminoéthyle (DPBAE)		Vanilline/ HCl	Anisaldéhyde sulfurique
	Visible	U.V	Visible	U.V	Visible	U.V	Visible	U.V	Visible	Visible
Chalcones	Jaune	Brun-rouge	Jaune	Jaune-vert, Jaune-orangé, Jaune	-	Orangé	-	Jaune-vif	-	-
Aurones	Rouge	Brun-rouge	Jaune	Jaune-vert, Jaune-orangé, Jaune	-	Orangé	-	Jaune-vif	-	-
Flavones	Jaune	Brun ou Bleu clair	Jaune	Jaune	Jaune vif	Jaune-vert	Jaune	Jaune-orangé ou Jaune-vert	-	-
Flavonols	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune vif	Jaune-vert	Jaune	Jaune-orangé ou Jaune vert	-	-
Acides phénols	-	Bleu, Violet	-	Bleu, Violet	-	Bleu, Violet	-	-	-	-
Catéchines	-	Brun	-	Brun	-	Brun	-	Brun	Rouge	Rouge-orangé
Proantho- cyanidines	-	Brun	-	Brun	-	Brun	-	Brun	Rouge	Rouge-orangé
Anthocyanes	Rouge	Brun pourpre	Bleu	Violet	Bleu	Bleu, Violet	Bleu	Bleu	Rouge	Rouge-orangé

Tableau 12 : Identification des polyphénols en présence de différents réactifs par observation en lumière visible ou sous U.V.

■ **Révélation :** On observe les taches obtenues en :

- lumière visible
- lumière ultraviolette à 365 nm ou 280 nm
- lumière ultraviolette à 365 nm après addition de diphénylborate de β -aminoéthyl méthanolique (DPBAE 1%) suivi de polyéthylène glycol 4000 (5% dans l'éthanol absolu).
- lumière visible + anisaldéhyde sulfurique (anisaldéhyde 0,5 ml, acide sulfurique (98%) 5 ml, acide acétique 10 ml, et méthanol 85 ml), après chauffage.
- lumière visible + réactif de Lieberman-Burchard (anhydride acétique 5 ml, acide sulfurique 98% 5 ml et éthanol 50 ml) après chauffage à 100°C.

Les colorations après révélation sont résumées dans le **tableau 12**.

□ 2. Chromatographie sur colonne

Pour l'obtention de la proanthocyanidine dimère B2, nous avons effectué une séparation à partir d'un extrait d'oligomères procyanidoliques de pépins de Raisin, basée sur une technique proche de celle utilisée par Thompson *et al.*, (1972).

4 g d'oligomères sont fractionnés successivement sur des colonnes de Sephadex LH 20, d'abord par l'éthanol à 100% (colonne 2,5 cm x 90 cm), puis à 25% et finalement à 15% (colonne 2,5 cm x 40 cm). Un suivi analytique est effectué par chromatographie sur couche mince de silice (systèmes : toluène/acétone/acide formique 3 : 3 : 1 et benzène/acétone 4 : 1). On obtient une fraction dans l'éthanol à 15% contenant le dimère B2, qui est évaporée sous pression réduite, reprise par l'eau et lyophilisée. Le dimère obtenu (28 mg) est à 90% de pureté (analyse en chromatographie liquide haute pression (CLHP), gradient indiqué ci-dessous) et contient une petite proportion de dimère B1 (comparaison CLHP avec des témoins obtenus antérieurement par Moumou *et al.*, (1992)).

□ 3. Chromatographie liquide haute pression

Les nombreuses mises au point de la littérature (Jerumanis *et al.*, 1979, Lea *et al.*, 1982, Van de Castele *et al.*, 1983, Van sumere *et al.*, 1989...) indiquent que des solvants comportant des proportions variables d'eau/méthanol/acide acétique ou des mélanges acidifiés d'acétonitrile et d'eau sont couramment utilisés pour la séparation des polyphénols.

Dans ce travail nous avons utilisé une technique déjà décrite pour séparer les polyphénols de la Vigne (raisin) (Boukharta *et al.*, 1988a) et du Sarrasin (Moumou *et al.*,

1992a) et qui nécessite l'utilisation d'une colonne Ultrasphère RP 18 (5 μm) (46 mm x 150 mm). Avant injection, les extraits méthanoliques sont filtrés sur Millipore (0,45 μm). La séparation est réalisée par un gradient d'élution de **solvant B** (acétonitrile/eau 1 : 1 (v/v), pH 2,6) dans le **solvant A** (acétonitrile/eau 1 : 9 (v/v), pH 2,6). Les solvants ont été acidifiés par de l'acide orthophosphorique. L'appareil utilisé est de marque LKB (série 2150) avec un enregistreur LKB 2210 et un intégrateur Shimadzu C-R5A Chromatopac.

Les caractéristiques de l'élution sont les suivantes :

- Gradient

Temps (minutes)	% A	% B
0	100	0
10	100	0
30	85	15
50	85	15
60	75	25
90	0	100
100	100	0

- Volume de l'injecteur : 20 μl
- Débit : 0,7 ml / minute
- Pression : 50 bars
- Température : 25 °C
- Détection : détecteur U.V à 280 nm et 362 nm

Les solvants ont toujours été filtrés sur filtre Millipore : HVLP 04700, 0,2 μm et dégazés par de l'hélium.

IV. DOSAGE

□ 1. Colorimétrie

1.1 Phénols totaux

Le dosage des phénols totaux est effectué par une méthode adaptée de Singleton *et al.*, (1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu (Merck).

Mode opératoire : On ajoute 0,5 ml d'une solution aqueuse de l'extrait à doser à 7 ml d'eau distillée et on mélange à 0,5 ml de la solution de Folin-Ciocalteu. Après 3 minutes, on ajoute 2 ml d'une solution de Na_2CO_3 à 20% et l'ensemble est porté au bain-marie à 100°C

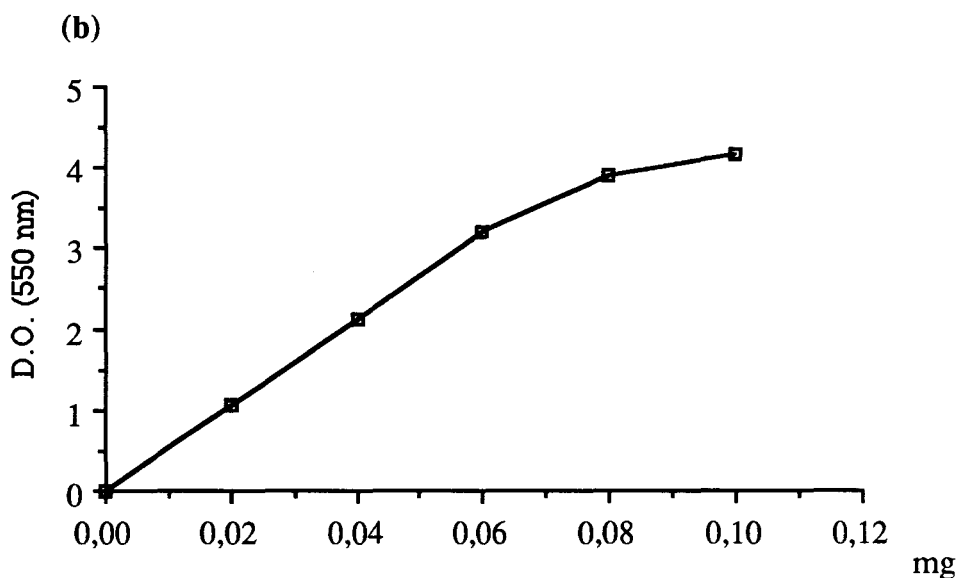
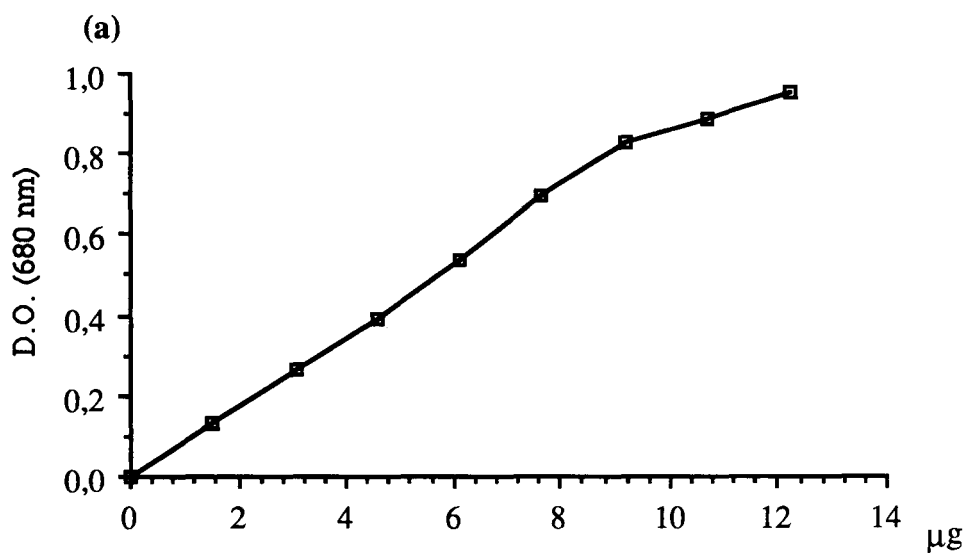


Figure 17 : Courbes étalons pour la détermination des phénols totaux (a- substance de référence = acide gallique) selon la méthode adaptée de Singleton et al., (1965), des proanthocyanidines et des anthocyanes (b- substance de référence = chlorure de cyanidine) selon Porter et al., (1986).

pendant une minute. Après refroidissement, à l'obscurité, une coloration bleue apparaît, dont l'intensité, mesurée au spectrophotomètre à 685 nm, est proportionnelle à la teneur en phénols des extraits. A partir d'une courbe étalon d'acide gallique (solution mère : 0,153 mg/ml) (**Figure 17a**), les résultats sont alors exprimés en mg de phénols (par rapport à de l'acide gallique) pour 100 g de masse sèche.

1.2 Anthocyanes et proanthocyanidines

Nous avons utilisé la méthode de Swain et Hillis (1959) modifiée par Porter *et al.*, (1986). La méthode est standardisée de la manière suivante : à chaque tube contenant 0,5 ml d'extrait végétal, on ajoute 0,5 ml de MeOH, 6 ml d'une solution de n-butanol-HCl conc. (95 : 5, v/v) et 0,2 ml d'une solution à 2% (m/v) de $\text{NH}_4 \text{Fe} (\text{SO})_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ dans HCl 2M. Les tubes sont hermétiquement scellés et chauffés à $95^\circ\text{C} \pm 0,2^\circ\text{C}$ pendant 40 minutes.

Après chauffage il y a libération d'anthocyanes qui ont une couleur rouge caractéristique et un maximum d'absorption à 550 nm. Quand les extraits contiennent des anthocyanes en même temps que des proanthocyanidines la valeur de l'absorption due aux anthocyanes (lecture avant chauffage) est retranchée de la valeur globale obtenue après chauffage. Les quantités d'anthocyanes et de proanthocyanidines sont évaluées par rapport à une gamme étalon de chlorure de cyanidine (**Figure 17b**) à 550 nm et exprimées arbitrairement en mg de chlorure de cyanidine pour 100 g de matière sèche.

1.3 Flavonoïdes totaux

En raison de la grande complexité en flavonoïdes des extraits végétaux et pharmaceutiques mais aussi en raison de l'absence de certains témoins (vitexine-2''-O-rhamnoside-4'''-acétylé), nous avons effectué des dosages colorimétriques généralement utilisés en Pharmacie par la Pharmacopée Française pour des contrôles de la plante.

Ces dosages globaux donnent de bonnes indications par rapport aux dosages sélectifs des dérivés individuels. Nous avons testé deux méthodes de dosage afin de choisir la mieux adaptée et la plus précise.

Remarque : Dans le cas de la plante, le flavonoïde dominant n'est pas le même que celui présent dans les feuilles ou les organes reproducteurs. C'est pourquoi certains auteurs (Lamaison *et al.*, 1991) emploient 2 standards différents (**vitexine** : organes foliaires ; **hypéroside** : fleurs et fruits), et de plus, par souci de rigueur, comparent les valeurs colorimétriques obtenues avec 2 agents complexants différents : **trichlorure d'aluminium** et le **réactif à l'oxaloborique**. Nous avons essayé une méthodologie voisine.

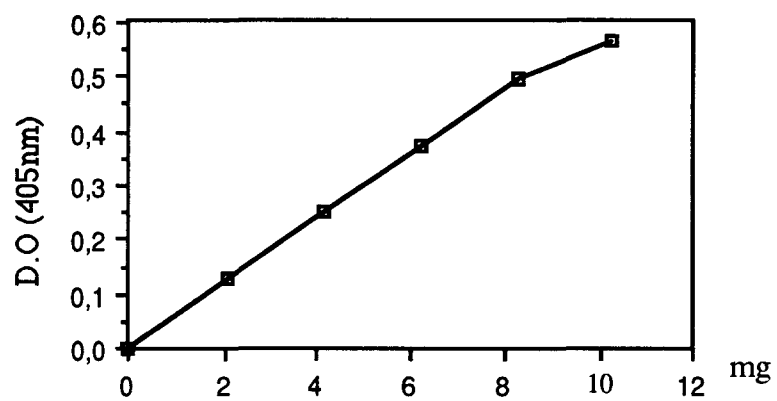


Figure 18 : Courbe étalon de la vitexine (solution mère à 0,166 mg/ml) pour le dosage des flavonoïdes par la méthode au réactif oxaloborique

a) Méthode au réactif oxaloborique

Nous avons essayé la méthode au réactif oxaloborique, qui est mieux adaptée à la composition des feuilles.

Réactif oxaloborique : dissoudre 2 g d'acide oxalique et 2,5 g d'acide borique dans 100 ml d'acide formique. Une solution de vitexine dans le méthanol a été utilisée comme étalon.

Mode opératoire : 5 ml d'extrait de plante correspondant à 0,5 g de masse fraîche sont évaporés à siccité. Le résidu est repris dans 11 ml du mélange méthanol-acide acétique (1-10 v/v). On ajoute 10 ml de réactif oxaloborique et on complète le tout à 25 ml avec de l'acide acétique anhydre. Après 30 minutes la densité optique est mesurée à 405 nm par rapport à un témoin. La quantité de flavonosides est déduite à partir de la gamme étalon et exprimée en mg de vitexine pour 100 g de masse sèche (**Figure 18**). Nous n'avons pas trouvé d'avantage décisif à cette méthode qui nous a semblé complexe et assez longue à mettre en oeuvre.

b) Méthode au Trichlorure d'aluminium

A partir d'une méthode adaptée de Lamaison *et al.*, (1991) nous avons effectué un dosage direct par le trichlorure d'aluminium, avec comme étalon le flavonoïde dominant selon le type de matériel végétal analysé : la vitexine pour les feuilles et l'hypéroside pour les fleurs et les fruits. Dans le cas des préparations pharmaceutiques (fleurs séchées, sommités fleuries séchées, l'Extrait fluide, la Teinture l'Arkotitrat[®], et le Titrex[®]), afin d'uniformiser avec les normes et méthodes utilisées par la Pharmacopée Française, nous avons employé une gamme étalon de vitexine-2''-O-rhamnoside.

Réactif au trichlorure d'aluminium : $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à 2% (m/v) dans le méthanol. Nous utilisons comme témoins des solutions méthanoliques d'hypéroside à 0,02 mg/ml, de vitexine à 0,166 mg/ml et de vitexine-2''-O-rhamnoside à 0,025 mg/ml de méthanol.

Mode opératoire : 1 ml d'extrait est ajouté à 4 ml de méthanol (dilution 1/5). 1 ml de cette solution est prélevé et mélangé à 1 ml de réactif. Après 10 minutes la densité optique est lue à 430 nm pour les extraits de feuilles et à 394 nm pour les extraits de fleurs et de fruits par rapport à un blanc contenant une solution de trichlorure d'aluminium. La quantité de flavonosides est alors déduite à partir des gammes étalons correspondantes (**Figure 19a,b et c**) et exprimée en mg de vitexine (feuilles), d'hypéroside (fleurs et fruits) et de vitexine-2''-O-rhamnoside (préparations pharmaceutiques) pour 100 g de masse sèche.

Cette méthode est plus simple que celle au réactif oxaloborique et la plus utilisée. Nous l'avons conservée pour tous nos dosages de flavonoïdes totaux.

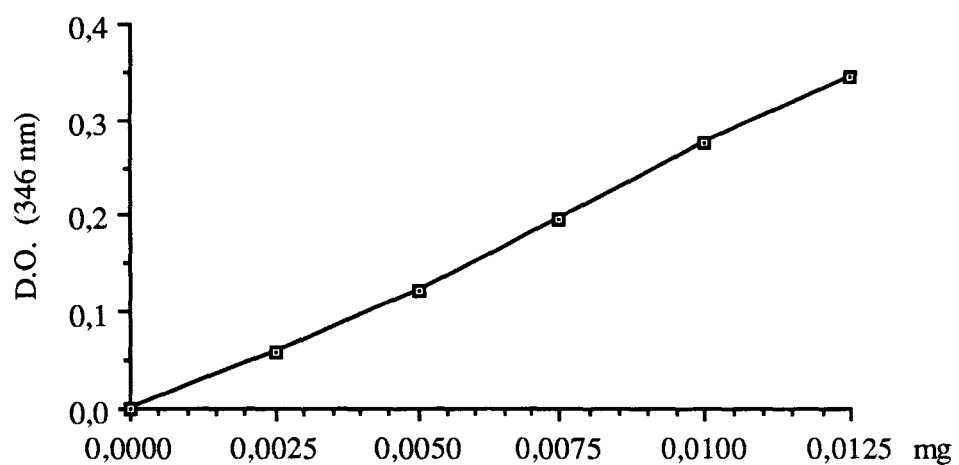
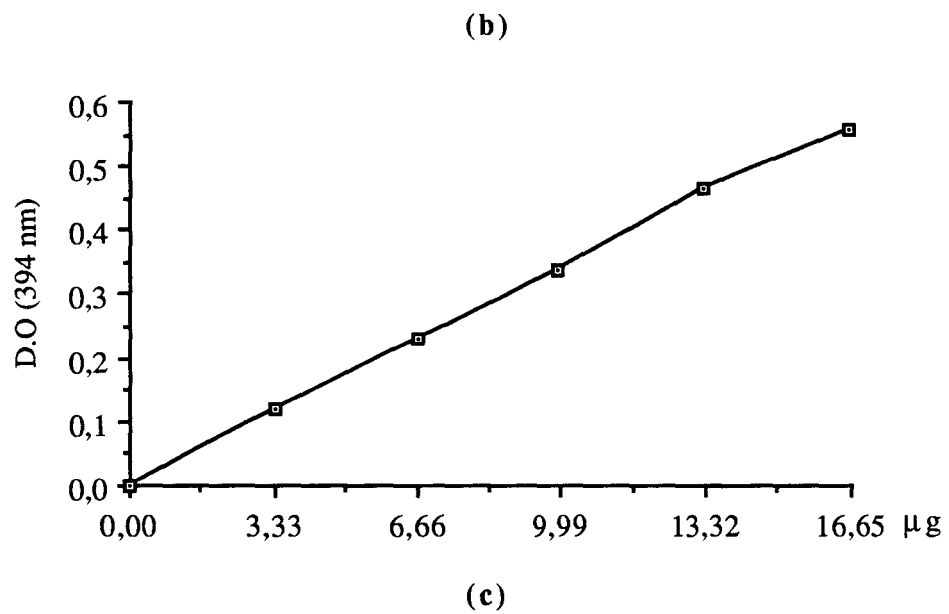
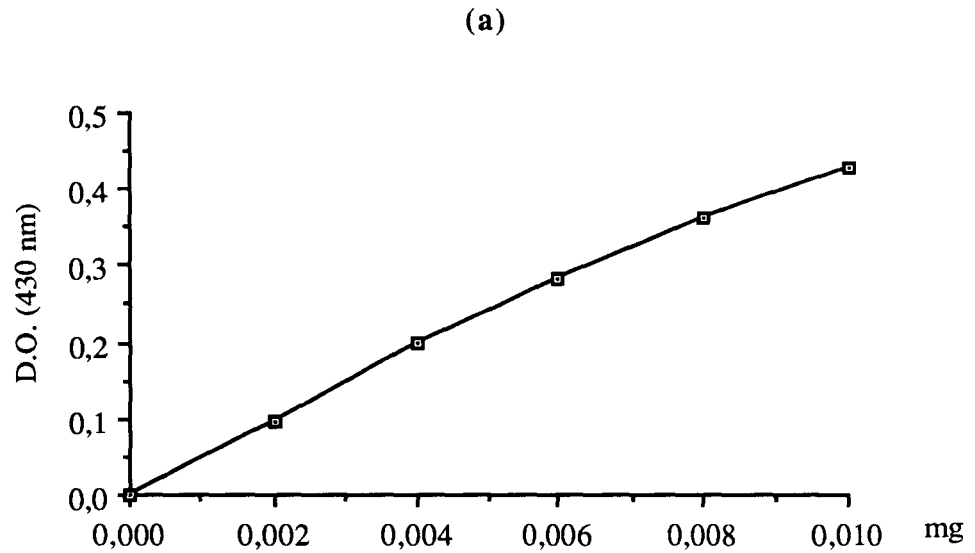


Figure 19 : Courbes étalon pour la détermination des flavonoïdes totaux : **a**-substances de référence = hypéroside pour les fleurs et fruits, **b**- substance de référence = vitexine pour les feuilles, **c**- substance de référence = vitexine 2''-O-rhamnoside pour les préparations pharmaceutiques

□ 2. Chromatographie liquide haute pression

La (-) épicatechine, l'acide chlorogénique, l'hypéroside, l'isoquercitroside, la vitexine-2''-rhamnoside et le spiraeoside ont été dosés par rapport à des témoins internes et externes (Extrasynthèse) à 280 nm pour les acides phénols, catéchines et proanthocyanidines et à 360 nm pour les flavonoïdes. La proanthocyanidine dimère B2 provenait d'une extraction effectuée par nos soins à partir de pépins de *Vitis vinifera*. Les résultats sont exprimés en mg de polyphénols pour 100 g de masse sèche.

V. DETERMINATION DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES

Les mesures d'activités antioxydantes ont été effectuées en collaboration avec d'autres Laboratoires de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lille II, notamment ceux de **Toxicologie** pour la peroxydation lipidique et de **Pharmacologie** pour les activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) et de l'acide hypochloreux (HOCl).

□ 1. Détermination des activités antilipoperoxydantes

Ce test consiste à déterminer la concentration en substance antioxydante capable d'inhiber 50 % de la production de **malondialdéhyde (MDA)** induite par un couple rédox à partir d'une suspension de microsomes de foie de rat.

1.1 Obtention des microsomes

Les foies de rats Wistar, sont prélevés, lavés au NaCl 0,9% et broyés au Potter. Des centrifugations successives à 500 g et à 10 000 g pendant 20 minutes (recueil du surnageant), à 105 000g pendant 60 minutes (recueil du culot), puis à 105 000 g pendant 60 minutes (élimination de l'hémoglobine en présence de tampon pyrophosphate) sont réalisées sur le broyat. Toutes les étapes de préparation des microsomes sont effectuées à 4°C (**Figure 20**).

Après le dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) au bleu de Coomassie, les suspensions de microsomes sont conservées à -80°C en tube Eppendorf à la concentration de 10 mg de protéines microsomales par ml de tampon.

1.2 Réalisation du test à l'acide thiobarbiturique (test TBA)

Le MDA est dosé sous forme d'un complexe rose constitué de MDA et d'acide thiobarbiturique (TBA). Les conditions d'obtention et d'analyse du complexe malondialdéhyde-acide thiobarbiturique (MDA-TBA) nécessitent plusieurs étapes:

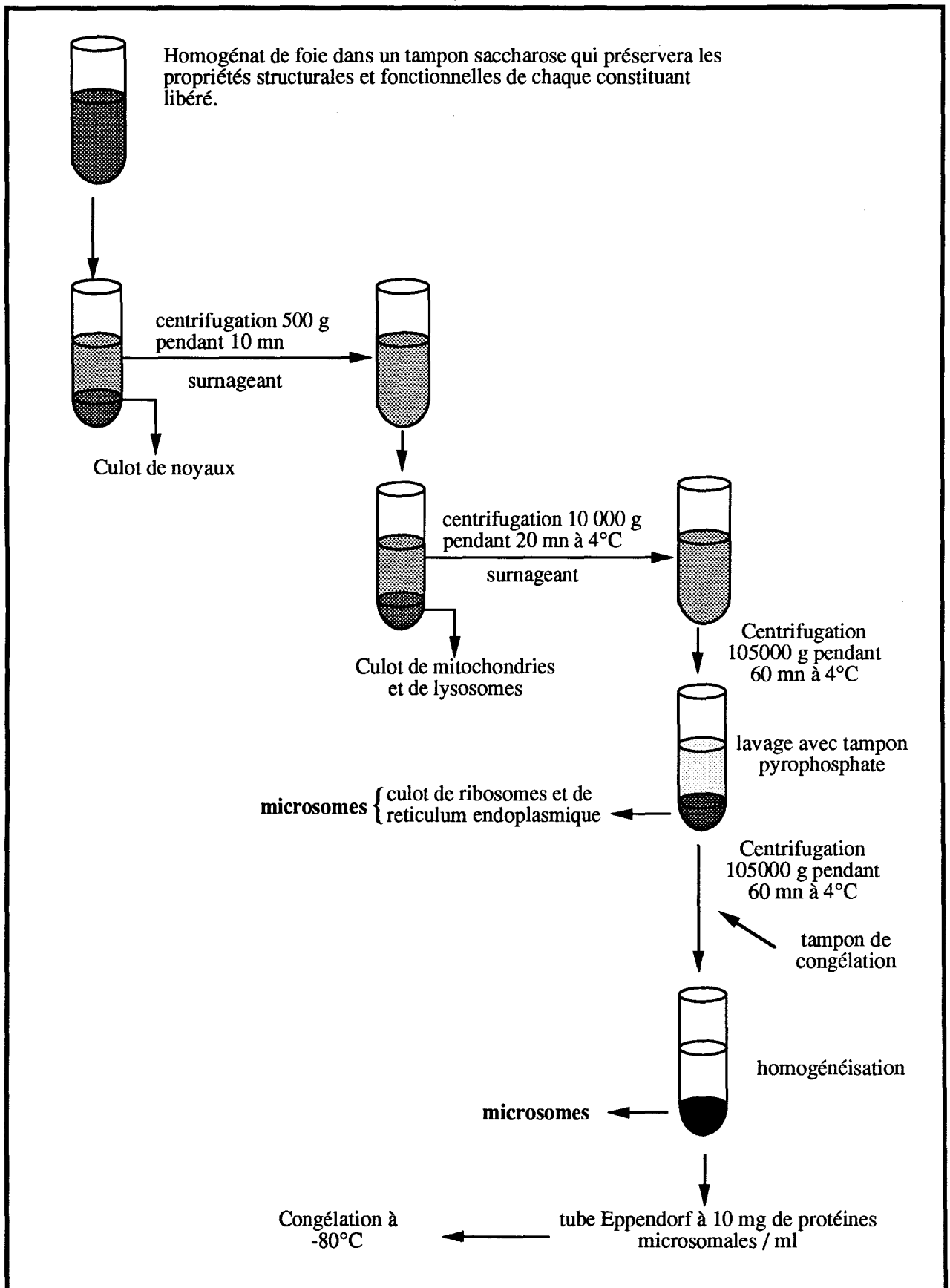
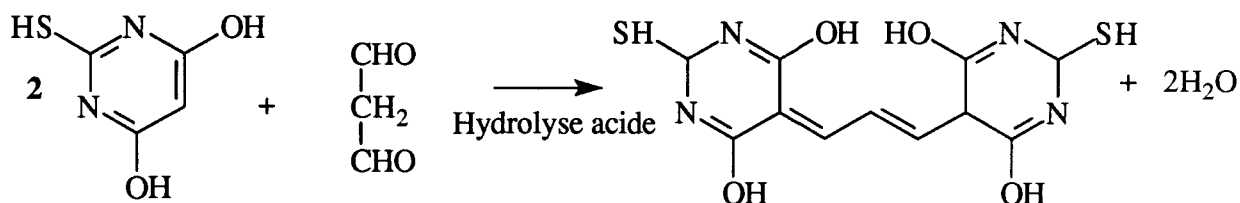


Figure 20 : Etapes de préparation des microsomes.

Le MDA, grâce à sa facilité de liaison avec les groupements SH et NH₂ libres, réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) selon la réaction suivante :



L'obtention de ce complexe passe par 3 phases :

a) Phase d'incubation entre les lipides membranaires des microsomes et l'antioxydant qui s'effectue à 37°C pendant 1 h dans des tubes hermétiquement bouchés contenant :

- 350 µl de tampon Tris-HCl (50. 10⁻³ M pH 7,4)
- 100 µl de suspension microsomale dans le tampon Tris-HCl (0,0625 mg de protéine ml⁻¹)
- 50 µl d'une solution aqueuse de FeSO₄ (10⁻³ M)
- 100 µl d'antioxydant (extraits de *Crataegus monogyna* et des molécules de référence, utilisées à des concentrations comprises entre 10⁻¹ à 10⁻⁴ g.l⁻¹)

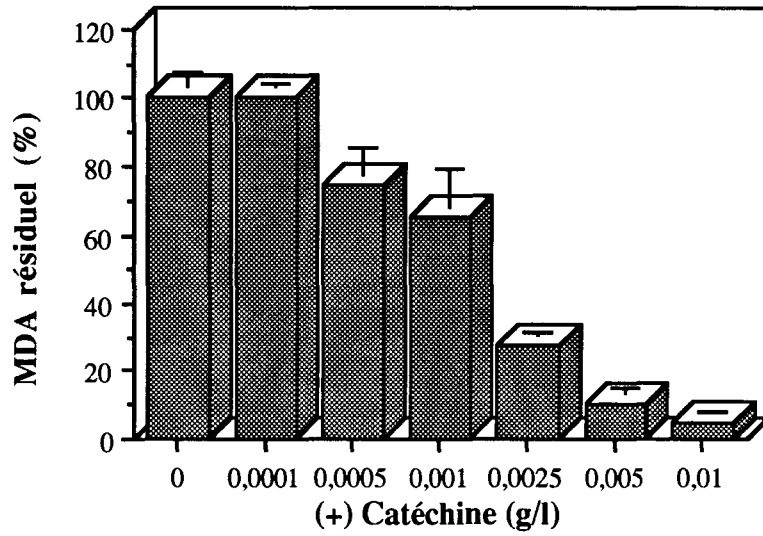
b) Phase de déprotéinisation

Après refroidissement du milieu d'incubation dans la glace (10 minutes), on ajoute dans chacun des tubes 50 µl d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 200 g.l⁻¹. On homogénéise et après centrifugation à 3000 tours minute⁻¹ pendant 10 minutes puis, après refroidissement dans la glace pendant 5 minutes, on prélève 300 µl de surnageant.

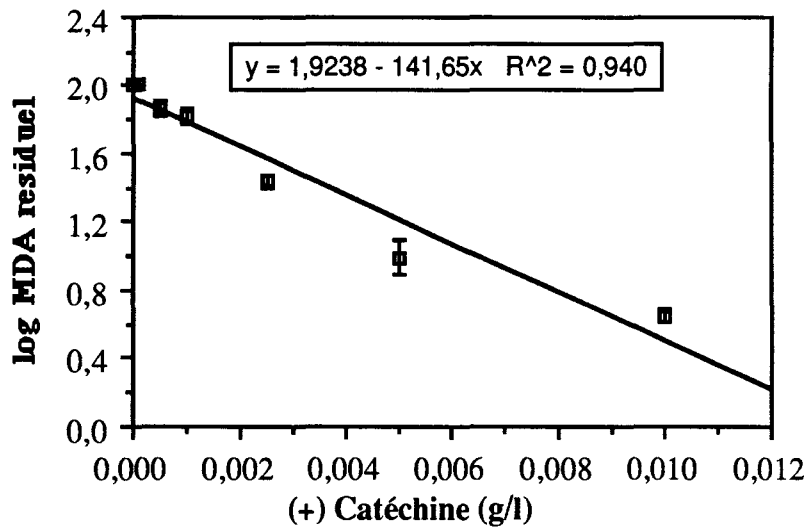
c) Une phase d'hydrolyse

Elle se fait à 100°C pendant 60 minutes dans des tubes scellés : aux 300 µl de surnageant on ajoute 50 µl d'une solution aqueuse de TBA (0,042 M) et 50 µl d'une solution d'acide orthophosphorique diluée au 1/5. Après refroidissement dans la glace pendant 10 minutes le complexe est analysé par CLHP en utilisant une colonne C18 Hypersil ODS 5 µm (12 cm x 0,4 cm de diamètre). L'élution est effectuée par une phase mobile (40% MeOH - 60% KH₂PO₄ 50.10⁻³M amenée à pH 6,8 par KOH 1 M) avec un débit de 0,7 ml minute⁻¹. La détection est réalisée à 532 nm.

Dans ces conditions un temps de rétention de 5,5 minutes a été enregistré pour le complexe MDA-TBA lors des premiers essais.



Graphique (a)



Graphique (b)

Figures 21 : Détermination d'une concentration inhibitrice à 50 % (CI50) d'un composé antioxydant (ici la catéchine), **a**-Malondialdéhyde (MDA) résiduel en fonction des concentrations en (+) catéchine, **b**- Droite de régression exprimant la relation entre le logarithme de malondialdéhyde (log MDA) résiduel et les concentrations en catéchine.

1.3 Expression des résultats

Les manipulations concernent des extraits de plante (extraits totaux, extraits issus des phases acétate d'éthyle et des phases aqueuses résiduelles) (**Figure 16**), ainsi que des composés particuliers abondants dans la plante et/ou cités dans la littérature, comme de bons antioxydants.

Les activités antioxydantes sont exprimées pour les extraits végétaux en pourcentage d'inhibition de formation du malondialdéhyde après la détermination des valeurs de la concentration inhibitrice : CI₅₀ (concentration en g.l⁻¹ nécessaire pour inhiber la formation de malondialdéhyde de 50%) calculé à partir des courbes d'inhibition (logarithme du pourcentage de malondialdéhyde résiduel par rapport aux concentrations testées). Toutes ces valeurs sont toujours rapportées à une unité de masse de matière sèche (voir méthode de calcul ci-dessous).

Les activités antioxydantes des substances isolées ((-) épicatechine, proanthocyanidine dimère B2, acide chlorogénique, hypéroside, vitexine-2"-O-rhamnoside et rutine) sont rapportées en fonction des CI₅₀ en g.l⁻¹ et en concentration molaire.

Pour une meilleure compréhension, le calcul de l'activité antilipoperoxydante est explicitée par 2 exemples ; nous avons pris le cas d'une substance pure : (a) la (+) catéchine où l'activité est exprimée en terme de CI₅₀ rapportée à la masse molaire et : (b) le cas d'un extrait total de plante ; ici stade F1 où l'activité est exprimée en terme de CI₅₀, puis en pourcentage puisque l'on a affaire à un mélange de nombreux phénols et non plus à une molécule unique.

a) (+) *Catéchine* (**Figure 21a,b**)

A partir des valeurs de malondialdéhyde résiduel (MDA résiduel) obtenues en fonction des concentrations en catéchine (**Figure 21a**), nous avons établi une droite de régression linéaire qui exprime la relation entre le logarithme de malondialdéhyde résiduel (log MDA résiduel) et les concentrations en catéchine (**Figure 21b**).

L'équation de la droite est : $Y = 1,9238 - 141,65x$

où Y = log (MDA résiduel) et x = concentration en catéchine

La CI₅₀ est par définition la concentration qui inhibe la formation de malondialdéhyde de 50%

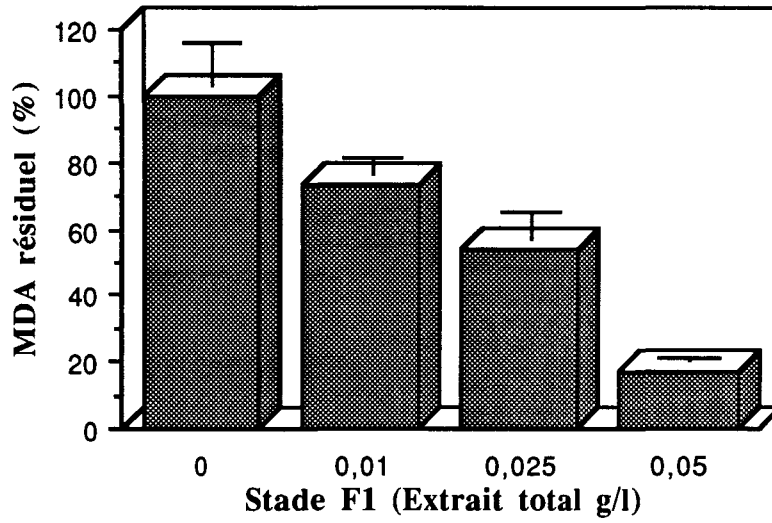
Pour calculer cette CI₅₀ :

On pose $\log 50 = -141,65x + 1,9238$

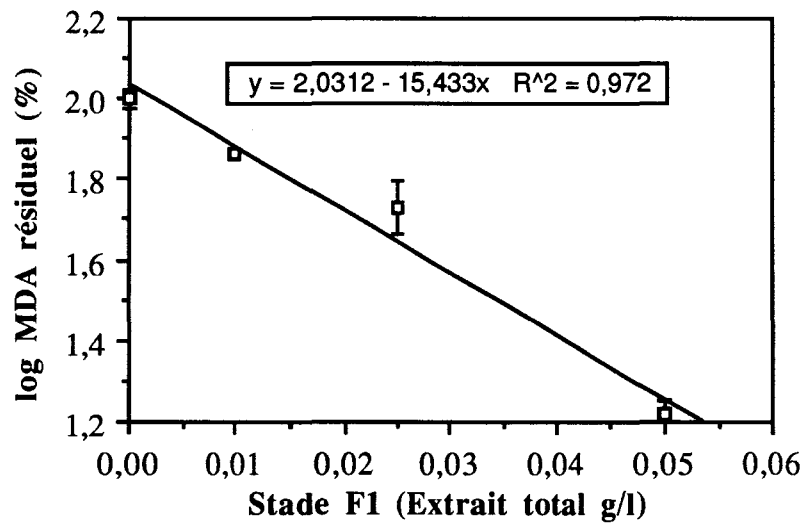
donc $1,669 = -141,65x + 1,9238$

d'où $x = \text{CI}_{50} = \frac{1,669 - 1,9238}{-141,65}$
 $= 1,6 \times 10^{-3} \text{ g.l}^{-1}$

En concentration molaire $= \text{CI}_{50} \text{ en g.l}^{-1} / \text{masse molaire de la catéchine}$
 $= \frac{1,6 \times 10^{-3}}{290} = 5,51 \times 10^{-6} \text{ M}$



Graphique (a)



Graphique (b)

Figure 22 : Détermination d'une concentration inhibitrice à 50 % (CI₅₀) d'un extrait total de plante (exemple : F1), a- Malondialdéhyde (MDA) résiduel en fonction des concentrations en extrait total de la feuille 1 (F1), b- Droite de régression exprimant la relation entre le logarithme de malondialdéhyde (log MDA) résiduel et les concentrations en extrait total de plante (F1)

b) Extrait total de plante (F1) (Figure 22a,b)

Pour les extraits végétaux les CI₅₀ ont été converties en pourcentage d'activité de la manière suivante :

Un cheminement identique à celui de la catéchine est suivi pour calculer la CI₅₀ d'un extrait de plante (**figure 22a,b**).

La CI₅₀ calculée pour F1 est de $21,5 \times 10^{-3}$ g de lyophilisat par litre d'incubation.

Par souci de standardisation nous avons choisi d'exprimer l'activité antilipoperoxydante en fonction de la masse sèche constante de tissu végétal.

Nous avons déterminé le poids de la matière sèche correspondant à cette valeur de CI₅₀,

Le rapport masse fraîche/ masse de lyophilisat = 12,9

Le rapport masse fraîche/masse sèche = 3,55

Le rapport masse sèche/ masse de lyophilisat = 3,63

donc $21,5 \times 10^{-3}$ g de lyophilisat correspond à $3,63 \times 21,5 \times 10^{-3}$ g de masse sèche
 $= 78,04 \times 10^{-3}$ g de masse sèche

Dans tous les cas, qui seront détaillés dans les essais, nous avons calculé la masse de lyophilisat correspondant à 0,1 g de masse sèche.

Donc : $78,04 \times 10^{-3}$ g de masse sèche équivaut à $21,5 \times 10^{-3}$ g de lyophilisat
d'où 10^{-1} g de masse sèche va correspondre à $27,54 \times 10^{-3}$ g de lyophilisat

En rapportant cette valeur dans la droite de régression expérimentale (**Figure 22b**)

$$Y = 2,0312 - 15,433x$$

On obtient : $\log \text{MDA} = 2,0312 - 15,433 (27,54 \times 10^{-3})$

$$\text{Log (MDA résiduel)} = 1,6$$

d'où le pourcentage de MDA résiduel = 40,38%

donc l'activité antilipoperoxydante = $100\% - 40,38\% = 59,62\%$

□ 2. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

La méthode utilisée est adaptée de celle de Pick *et al.*, (1980). Des cuves contenant 100 µl de H₂O₂ (120 mM), 100 µl de l'extrait d'Aubépine en concentrations croissantes dans un volume final de 1 ml par du tampon phosphate (PBS) (pH 7,4) sont incubées à 37 °C. Dans les tubes de référence, l'H₂O₂ est remplacé par 100 µl de tampon. Après 15 minutes on ajoute 1 ml de rouge de phénol (0,2 mg/ml) contenant 17 U/ml de peroxydase de Raifort (HRP, type II, Sigma) ce qui permet l'oxydation spécifique du rouge de phénol par le peroxyde d'hydrogène. Après l'addition de 50 µl de NaOH (1N) et incubation pendant 15 minutes à 37°C. L'absorbance des tubes de dosage est lue contre celle des tubes de référence à une longueur d'onde de 610 nm. La quantité de peroxyde d'hydrogène est déduite d'une courbe d'étalonnage

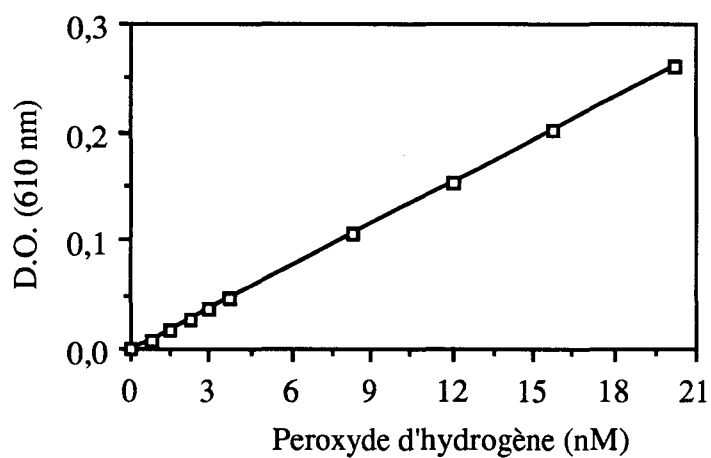


Figure 23 : Courbe étalon d'une solution commerciale de peroxyde d'hydrogène à 30% établie après réaction avec le rouge de phénol en présence de peroxydase.

Absorption = f(H₂O₂) obtenue à partir de concentrations connues d'une solution commerciale de peroxyde d'hydrogène (**Figure 23**) dont l'équation de la droite est :

$$Y = 1,524 \times 10^{-3} + 1,286 \times 10^{-2}X$$

$$(H_2O_2) = \frac{D.O + 1,524.10^{-3}}{1,29.10^{-2}}$$

Le pourcentage d'inhibition de la formation de H₂O₂ par les extraits d'Aubépine est calculé d'après la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{H_2O_2 \text{ produit en présence d'antioxydant}}{H_2O_2 \text{ produit en absence d'antioxydant}} - 1 \right] \times 100$$

La concentration inhibitrice à 50 % (CI₅₀) est alors déduite à partir d'un programme informatique établie par Boniface *et al.*, (1972).

□ 3. Piégeage de l'anion superoxyde (O₂^{o-})

Les ions superoxyde sont produits par le système hypoxanthine-xanthine oxydase et la quantité de O₂^{o-} est mesurée selon la méthode d'Aruoma *et al.*, (1989), par réduction du ferricytochrome C.

Les mélanges réactionnels contiennent 50 µl d' EDTA (30mM) et 5 µl d' hypoxanthine (30 mM) dans KOH (50 mM) à pH 7,4, 50 µl de ferricytochrome C (0,5 mM) et 100 µl de concentrations croissantes d'extraits d'Aubépine dans un volume final de 1,5 ml tamponné par KH₂PO₄-KOH (50 mM) pH 7,4. La réaction est initialisée après addition de 100 µl de xanthine oxydase (1 U/ml) uniquement dans les tubes de dosage (remplacés par 100 µl de tampon dans les tubes de référence). L'absorbance des tubes de dosage est mesurée contre celle des tubes de référence à 550 nm. La quantité d'anions superoxyde générés est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire du ferricytochrome C : ε₅₅₀ (ferrocytochrome C) = 21,1mM⁻¹cm⁻¹ d'après la formule suivante :

$$(\text{Anions superoxyde})_{\text{nmole/ml}} = \frac{\text{Densité optique}}{\epsilon} \times 1000$$

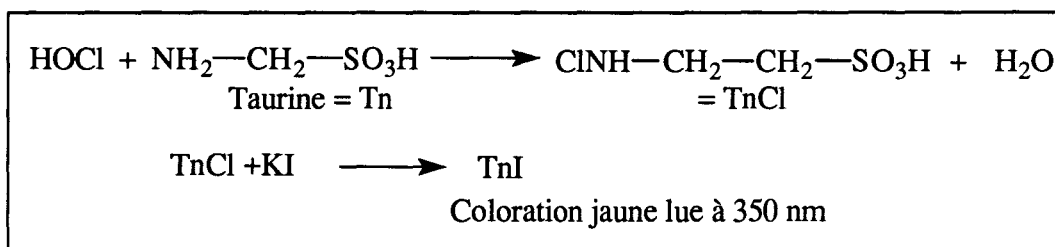
Les résultats sont exprimés en nmoles d'O₂^{o-}/ml en fonction des concentrations d'extraits d'Aubépine. Le pourcentage d'inhibition de la libération d'anions superoxyde est calculé d'après la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left[\frac{[\text{O}_2^{\circ-}] \text{ produit en présence d'antioxydant}}{[\text{O}_2^{\circ-}] \text{ produit en absence d'antioxydant}} - 1 \right] \times 100$$

et la concentration inhibitrice à 50 % (CI₅₀) est alors déduite comme décrit précédemment.

□ 4. Piégeage de l'acide hypochloreux (HOCl)

L'acide hypochloreux (HOCl) est généré par la réaction de chlorination de la taurine adaptée de la méthode de Weiss *et al.*, (1982). L'ajout de iodure de potassium juste avant le dosage révélera une coloration jaune détectée au spectrophotomètre à 350 nm.



Les mélanges réactionnels contiennent 100 µl de taurine (150mM), 100 µl d'extraits d'Aubépine en concentrations croissantes et 100 µl de NaOCl (600 µM) dans un volume final de 1 ml complété par du PBS à pH 7,4. Juste avant le dosage 10 µl d'iodure de potassium (2M) sont ajoutés. L'absorbance des tubes de dosage est lue contre celle de référence à 350 nm puis la quantité d'acide hypochloreux généré est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire du chromogène : $\epsilon_{350} = 22,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ d'après la formule suivante :

$$(\text{HOCl})_{\text{nmole/ml}} = \frac{\text{Densité optique}}{\epsilon} \times 1000$$

Les résultats sont exprimés en % d'inhibition de l'acide hypochloreux en fonction de la concentration des extraits d'Aubépine. La concentration inhibitrice à 50 % (CI₅₀) est alors déterminée comme précédemment.

CHAPITRE III

RESULTATS

Notre activité s'inscrit dans le cadre de la recherche de métabolites secondaires dotés de propriétés biologiques et pharmacologiques et nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux composés polyphénoliques de l'Aubépine.

L'analyse des polyphénols *in vivo* constitue le premier volet de ce travail. Nous avons constaté dans la littérature que les travaux concernant les compositions et les variations en composés phénoliques dans la plante ne couvraient pas toutes les périodes d'un cycle végétatif. Nous avons donc effectué **une étude *in vivo*** plus systématique de l'évolution des différentes catégories de composés phénoliques en fonction des stades de développement des organes végétatifs et reproducteurs durant une saison complète de végétation. Le but principal était de mettre en relation les activités antioxydantes et les teneurs en constituants phénoliques.

Dans un deuxième volet, nous avons mis en place des **colonies tissulaires** et étudié les composés synthétisés *in vitro* tout en cherchant à favoriser leur production par des modifications des conditions de culture. Nous avons aussi essayé **d'optimiser** la synthèse de dérivés actifs, soit par **apport** dans le milieu de culture de précurseurs métaboliques comme l'acide shikimique, soit par celui d'autres composés comme l'acide gallique qui dans le cas des colonies tissulaires de Sarrasin avait permis l'obtention de dérivés galloylés connus comme antioxydants actifs (Moumou *et al.*, 1992a). Nous avons enfin mis en place et analysé la production des **suspensions cellulaires**.

Dans un troisième volet, seront présentés les résultats de mesures d'activités antioxydantes effectuées dans le but de tenter d'établir des relations soit avec les teneurs en différentes catégories de phénols soit avec des molécules isolées. Cette partie concernera donc :

- Les organes de la plante fraîche *in vivo* où l'on a mis en relation les teneurs en phénols et les stades particuliers de développement avec les activités antioxydantes.
- Des préparations pharmaceutiques ont été étudiées avec les mêmes objectifs. Celles-ci sont venues se greffer à notre étude à partir du moment où des activités antioxydantes importantes ont pu être notées pour certains organes de la plante fraîche, ces préparations étant obtenues à partir de ces mêmes organes, frais ou secs.
- Les cultures cellulaires ont également été analysées pour leur composition polyphénolique. Celle-ci a ensuite été mise en relation avec les activités antioxydantes mesurées.

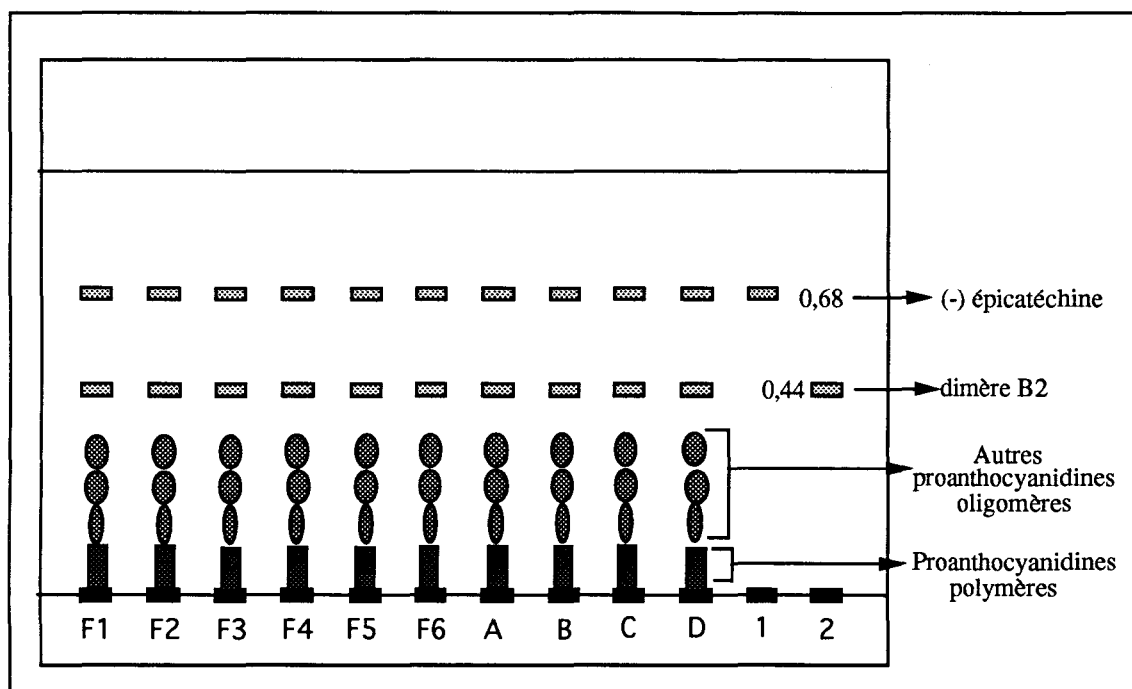


Figure 24 : Mise en évidence des catéchines et des proanthocyanidines par chromatographie sur couche mince de silice des **extraits totaux** de feuilles (F1 -F6) et d'organes reproducteurs : fleurs fermées (A), fleurs épanouies (B), fruits verts (C) et fruits rouges (D).

- Système solvant : toluène/acétone/acide formique, 3 : 3 : 1 (v/v/v)
- Révélation : anisaldéhyde sulfurique
- Témoins : 1) (-) épicatechine (Rf = 0,68)
- 2) dimère B2 (Rf = 0,44)

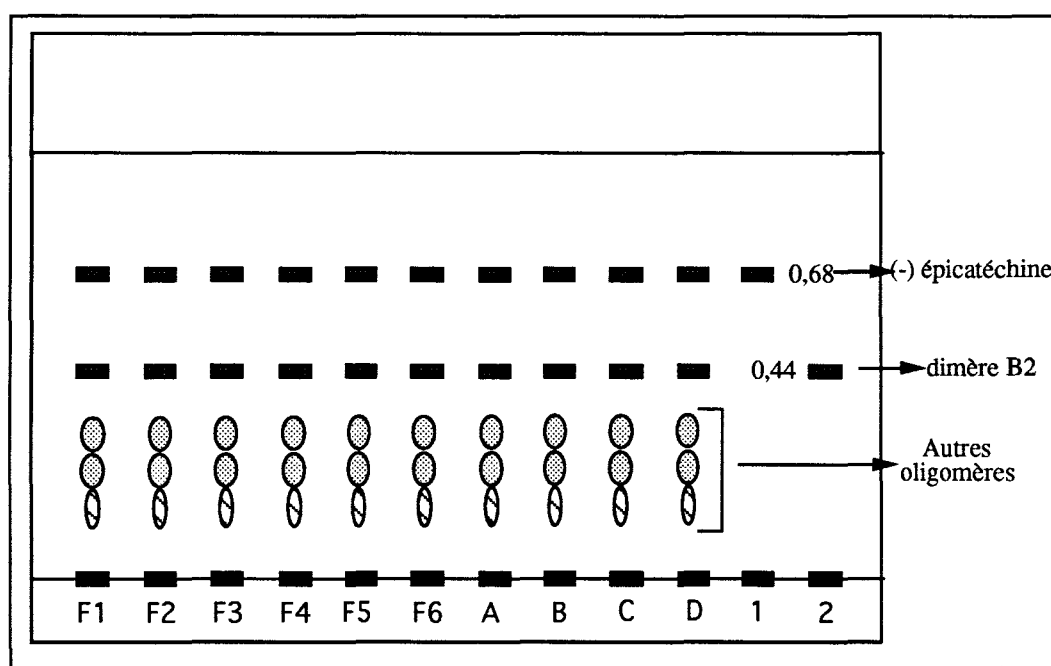


Figure 25 : Mise en évidence des catéchines et des proanthocyanidines par chromatographie sur couche mince de silice des phases **acétate d'éthyle** de feuilles (F1 -F6) et d'organes reproducteurs : fleurs fermées (A), fleurs épanouies (B), fruits verts (C) et fruits rouges (D).

- Système solvant : toluène/acétone/acide formique, 3 : 3 : 1 (v/v/v)
- Révélation : anisaldéhyde sulfurique
- Témoins : 1) (-) épicatechine (Rf = 0,68)
- 2) dimère B2 (Rf = 0,44)

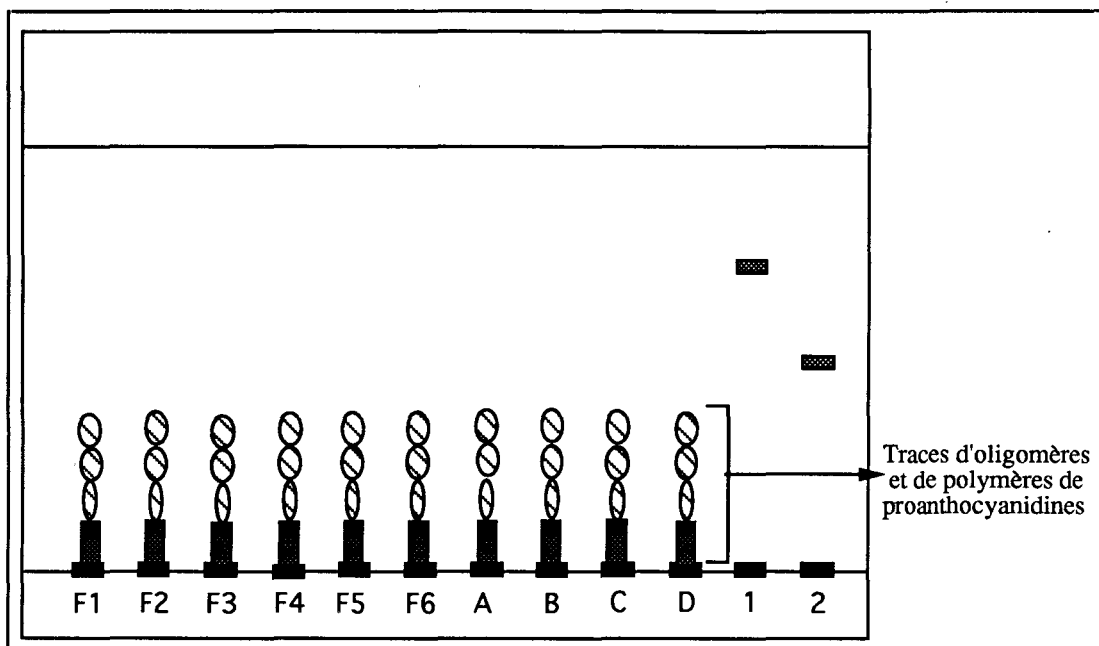


Figure 26 : Mise en évidence des catéchines et des proanthocyanidines par chromatographie sur couche mince de silice des **phases aqueuses résiduelles** de feuilles (F1 -F6) et d'organes reproducteurs : fleurs fermées (A), fleurs épanouies (B), fruits verts (C) et fruits rouges (D).

- Système solvant : toluène/acétone/acide formique, 3 : 3 : 1 (v/v/v)
- Révélation : anisaldéhyde sulfurique
- Témoins : 1) (-) épicatechine (Rf = 0,68)
- 2) dimère B2 (Rf = 0,44)

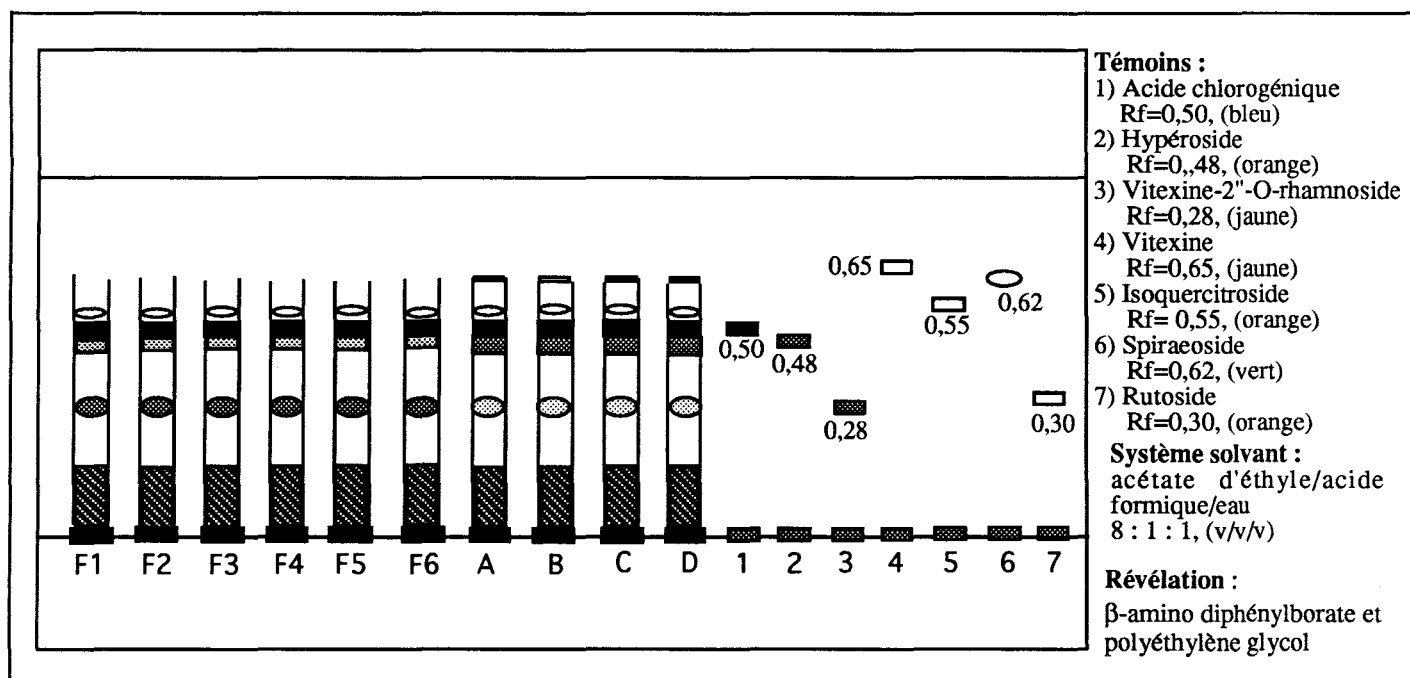


Figure 27 : Mise en évidence des flavonoïdes et de l'acide chlorogénique par chromatographie sur couche mince des **extraits totaux** de feuilles (F1-F6) et d'organes reproducteurs : bouton floral (A), fleur épanouie (B), fruit vert (C) et fruit rouge (D)

A. LES POLYPHENOLS IN VIVO

Les résultats que nous développons ici concernent la composition polyphénolique des organes foliaires et reproducteurs de l'Aubépine à différents stades de leur développement durant un cycle végétatif. Soulignons que la chimie de l'Aubépine a déjà été étudiée, mais surtout pour les organes secs utilisés en Pharmacie, et pour certains stades de développement seulement. Selon la littérature, l'Aubépine contient principalement 4 catégories de polyphénols : les flavonoïdes, les acides phénols, les proanthocyanidines et les catéchines qui sont capables de présenter des activités thérapeutiques et/ou antioxydantes.

Notre étude se distingue par les points suivants :

→ Nous avons effectué une **analyse systématique** de tous les **stades** marquants du développement des organes foliaires et reproducteurs au cours d'une saison.

→ Nous avons analysé les quatre catégories de polyphénols indiqués ci-dessus en insistant sur les proanthocyanidines. Parmi celles-ci et parallèlement aux substances isolées, des fractions ont été définies par leur mode d'extraction (extraits totaux, extraits acétate d'éthyle ou extraits aqueux). Ceci nous conduira dans l'expression des résultats à indiquer dans les fractions extraites des proportions respectives entre telle ou telle catégorie (flavonoïdes, acides phénols, catéchines, proanthocyanidines) ou même entre des sous-catégories comme les proanthocyanidines oligomères, polymères ou leur globalité.

I. ANALYSE QUALITATIVE

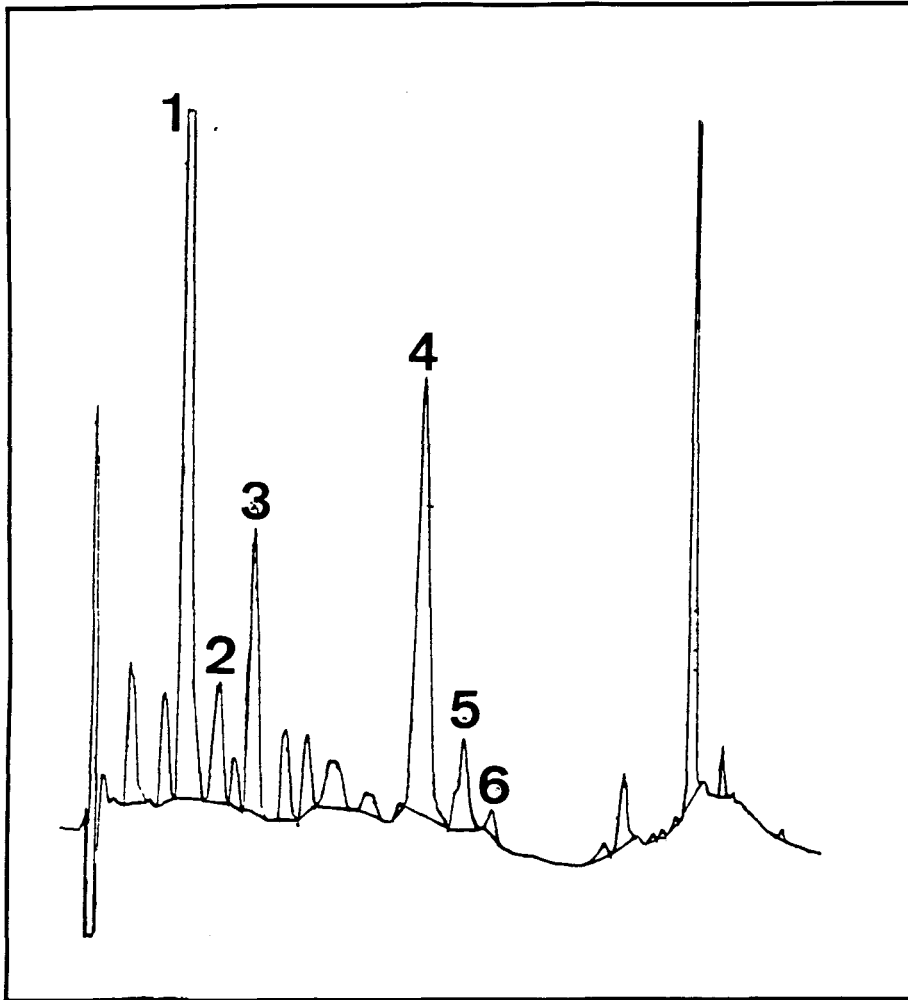
1. Chromatographie sur couche mince

1.1 Proanthocyanidines et catéchines

Elles ont été mises en évidence par chromatographie sur couche mince dans tous les organes foliaires et reproducteurs à l'aide du système toluène/acétone/acide formique 3 : 3 : 1 . Ce système, très reproductible, possède l'avantage d'étager ces composés selon leurs masses moléculaires. Nous avons analysé : **la phase totale** ainsi que, après fractionnement (**Figure 16**), **la phase acétate d'éthyle** et **la phase aqueuse résiduelle**, ceci pour tous les organes végétatifs foliaires (F1 à F6) et les organes reproducteurs (A à D) (**Tableau 10**).

Par comparaison avec les R_f des témoins ((-) épicatechine et dimère B2) nous avons noté la présence dans **la phase totale** de catéchines ($R_f=0,68$), et une zone importante correspondant aux dimères ($R_f=0,44$). Viennent ensuite des proanthocyanidines de poids moléculaires plus élevés tels que des trimères ($R_f=0,28$), tétramères ($R_f= 0,20$) et d'autres oligomères. Les polymères ne migrent pratiquement pas dans ce système (**Figure 24**).

Les **phases acétate d'éthyle** contiennent principalement des oligomères de proanthocyanidines et des catéchines (**Figure 25**), les polymères restant majoritairement dans



POLYPHENOLS	PICS
Acide chlorogénique	1
Proanthocyanidine dimère B2	2
(-) Epicatéchine	3
Vitexine-2''-O-rhamnoside	4
Hypéroside	5
Isoquercitroside	6

Polyphénols (280 nm)	Parties de plante			Temps de rétention (minutes)
	Feuille	Fleur	Fruit	
Acide chlorogénique	+++	+++	++	11,2
Proanthocyanidine dimère B2	++	++	++	14,4
(-) épicatéchine	+++	+++	+++	17,6
Polyphénols (360 nm)				
Vitexine-2''-O-rhamnoside	+++	+	±	33,26
Hypéroside	+	+++	±	36,74
Isoquercitroside	±	±	±	39,45

Figure 28 : Profil CLHP, temps de rétention des principaux polyphénols identifiés et distribution relative dans les feuilles (F4), fleurs et fruits verts (+++ = dérivé majeur dominant, ++ = présence nette, ± = traces)

la phase aqueuse résiduelle (**Figure 26**) confirmant ainsi nos observations réalisées au cours de l'étude des proanthocyanidines du Sarrasin (Bahorun, 1990).

1.2 Flavonoïdes et acides phénols

Les analyses réalisées sur des extraits méthanoliques totaux (**Figure 27**) montrent la présence dans les **feuilles** de la vitexine-2''-O-rhamnoside (Rf=0,28), de l'hypéroside (Rf=0,48), de l'isoquercitroside (Rf=0,55) et d'une tache correspondant vraisemblablement à la vitexine-2''-O-rhamnoside-4'''-acétylé (Rf=0,64).

Ce système nous a aussi permis de mettre en évidence dans l'Aubépine un acide phénol dominant : l'acide chlorogénique (Rf=0,50).

Les fleurs et les fruits contiennent principalement de l'hypéroside, de la vitexine-2''-O-rhamnoside, de l'isoquercitroside et de l'acide chlorogénique. Des traces de spiraeoside (Rf=0,62) ont été décelées dans les boutons floraux et les fleurs épanouies.

2. Chromatographie liquide haute pression

L'analyse en CLHP des extraits de feuilles, de fleurs et de fruits par comparaison avec des témoins internes et externes nous a permis de confirmer avec plus de précision la présence des composés identifiés par chromatographie sur couche mince. La **figure 28** donne les temps de rétention des composés identifiés et les profils d'élution des divers composés polyphénoliques.

II. ANALYSE QUANTITATIVE

1. Phénols totaux

Nous avons calculé les teneurs en phénols totaux des différentes feuilles (**Figure 29**) ainsi que dans les fleurs et les fruits (**Figure 30**).

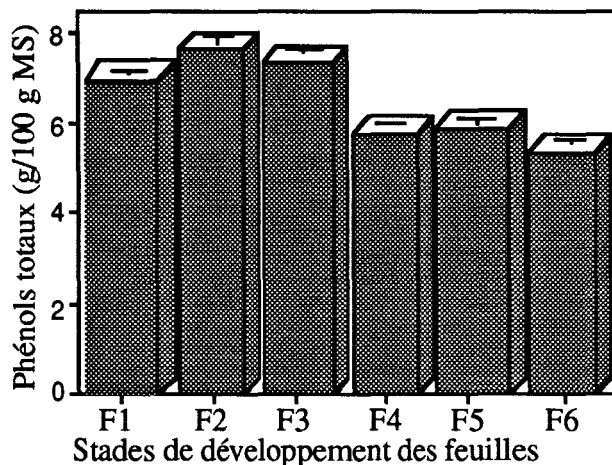


Figure 29 : Teneurs en phénols totaux dans les feuilles (F1-F6) selon leur stade de développement

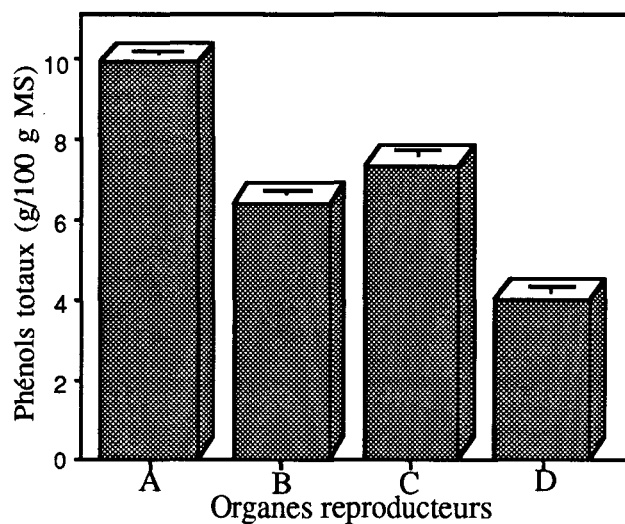


Figure 30 : Teneurs en phénols totaux dans les organes reproducteurs : (A) bouton floral, (B) fleur épanouie, (C) fruit vert, (D) fruit rouge

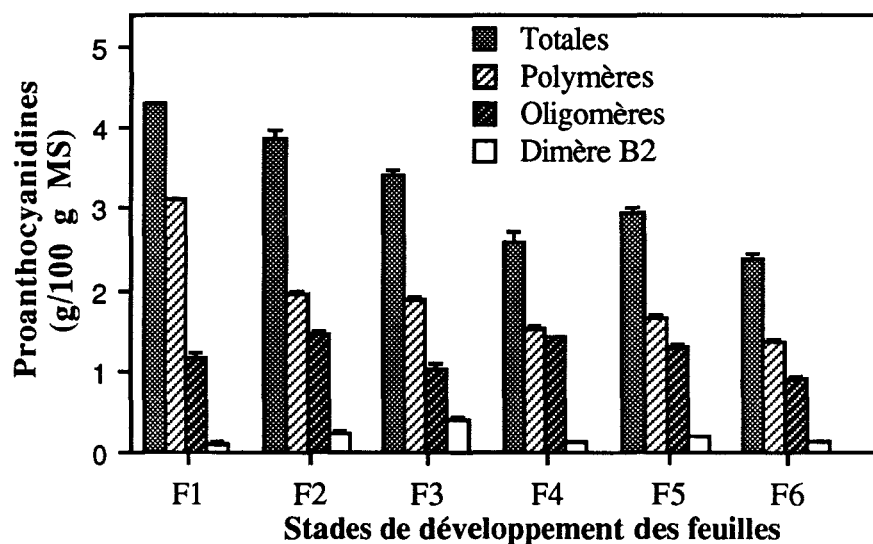


Figure 31 : Teneurs en proanthocyanidines totales, oligomères, polymères et du dimère B2 dans les différents stades végétatifs des feuilles (F1-F6)

La teneur en phénols totaux des feuilles augmente du stade F1 (bourgeons de feuilles) (6,975 g/100 g MS) jusqu'au stade F2 (**jeunes feuilles**) (7,655 g/100 g MS) qui est le stade le plus riche (**Figure 29**).

La teneur en composés phénoliques diminue ensuite progressivement pour atteindre au stade F6 (**feuilles développées**) 5,374 g/100 g MS.

Parmi les organes reproducteurs (**Figure 30**) c'est le bouton floral (A) qui renferme le plus de phénols (9,966 g/100 g MS) suivi du fruit vert (C) (7,346 g/100 g MS), puis de la fleur épanouie (B) (6,419 g/100 g MS) et du fruit rouge (D) (4 g/100 g MS). Rappelons, qu'en Pharmacie, les boutons floraux (A), fleurs épanouies (B) et leur mélange avec les feuilles des mêmes stades (F3, F4) constituent les parties employées comme matière première.

2. Proanthocyanidines

2.1 Feuilles

La **figure 31** montre la distribution des **proanthocyanidines** dans les feuilles selon leur stade de développement. Les analyses ont été effectuées dans les extraits foliaires totaux (proanthocyanidines totales), ou séparés (**Figure 16**) en fraction acétate d'éthyle (proanthocyanidines oligomères) et en fraction aqueuse (proanthocyanidines polymères).

Le stade F1 (**jeunes bourgeons**) est le plus riche en **proanthocyanidines totales** (4,307 g/100 g MS) et nous observons une diminution de ces composés avec le développement des feuilles. Ainsi pour le stade F6 (**feuilles développées**) la valeur moyenne calculée est de l'ordre de 2,393 g/100 g MS.

Les teneurs en **oligomères** restent assez stables pour l'ensemble des organes foliaires. C'est le stade F2 (jeunes feuilles) qui est le plus riche (1,454 g/100 g MS). Cette valeur représente 37% des proanthocyanidines totales. Les feuilles développées, correspondant au stade F6, ne contiennent que 0,890 g/100 g MS (37 % des proanthocyanidines totales).

Les **polymères** représentent une proportion importante (72%) des proanthocyanidines au stade F1 (3,110 g/100 gMS). Leurs teneurs diminuent progressivement pour les autres stades de développement analysés et au stade F6 la teneur moyenne des feuilles adultes est de 1,3 g/100 g MS (54% des proanthocyanidines totales). De manière générale, quelque soit le stade de développement foliaire étudié la quantité de polymères est supérieure à celle des oligomères.

La **proanthocyanidine B2** est le principal dimère présent dans les feuilles de l'Aubépine. Faiblement représentée dans les très jeunes feuilles et au niveau du bourgeon (F1 : 0,102 g/100 g MS), sa teneur augmente ensuite jusqu'au stade F3 qui est le plus riche (0,49 g/100 g MS), pour diminuer avec l'âge.

Dans le cas des feuilles, il est intéressant de noter que l'évolution des teneurs en proanthocyanidines totales (**Figure 31**) ne sont pas parallèles à celles des phénols totaux

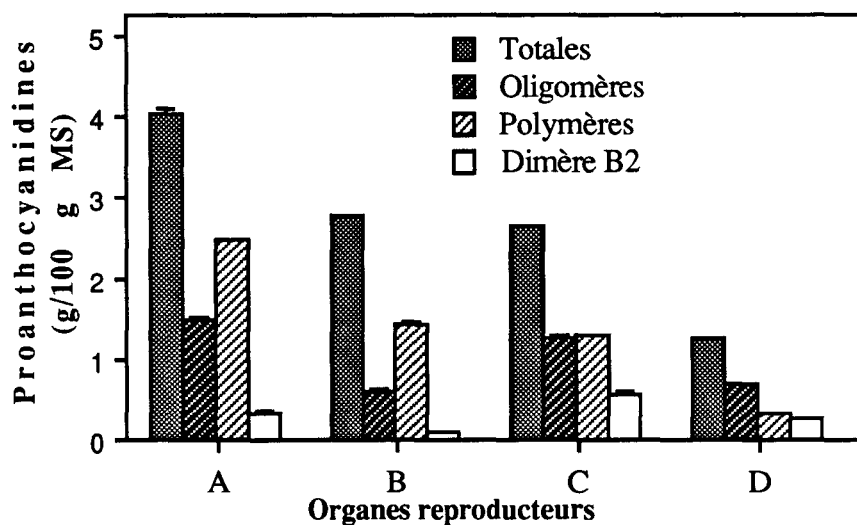


Figure 32 : Teneurs en proanthocyanidines totales, oligomères et polymères ainsi que du dimère B2 dans les organes reproducteurs : (A) bouton floral, (B) fleur épanouie, (C) fruit vert, (D) fruit rouge

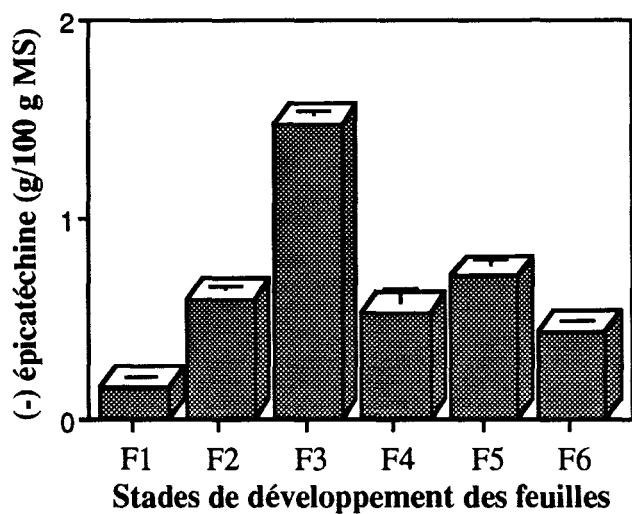


Figure 33 : Teneurs en (-) épicatechine dans les feuilles à différents stades de développement (F1-F6)

(Figure 29) tandis que celles des oligomères et du dimère B2 présentent une certaine analogie avec l'évolution des phénols. Les variations relatives en polymères pourraient expliquer cette différence.

2.2 Fleurs et fruits

Les organes reproducteurs les plus riches en **proanthocyanidines totales** (Figure 32) sont les boutons floraux (A) (4,033 g /100 g MS). Les fleurs épanouies (B) et les fruits verts (C) ont des teneurs comparables entre elles (2,784 et 2,659 g/100 g MS) tandis que les fruits rouges (D) en contiennent peu (1,249 g/100 g MS).

Ce sont les boutons floraux et les fruits verts qui contiennent le plus d'**oligomères** (1,489 et 1,247 g/100 g MS) ce qui représente respectivement 37 et 46% des proanthocyanidines totales. Les fleurs épanouies et les fruits rouges ont des teneurs plus faibles (0,605 et 0,680 g/100 g MS).

Par rapport aux proanthocyanidines totales les **polymères** représentent 61% (2,478 g/100 g MS) pour les boutons floraux, 51% (1,427 g/100 g MS) pour les fleurs épanouies, 49% (1,294 g/100 g MS) pour les fruits verts et 27% (0,340 g/100g MS) pour les fruits rouges.

Les teneurs en proanthocyanidines **polymères** dans les fleurs sont supérieures aux **oligomères** ce qui ne semble pas être le cas pour les fruits.

Parmi les organes reproducteurs ce sont les fruits verts qui présentent la quantité la plus importante de **dimère B2** (0,568 g/100 gMS). Les teneurs observées dans le bouton floral, la fleur épanouie et le fruit rouge sont respectivement de 0,342, 0,098 et 0,255 g/100 g MS.

Ici, comme pour les feuilles, il y a une analogie d'évolution entre les teneurs en phénols totaux, en oligomères de proanthocyanidines et en dimère B2.

3. Catéchines

3.1 Feuilles

La (-) **épicatéchine** est la catéchine qui est produite majoritairement dans les différentes feuilles étudiées (Figure 33). La teneur augmente du stade F1(0,154 g/100 g MS) au stade F3 où la production est maximale (1,467 g/100 g MS) puis on observe une diminution jusqu'au stade F6 (0,463 g/100 g MS).

3.2 Fleurs et fruits

Dans les organes reproducteurs (Figure 34) la teneur la plus importante est observée dans les fruits verts (C) (3,281 g /100 g MS). Les boutons floraux (A) (1,398 g/100 g MS) et fruits rouges (D) (1,332 g/100 g MS) présentent des valeurs d'environ moitié moins importantes ; les fleurs épanouies (B) étant moins riches.

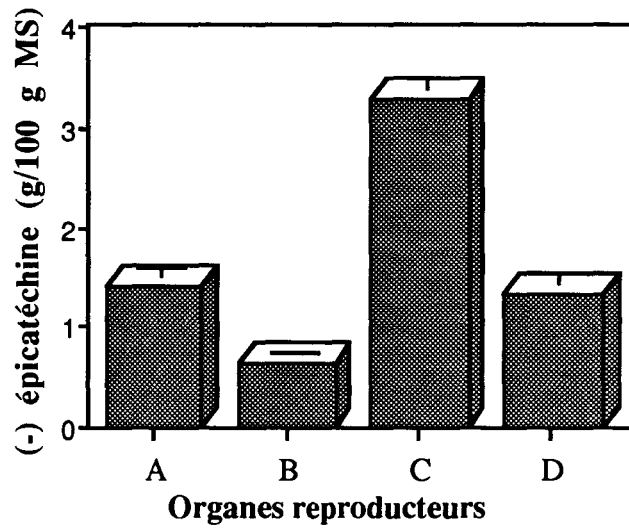


Figure 34 : Teneurs en (-) épicatechine dans les organes reproducteurs : (A) bouton floral, (B) fleur épanouie, (C) fruit vert, (D) fruit rouge.

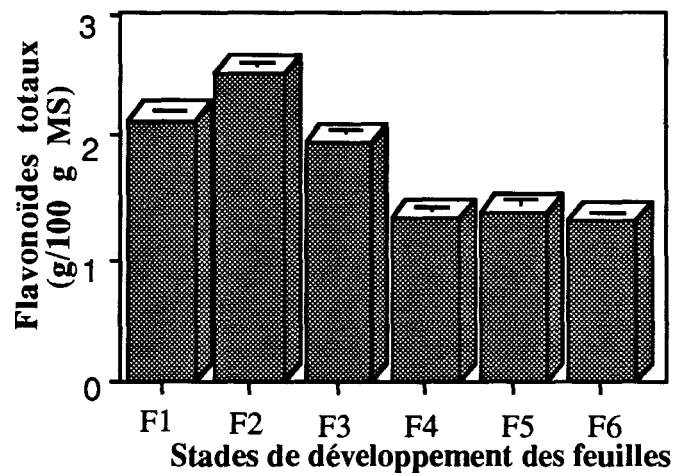


Figure 35 : Teneurs en flavonoïdes dans les feuilles à différents stades de développement (F1-F6).

Les évolutions des pourcentages en (-) épicatechine (**Figure 34**) et en dimère B2 (**Figure 31**) sont très semblables, ce qui n'a rien de surprenant si l'on considère que la proanthocyanidine dimère B2 est formée de deux unités de (-) épicatechine.

4. Flavonoïdes

4.1 Feuilles

Les **flavonoïdes totaux** (**Figure 35**), dosés par rapport à un étalon de vitexine, ont pratiquement le même profil de distribution que les phénols totaux dans les feuilles. Nous avons noté que le stade jeunes feuilles (F2) est le plus riche (2,523 g/100 g MS). La teneur baisse progressivement durant la saison jusqu'au stade F6 qui en contient le moins (1,303 g/100 g MS) (**Figure 35**).

Les principaux **flavonoïdes individuels** que nous avons identifiés par CLHP sont, la **vitexine-2''-O-rhamnoside**, l'**hypéroside** et l'**isoquercitroside**. Les résultats obtenus montrent que le flavonoïde majeur des feuilles est la vitexine-2''-O-rhamnoside avec des teneurs maximales de 1,358 et 1,213 g/100 g MS au stade F2 et F3 (**Figure 36**).

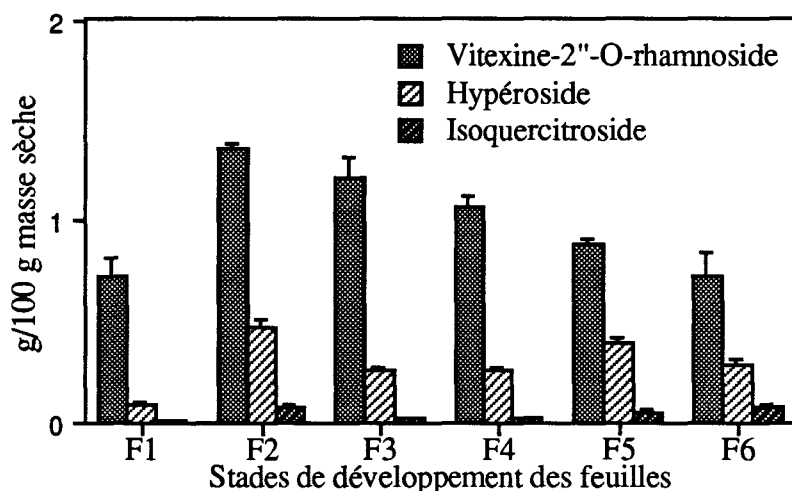


Figure 36 : Teneurs en vitexine-2''-O-rhamnoside, en hypéroside et en isoquercitroside dans les différents stades de développement des feuilles (F1-F6)

Les teneurs en hypéroside sont beaucoup moins importantes que celle de la vitexine-2''-O-rhamnoside dans les feuilles, la valeur maximale étant de 0,474 g/100 g MS pour le stade F2 et la minimale de 0,087 g/100 g MS pour le stade F6.

Les valeurs pour l'isoquercitroside sont plus faibles que celles des autres flavonoïdes ; le maximum est observé au stade F6 avec seulement 0,079 g/100 g MS.

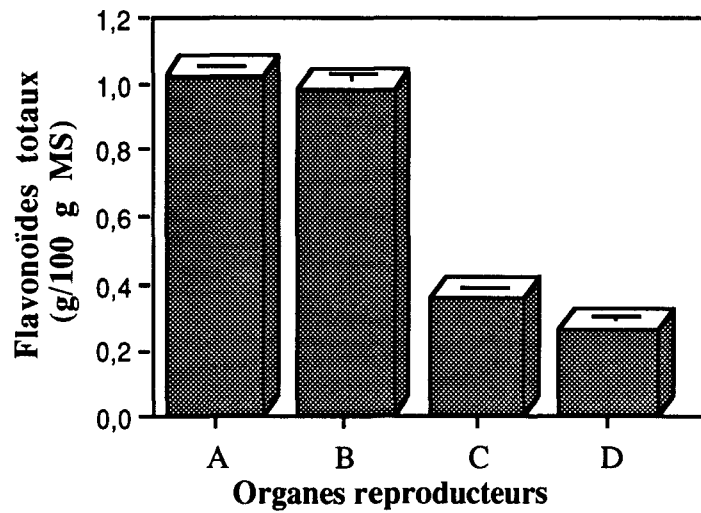


Figure 37 : Teneurs en flavonoïdes totaux dans les organes reproducteurs : (A) bouton floral, (B) fleur épanouie, (C) fruit vert, (D) fruit rouge

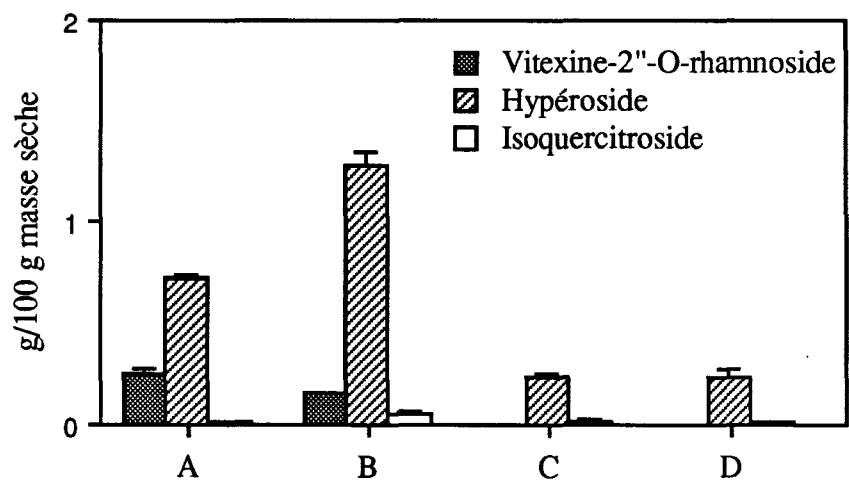


Figure 38 : Teneurs en vitexine-2''-O-rhamnoside, en hypéroside et en isoquercitroside dans les organes reproducteurs : (A) bouton floral, (B) fleur épanouie, (C) fruit vert, (D) fruit rouge

4.2 Fleurs et fruits

La teneur en flavonoïdes totaux évaluée dans les organes reproducteurs par rapport à une gamme étalon d'hypéroside, est nettement plus élevée dans les boutons floraux (A) (1,025 g/100 g MS) et les fleurs épanouies (B) (0,988 g/100 g MS). Les fruits sont des organes pauvres en flavonoïdes : 0,356 g/100 g MS pour les fruits verts (C) et 0,260 g/100 g MS pour les fruits rouges (D) (**Figure 37**). Dans le cas des organes reproducteurs, à la différence des feuilles, il n'y a pas d'analogie dans l'évolution des contenus en flavonoïdes totaux et en phénols totaux.

Parmi les flavonoïdes, c'est l'hypéroside qui domine dans les fleurs et les fruits (**Figure 38**). Les fleurs épanouies (B) et les boutons floraux (A) sont les plus riches (1,286 et 0,726 g/100 g MS respectivement). Les fruits verts et fruits rouges présentent des teneurs équivalentes entre elles (0,234 et 0,240 g/100 g MS) mais nettement plus faibles.

Nous avons également observé des teneurs très faibles en vitexine-2''-O-rhamnoside (maximum de 0,253 g/100 g MS pour les bouton floraux), en isoquercitroside (maximum 0,05 g/100 g MS pour les fleurs épanouies) et des traces de spiraeoside. Les fruits semblent être dépourvus de vitexine-2''-O-rhamnoside et contiennent très peu d'isoquercitroside.

5. Acide chlorogénique

5.1 Feuilles

L'**acide chlorogénique**, principal acide phénol présent dans les extraits, se trouve en quantité peu importante dans les jeunes bourgeons F1 (0,149 g/100 g MS). Au fur et à mesure que les feuilles se développent, la teneur augmente pour atteindre un maximum au stade F3 (1,320 g /100 g MS) (**Figure 39**). On assiste ensuite à une diminution pour les stades de développement ultérieurs et la valeur estimée pour le stade F6 est de l'ordre de 0,475 g/100 g MS. Il y a donc un parallélisme avec la (-) épicatechine des feuilles (**Figure 33**).

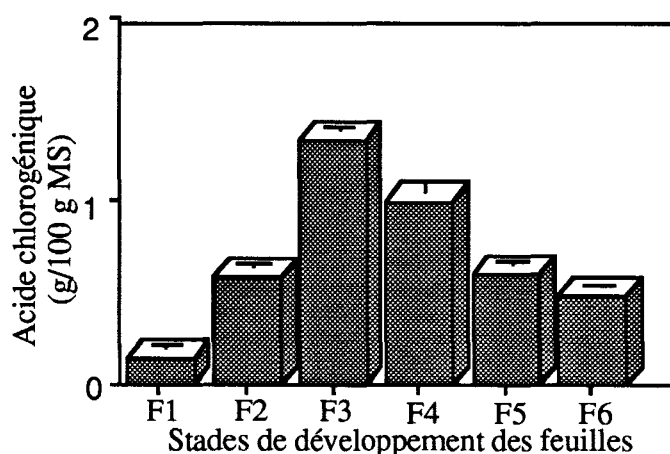


Figure 39 : Teneurs en acide chlorogénique dans les feuilles à différents stades de développement (F1-F6)

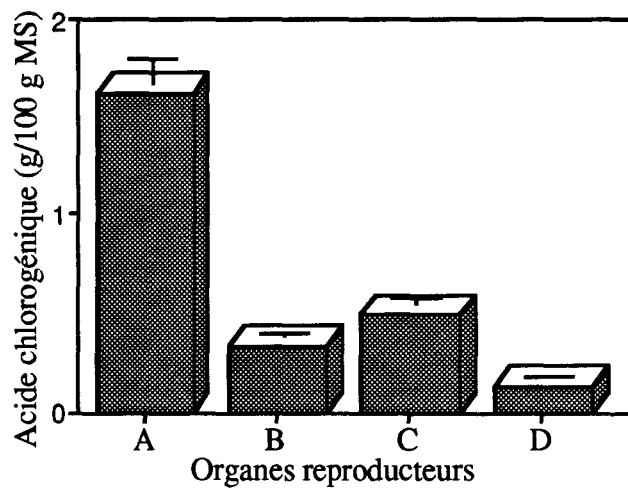


Figure 40 : Teneurs en acide chlorogénique dans les organes reproducteurs : (A) bouton floral, (B) fleur épanouie, (C) fruit vert, (D) fruit rouge

5.2 Fleurs et fruits

Pour les organes reproducteurs (**Figure 40**), ce sont les boutons floraux (A) (1,617 g/100 g MS) et les fruits verts (C) (0,490 g/100 g MS) qui renferment le plus d'acide chlorogénique. Les quantités sont moindres pour les fleurs épanouies (B) (0,326 g/100 g MS) et les fruits rouges (D) (0,136 g/100 g MS).

CONCLUSIONS

Cette étude du contenu en polyphénols de différents organes de l'Aubépine monogyne nous permet de faire ressortir quelques éléments intéressants.

- ➡ Les teneurs en **phénols totaux** de l'Aubépine *in vivo*, par comparaison à d'autres plantes pharmaceutiques riches en phénols (Bruneton *et al.*, 1993), sont élevées à tous les stades de développement foliaire ainsi que dans les organes reproducteurs étudiés.
- ➡ De même, nous avons noté des quantités importantes de **proanthocyanidines** dans tous les extraits avec, en particulier, une forte proportion d'**oligomères**.
- ➡ Les teneurs les plus élevées en **oligomères de proanthocyanidines**, (-) **épicatéchine** et **flavonoïdes** sont retrouvées dans les **jeunes feuilles** (F2 et F3), le **bouton floral** (A), la **fleur épanouie** (B) et le **fruit vert** (C). Ces dérivés sont les plus intéressants du point de vue pharmacologique.
- ➡ En général, les **proanthocyanidines** qui sont les polyphénols majoritaires, semblent influencer sur la mesure du taux de polyphénols totaux, ce qui semble logique par leur nombre d'hydroxyles phénoliques.
- ➡ La composition en **flavonoïdes** montre une prédominance de la **vitexine-2''-O-rhamnoside** dans les **feuilles** et de l'**hypéroside** dans les **organes reproducteurs**. Ceci est conforme aux résultats cités dans la littérature.
- ➡ La (-) **épicatéchine** est le **flavanol** dominant tandis que parmi les **acides phénols**, l'**acide chlorogénique** semble être majoritaire.

Ce sont donc les **jeunes feuilles** (F2) et les **boutons floraux** (A) qui seront utilisés par la suite pour la mise en place des culture cellulaires en raison de leur richesse en **phénols totaux**, en **flavonoïdes**, en **acides phénols** et en dérivés de flavanols : **catéchines** et **proanthocyanidines**.

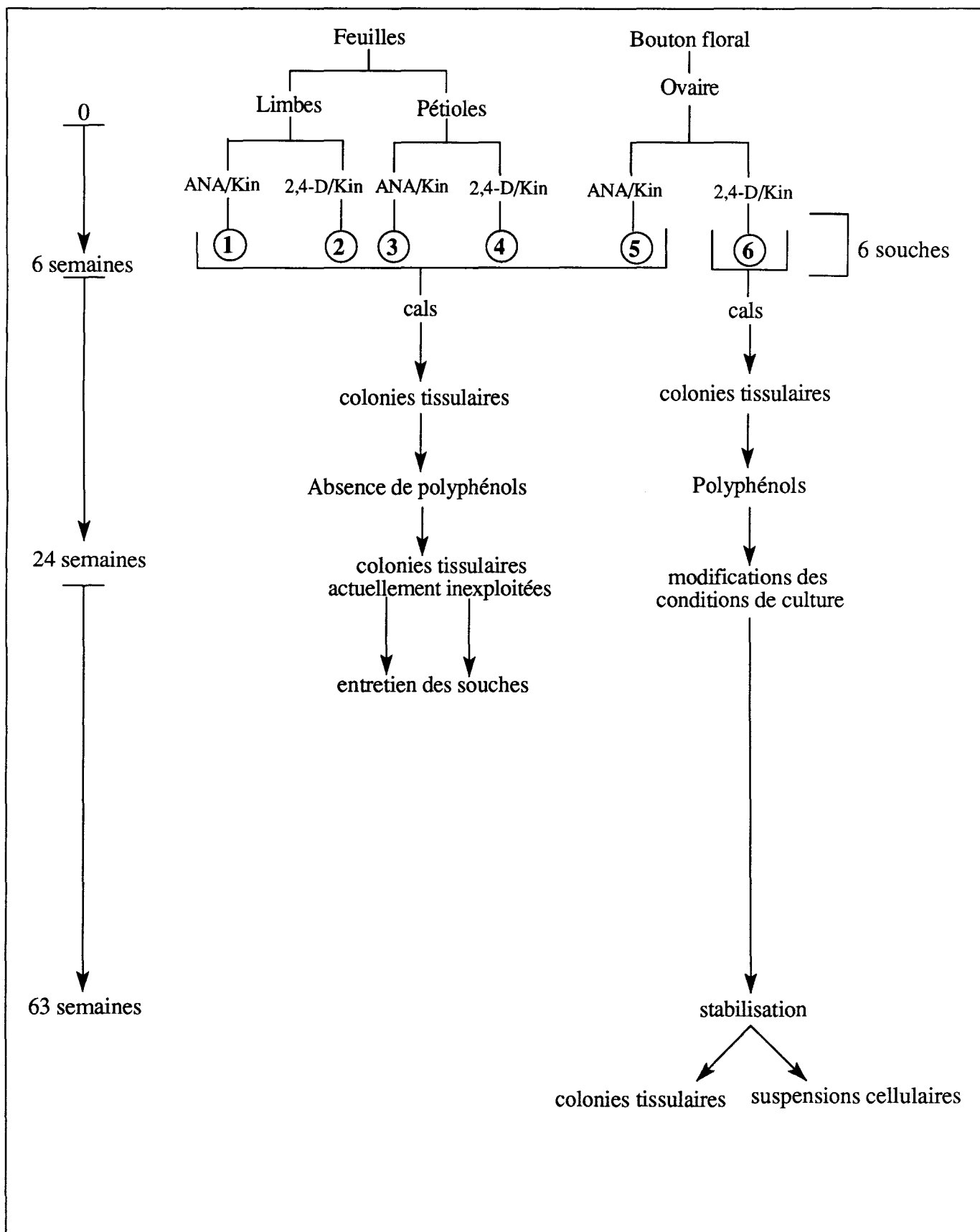


Figure 41 : Schéma récapitulatif de l'obtention des différentes colonies tissulaires issues de jeunes feuilles et de boutons floraux

B.LES POLYPHENOLS IN VITRO

Les résultats précédents ont montré *in vivo* que les organes foliaires et reproducteurs, notamment les **jeunes feuilles** et les **boutons floraux**, étaient les plus riches en polyphénols. Il paraissait alors intéressant de **développer des cultures cellulaires** à partir de ces tissus.

Le but était de tenter d'obtenir *in vitro*, de **meilleurs rendements**, et/ou une **production sélective** de polyphénols à propriétés bioactives.

En raison de l'évolution morphologique et biochimique des cultures *in vitro* issues de ces deux types d'explantats sur différents milieux nous avons, pour simplifier la présentation des résultats, divisé en 3 périodes le déroulement des cultures cellulaires depuis l'initiation (semaine 0) jusqu'à la fin de l'étude systématique (semaine 63). A l'articulation de ces périodes se sont situés des choix qui ont abouti à la conservation de 3 souches dont une seule a fait l'objet d'une étude détaillée dans le présent travail. Celle-ci, la **colonie tissulaire issue de cals d'ovaires** nous a par ailleurs permis de mettre en place des **suspensions cellulaires**.

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre "matériel et méthodes" (**Figures 13 et 14**), des cals ont été initiés à partir de **limbes**, de **pétioles** et d'**ovaires** sur 2 types de milieu contenant une combinaison soit de 2,4-D/Kinétine soit d'ANA/Kinétine. Les six souches qui en sont issues ont été systématiquement analysées jusqu'à la 24^{ème} semaine. Cinq d'entre elles sont restées très pauvres en phénols et n'ont montré aucune évolution. Durant la même période la 6^{ème} souche (**colonies tissulaires issues d'ovaires**) a été la seule à manifester progressivement une production intéressante de polyphénols signalée par l'apparition d'anthocyanes.

De la 24^{ème} semaine à la 63^{ème} semaine seule cette souche a continué de produire des polyphénols, ce qui nous a incité à poursuivre notre travail en la prenant comme modèle. Sa productivité en composés polyphénoliques a pu être considérée comme stable autour de la 63^{ème} semaine. A partir de ce moment, cette souche a fait l'objet d'une étude cinétique de la production en polyphénols. Des essais d'optimisation ont également été entrepris. De plus, **des suspensions cellulaires** ont été installées. L'obtention des différentes colonies tissulaires et les choix effectués sont schématisés dans la **figure 41**.

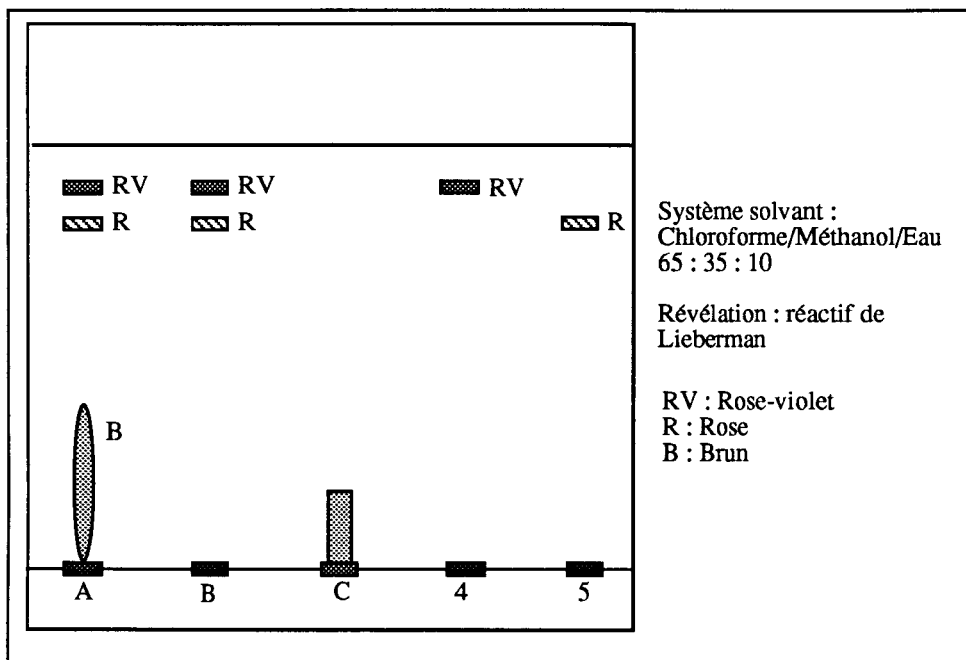


Figure 42 : Mise en évidence des dérivés triterpéniques (aglycones de saponosides) par chromatographie sur couche mince de cals d'aubépine issus de pétioles de feuilles (milieu ANA, Kinétine) : Fraction A (saponosides totaux), Fraction B (phase chloroformique = aglycones), Fraction C (phase aqueuse résiduelle = hétérosides),
 4, 5 : Témoins : acide oléanolique (4) et acide ursolique (5)

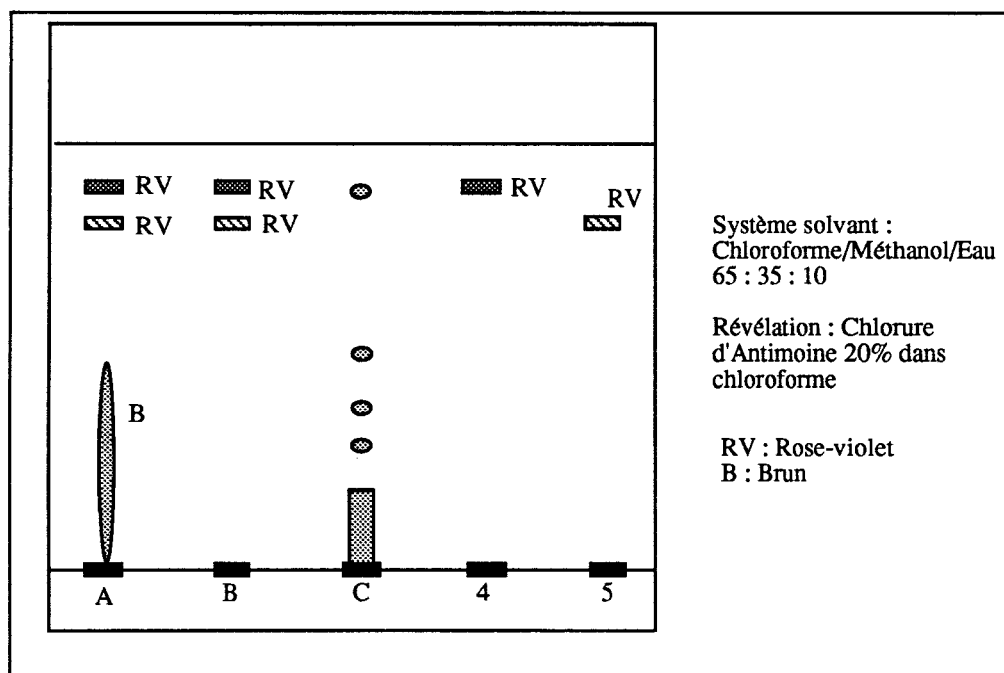


Figure 43 : Mise en évidence des dérivés triterpéniques (aglycones de saponosides) par chromatographie sur couche mince de cals d'aubépine issus de pétioles de feuilles (milieu 2,4-D, Kinétine) : Fraction A (saponosides totaux), Fraction B (phase chloroformique = aglycones), Fraction C (phase aqueuse résiduelle = hétérosides)
 4, 5 : Témoins : acide oléanolique (4) et acide ursolique (5)

I. MISE EN PLACE ET CHOIX DES COLONIES TISSULAIRES

A) PERIODE 1 (semaine 0-6)

Durant cette première période de six semaines, des cals ont été initiés à l'obscurité à partir de **limbes**, de **pétiotes** et d'**ovaires** sur 2 types de milieu à chaque fois (Cf. **Matériel et méthodes**). Six souches en sont issues (**Figure 41**).

B) PERIODE 2 (semaine 6-24)

□ 1. Cultures sur milieu ANA(2 mg.l⁻¹)/Kinétine(0,5 mg.l⁻¹)

Les **cals** formés à partir de **limbes**^① et de **pétiotes**^③ sont verts, compacts et durs (**Planche 2A, en annexe**).

Certains tissus d'**ovaires** en se développant ont transitoirement pris l'aspect de fruits imparfaits qu'on pourrait appeler "**pseudo-fruit**" ou "**faux fruit**" (**Planche 3, en annexe**). En effet ces structures comportent une pellicule externe rouge entourant une pulpe verte, mais pas de graine.

Par la suite ces "**pseudo-fruits**" ont produit lors des subcultures comme dans le cas des limbes et des pétiotes, des cals verts^⑤, compacts et durs.

Pendant cette période, compte tenu de la croissance très lente des **colonies tissulaires**, nous n'avons effectué les repiquages que tous les 2 mois.

Les souches ①,③,⑤ ont des caractéristiques chimiques identiques. Les chromatographies sur couche mince des extraits de **cals** issus de **limbes**^① et de **pétiotes**^③ montrent principalement la présence de dérivés triterpéniques, plus particulièrement des aglycones de saponosides de même Rf que les acides oléanolique et ursolique témoins (**Figure 42**).

Une analyse des "**faux fruits**" formés à partir d'ovaires a montré la présence de proanthocyanidines et de catéchines avec un profil identique à la pulpe du fruit rouge adulte.

Par la suite les **cals** et les **colonies tissulaires**^⑤ formés à partir de ces faux fruits étaient dépourvus de composés polyphénoliques et on y trouvait des dérivés triterpéniques.

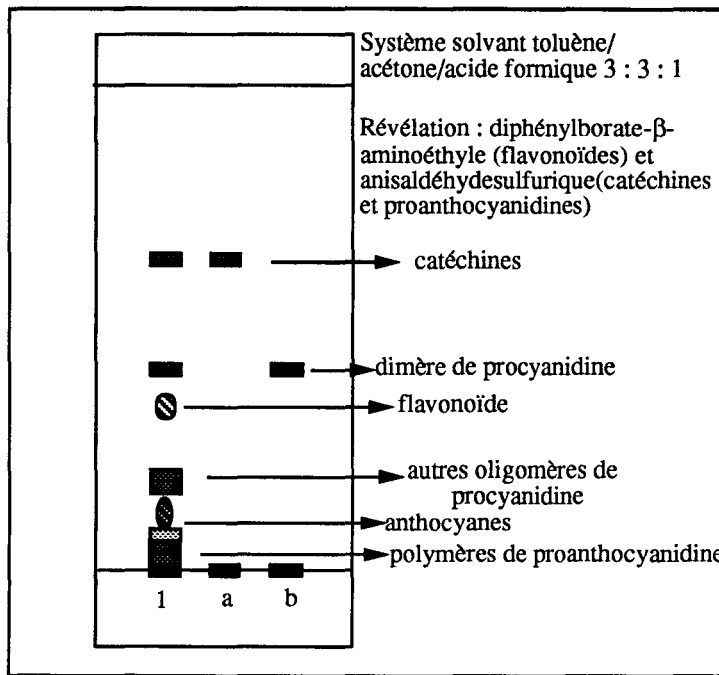


Figure 44 : Mise en évidence des proanthocyanidines, flavonoïdes et anthocyanes par chromatographie sur couche mince de silice. L' extrait analysé (1) provient de colonies tissulaires d'ovaires cultivées pendant 24 semaines en lumière 16 : 8.

Témoins a : (-) épicatechine, b : (-) proanthocyanidine dimère B2

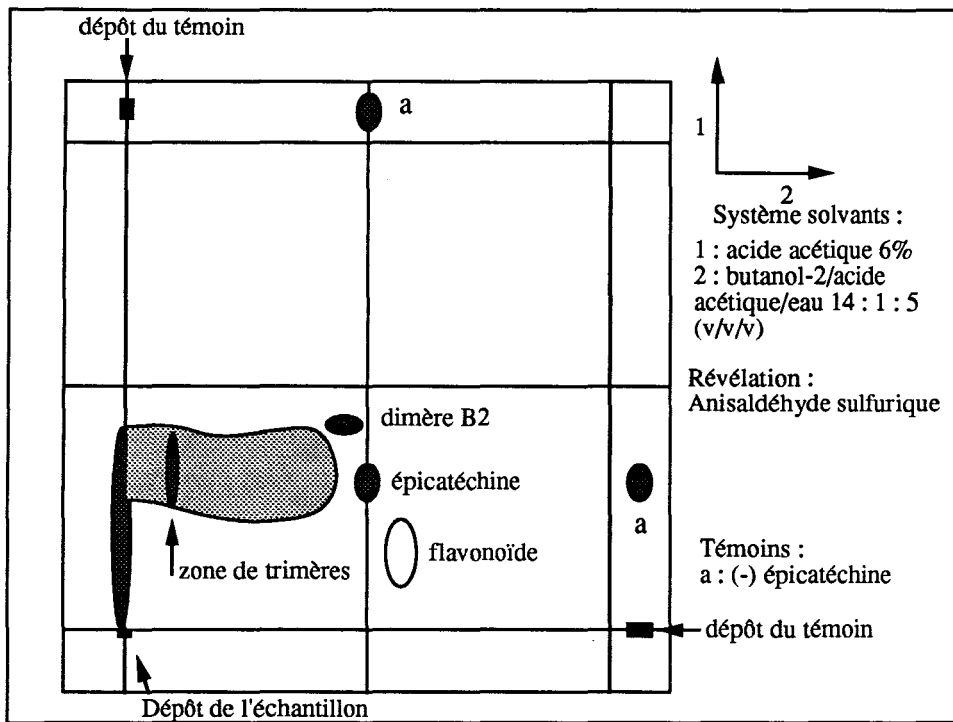


Figure 45 : Mise en évidence de l'épicatechine et des oligomères de proanthocyanidines, par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose, à partir d'un extrait total de colonies tissulaires d'ovaires.

□ 2. Cultures sur milieu 2,4-D(2 mg.l⁻¹)/Kinétine(0,5 mg.l⁻¹)

Les **cals** initiés à partir de **limbes**^②, de **pétiolés**^④ et d'**ovaires**^⑥ sont jaunes, granuleux et présentent une consistance molle. Leur croissance est beaucoup plus rapide et ils sont par conséquent repiqués tous les 21 jours de culture.

Les **colonies tissulaires** cultivées à partir des cals de **limbes**^② et de **pétiolés**^④ ont conservé le même aspect après lors des repiquages successifs (**Planche 2B, en annexe**).

Les **colonies tissulaires** issues de cals d'ovaires^⑥ produisent en fin de culture des zones superficielles pigmentées en rouge.

L'expérience des colonies tissulaires de Sarrasin nous avait montré que la production d'anthocyanes nécessite un apport accru de la lumière et que ces pigments étaient des marqueurs visuels corrélés à la production des autres catégories de polyphénols (Moumou *et al.*, 1987, 1992a,b,c). Nous avons alors décidé de sélectionner lors de chaque repiquage, les tissus les plus rouges et de fournir aux cultures un éclairage important. Nous avons donc transféré une partie des **colonies tissulaires**^⑥ en lumière continue tout en laissant l'autre partie avec 16 heures de lumière. Ceci a été effectué 24 semaines après la mise en culture. A partir de cette période nous avons observé un rougissement plus intense des cultures (**Planche 4A, en annexe**).

Sur ce milieu de culture les compositions chimiques des **cals** et des **colonies tissulaires** de **limbes**^② et de **pétiolés**^④ diffèrent de celles des **ovaires**.

2.1 Cultures de limbes et de pétiolés

Les cultures provenant de **limbes**^② et de **pétiolés**^④ produisent essentiellement des dérivés triterpéniques et des aglycones de saponosides (acide oléanolique et ursolique) (**Figure 43**).

La recherche de composés polyphénoliques (proanthocyanidines, catéchines et flavonoïdes) s'est avérée négative. Les dosages de phénols totaux dans ces colonies tissulaires montrent des valeurs faibles variant entre 0,03 et 0,04 g/100 g de masse sèche.

2.2 Culture d'ovaires

Les premières analyses effectuées sur des extraits issus de **cals d'ovaires**^⑥ ont permis de mettre en évidence des dérivés triterpéniques ainsi que des proanthocyanidines. Six semaines après la mise en culture, la teneur en proanthocyanidines totales évaluée par colorimétrie était de 0,190 g/100 g MS. Nous avons estimé par ailleurs la quantité d'oligomères à 0,062 g/100 g MS et celle des polymères à 0,07 g /100 g MS.

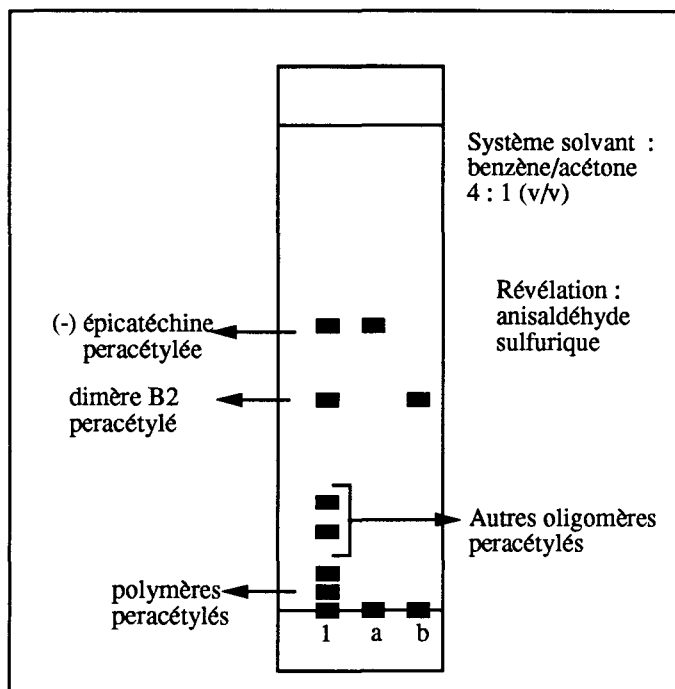


Figure 46 : Mise en évidence des peracétates de proanthocyanidines et de catéchines par chromatographie sur couche mince de silice. L'extrait peracétylé analysé (1) provient de colonies tissulaires cultivés pendant 24 semaines sous 16 heures de lumière. Témoins a : (-) épicatechine peracétylée, b : proanthocyanidine dimère peracétylée

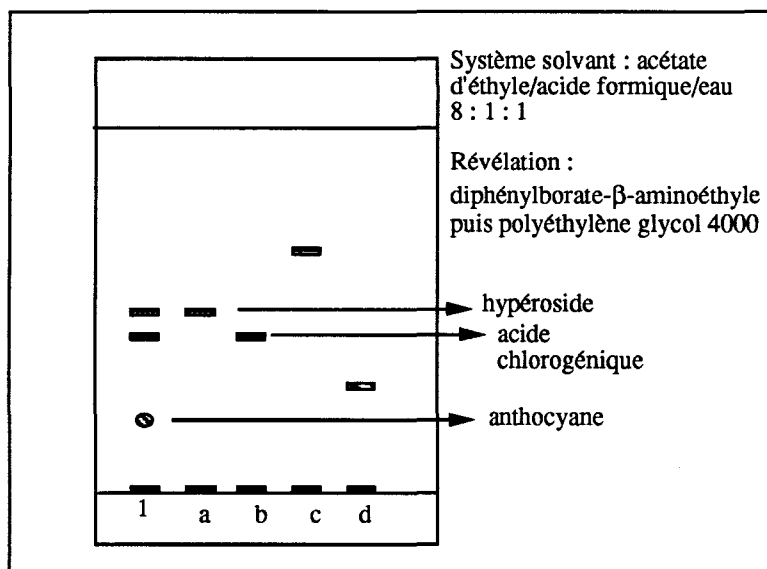


Figure 47 : Mise en évidence des flavonoïdes et de l'acide chlorogénique par chromatographie sur couche mince de silice. L'extrait analysé (1) provient de colonies tissulaires cultivées pendant 24 semaines sous 16 heures de lumière. Témoins a : hypéroside, b : acide chlorogénique, c : vitexine, d : rutine

Pour confirmer la présence des proanthocyanidines et mettre en évidence la production éventuelle d'autres composés polyphénoliques nous avons, au moment du transfert en lumière continue (24 semaines de culture), effectué un bilan qualitatif et quantitatif.

2.2.1 Analyse qualitative

La co-chromatographie sur couche mince (avec comparaison des Rf et comportements dans différents révélateurs), puis la confirmation d'identification de certaines substances isolées par leur temps de rétention par CLHP ont montré qu'il existait 4 catégories de composés polyphénoliques.

- Les **proanthocyanidines** et **catéchines** ont été spécialement mises en évidence dans 3 systèmes chromatographiques sur couche mince dont l'un pour les peracétates.

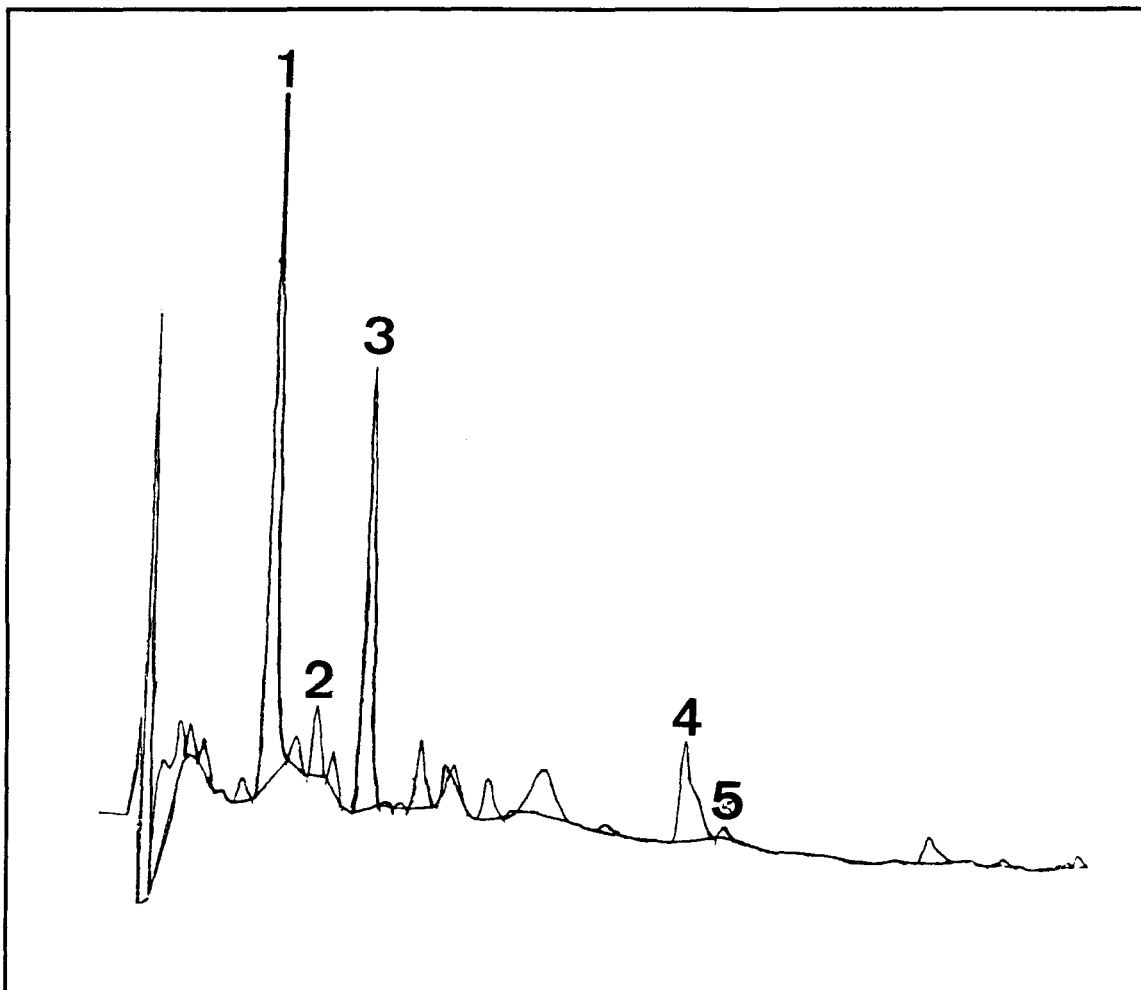
Le système toluène/acétone/acide formique sur couche mince de silice (**Figure 44**), mise au point par Lea *et al.*, (1979), est précieux pour sa rapidité et sa simplicité. Il a la particularité d'étager les proanthocyanidines et catéchines en fonction des masses moléculaires. Les **polymères** et les **oligomères** de masses moléculaires élevées ont des Rf faibles. Le Rf de la zone des **dimères** se situe aux alentours de 0,44 tandis que celui des **catéchines** est de 0,68.

On distingue aussi une bande correspondant aux autres **oligomères** (probablement des trimères) (Rf=0,28) mais avec une intensité plus faible. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par les mêmes auteurs sur les analyses des dérivés flavanes du raisin.

La méthode de chromatographie sur couche mince bidimensionnelle décrite par Thompson *et al.*, (1972) a permis de mettre en évidence la présence de la (-) **épicatéchine**, de la **proanthocyanidine dimère B2** (**Figure 45**). Ces deux composés ont été identifiés par CLHP. On pense y avoir noté la présence d'une tache correspondant aux **trimères**.

De plus, la présence de la **proanthocyanidine dimère B2** (Rf 0,41) est confirmée dans le système benzène/acétone (**Figure 46**) après peracétylation de l'extrait total. Les résultats obtenus montrent, grâce à un étagement précis, la présence de la (-) **épicatéchine** (Rf 0,60), de **proanthocyanidines trimères** et d'une zone de très faible Rf correspondant aux **polymères**.

- Le **flavonoïde** principal, mis en évidence dans le système acétate d'éthyle/acide formique/eau (**figure 47**) correspond à l'**hypéroside** (Rf=0,49).
- Un **acide phénol** majoritaire a aussi été identifié dans le même système (**Figure 47**) comme étant l'**acide chlorogénique** (Rf=0,47).



Pic 1	Acide chlorogénique
Pic 2	Dimère B2
Pic 3	(-) Epicatéchine
Pic 4	Hypéroside
Pic 5	Isoquercitroside

Polyphénols	Temps de rétention (min)
Acide chlorogénique	10,05
Dimère B2	13,19
(-) Epicatéchine	16,22
Hypéroside	35,58
Isoquercitroside	38,10

Figure 48 : Profil CLHP et temps de rétention des principaux polyphénols identifiés dans des colonies tissulaires d'ovaires

- Malgré le fait que ces différents systèmes chromatographiques, notamment les solvants toluène/acétone /acide formique (**Figure 44**) et acétate d'éthyle/acide formique/eau (**Figure 45**) ne soient pas spécifiquement adaptés pour l'étude des **anthocyanes**, ils nous ont permis de montrer leur présence dans nos extraits.

L'analyse par CLHP des extraits de colonies tissulaires en présence de témoins internes et externes nous a permis de confirmer les résultats précédents en précisant la nature des différents constituants (**Figure 48**).

Il s'agit de l'acide chlorogénique (pic 1), de la proanthocyanidine dimère B2 (pic 2), de la (-) épicatechine (pic 3) et de l'hypéroside (pic 4). Nous avons aussi décelé un pic de faible intensité (pic 5) correspondant à l'isoquercitroside. Ce dernier flavonoïde n'avait pas été décelé en chromatographie sur couche mince en raison de sa très faible concentration.

2.2.2 Analyse quantitative

Nous avons, lors des cultures sous 16 heures d'éclairement, observé une augmentation progressive des teneurs en polyphénols des colonies tissulaires qui s'est poursuivie jusqu'à la 24^{ème} semaine, date à laquelle la production de proanthocyanidines totales était de 1,004 g/100 g MS, celle des polymères de 0,324 g et celle des d'oligomères de 0,307 g. Ces deux dernières valeurs obtenues après le fractionnement par l'acétate d'éthyle ne restituent jamais arithmétiquement, à cause des pertes dans les séparations, la valeur des proanthocyanidines totales.

Par CLHP nous avons obtenu les valeurs suivantes ramenées à 100 g MS : proanthocyanidine dimère B2 = 0,022 g, (-) épicatechine = 0,465 g, acide chlorogénique = 0,090 g et l'hypéroside = 0,018 g

De plus nous avons noté la présence d'anthocyanes à raison de 0,023 g/100 g de MS.

A titre d'indication les colonies tissulaires restées à **l'obscurité** produisent après 24 semaines 0,18 g de proanthocyanidines totales dont 0,085 g de polymères et 0,075 g d'oligomères pour 100 g de MS. Ces valeurs sont très voisines de celles observées à la 6^{ème} semaine et expliquent que les différents composés restent difficilement détectables compte tenu de leur faible concentration.

Conclusions

→ Ces résultats nous ont permis de choisir les **colonies tissulaires** installées à partir d'ovaires cultivés sur le milieu B5 contenant du **2,4-D (2 mg.l⁻¹)** et de la **kinétine (0,5 mg. l⁻¹)**, c'est à dire la souche[®]. Ce sont les seules colonies tissulaires qui produisent des polyphénols en quantités intéressantes.

C) PERIODE 3 (semaines 24-63)

Au cours de cette période, seules les colonies tissulaires issues d'ovaires[®] sont étudiées. Une première partie des cultures a été soumise à un éclairage journalier de 24 heures pour tenter d'augmenter la production d'anthocyanes et celle des autres polyphénols. Une deuxième partie a été disposée sous 16 heures d'illumination et une troisième a été laissée à l'obscurité. Cette démarche expérimentale est résumée dans la **figure 13** (Cf. **Matériel et méthodes**).

II. CINETIQUE DE PRODUCTION DES POLYPHENOLS DANS LES COLONIES TISSULAIRES ISSUES D'OVAIRES

L'évolution qualitative et quantitative des différentes catégories de composés a été suivie de la 24^{ème} à la 63^{ème} semaine. Les repiquages sont réalisés toutes les trois semaines sur milieu neuf ce qui correspond pour cette période à 13 transferts avec analyse préalable avant chacun des transferts.

L'intérêt de cette étude cinétique est de montrer l'évolution comparative des composés polyphénoliques sous différentes conditions d'illumination.

1. A l'obscurité

Les teneurs en composés phénoliques n'ont pratiquement pas évolué entre la 24^{ème} et la 63^{ème} semaine de culture. Une production moyenne de 0,18 g/100 g MS a été obtenue pour les proanthocyanidines totales. Les oligomères et polymères de proanthocyanidines représentent 0,065 et 0,085 g/100 g MS. Ces colonies sont dépourvues d'anthocyanes.

Nous n'avons pu déterminer les teneurs des composés individuels (dimère B2, (-) épicatechine, acide chlorogénique et hypéroside) en raison de leur trop faible concentration.

2. Sous un éclairement 16h lumière / 8h obscurité

2.1 Proanthocyanidines

Après la 24^{ème} semaine, malgré des fluctuations, les teneurs en proanthocyanidines totales sont en nette augmentation (**Figure 49**). Sur la période des semaines 24 à 63 la valeur moyenne calculée est de 1,74 g/100 g MS. Des points correspondant à des productions

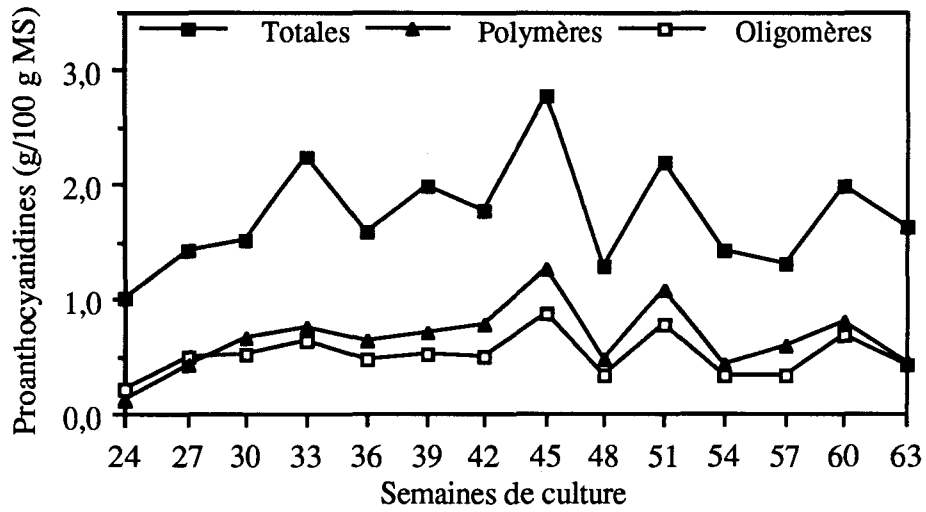


Figure 49 : Teneurs en proanthocyanidines totales, en polymères, en oligomères et en dimère B2 observées entre la 24^{ème} et la 63^{ème} semaine, sous 16 heures d'éclairément, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

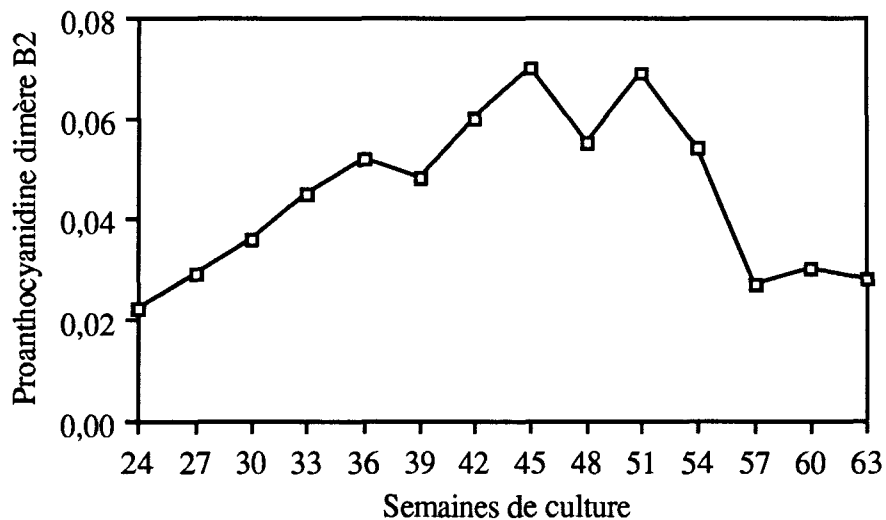


Figure 50 : Teneurs en proanthocyanidine dimère B2 observées entre la 24^{ème} et la 63^{ème} semaine, sous 16 heures d'éclairément, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

importantes ont été observés vers la 33^{ème} (2,25 g), 45^{ème} (2,78 g), 51^{ème} (2,20 g) et la 60^{ème} semaine (2 g) de culture.

Les dosages durant ces 13 subcultures montrent que les productions en polymères et oligomères évoluent parallèlement avec des valeurs très légèrement supérieures pour les premiers. Les moyennes calculées pour cette période sont de 0,965 pour les polymères et 0,5 g/100 g MS pour les oligomères. Des teneurs maximales ont été notées vers la 45^{ème} et la 51^{ème} semaine (polymères : 1,25 g et 1,08 g ; oligomères : 0,86 et 0,77 g pour 100 g MS).

La teneur en proanthocyanidine dimère B2 reste très faible tout au long des 39 semaines de culture (entre 0,02 g et 0,07 g /100 g MS) (**Figure 50**). Si l'augmentation est régulière jusqu'à la 45^{ème} semaine (0,07 g/100 g MS), elle est suivie après la 51^{ème} semaine d'une baisse pour atteindre des valeurs plus faibles (0,02 g/100 g MS) entre la 57^{ème} et la 63^{ème} semaine de culture qui se rapprochent des valeurs initiales.

2.2 (-) Epicatechine

L'évolution de la (-) épicatechine est irrégulière (**Figure 51**). La teneur augmente également vers la 45^{ème} semaine de culture (0,878 g/100 g MS) puis baisse pour apparaître à la 63^{ème} semaine (0,452 g/100 g MS) peu différente de celle observée à la 24^{ème} semaine de culture (0,452 g/100 g MS), comme dans le cas du dimère B2.

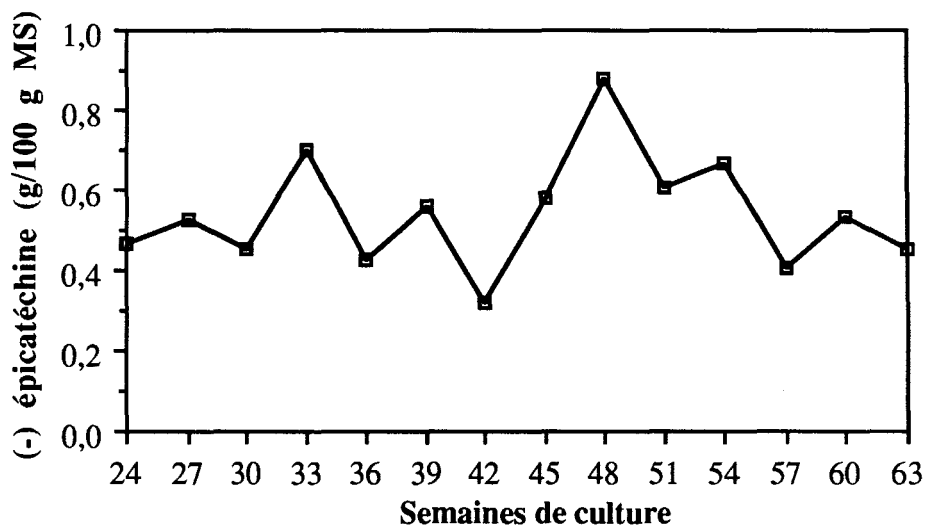


Figure 51 : Teneurs en (-) épicatechine entre la 24^{ème} et la 63^{ème} semaine, sous 16 heures d'éclairage, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

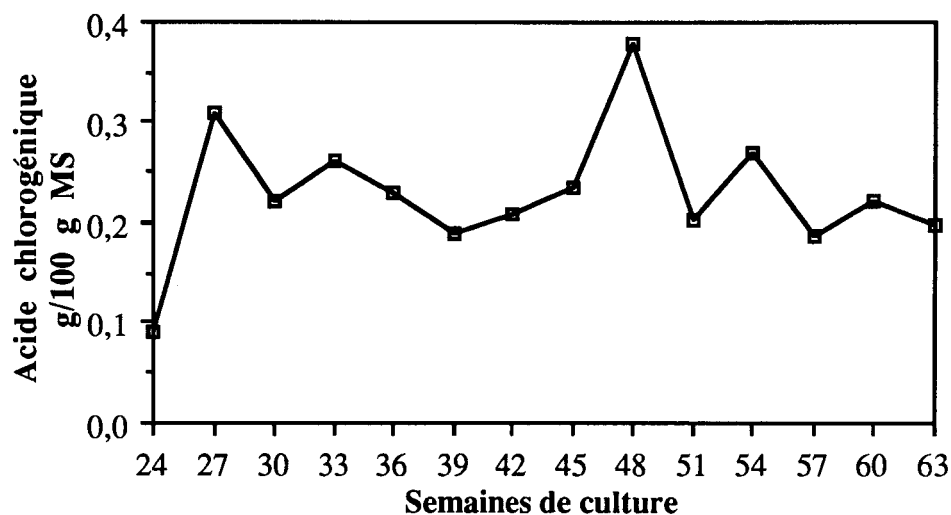


Figure 52 : Teneurs en acide chlorogénique entre la 24 ème et la 63 ème semaine, sous 16 heures d'éclairément, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

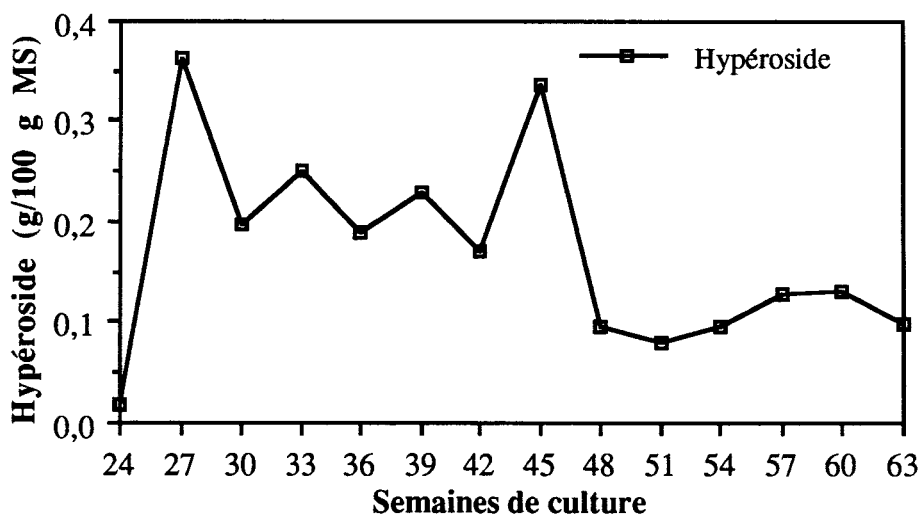


Figure 53 : Teneurs en hypéroside entre la 24 ème et la 63 ème semaine, sous 16 heures d'éclairément, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

2.3 Acide chlorogénique

Une augmentation relativement importante et rapide (semaines 24 à 27) de l'acide chlorogénique est observée entre la 24^{ème} et la 27^{ème} semaine et correspond au transfert des colonies de l'obscurité à un éclairage journalier de 16 heures. Les teneurs passent de 0,090 g à 0,309 g/100 g MS (**Figure 52**). Une augmentation temporaire se produit à la 48^{ème} semaine (0,380 g/100 g MS) mais par la suite les valeurs se stabilisent autour d'une valeur proche de la moyenne de la période de la 27^{ème} à la 63^{ème} pour terminer à 0,2 g/100 g MS à la 63^{ème} semaine.

2.4 Hypéroside

Des fluctuations importantes en hypéroside sont observées. Elles rappellent beaucoup celles de l'acide chlorogénique (**Figure 53**) avec une augmentation rapide entre la 24^{ème} (0,018 g/100 g MS) et la 27^{ème} semaine (0,362 g/100 g MS) puis une stabilisation autour de 0,20-0,25 g/100 g MS (semaine 30-42). Un pic momentané est noté vers la 45^{ème} semaine (0,335 g/100 g MS). A partir de la 48^{ème} semaine les valeurs sont moins importantes mais moins variables et se situent entre 0,095 et 0,098 g/100 g MS (semaines 48-63).

2.5 Anthocyanes

A partir de la 24^{ème} semaine nous avons noté une augmentation progressive des teneurs jusqu'à la 42^{ème} semaine (0,087 g/100 g MS). La production devient par la suite très variable jusqu'à la fin de la 63^{ème}, où elle n'est que de 0,034 g/100 g MS (**Figure 54**).

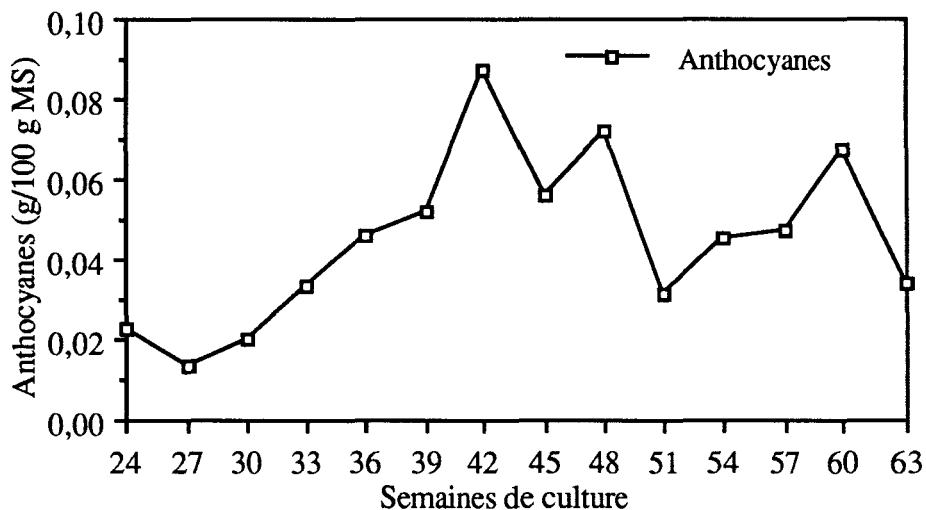


Figure 54 : Teneurs en anthocyanes entre la 24^{ème} et la 63^{ème} semaine, sous 16 heures d'éclairage, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

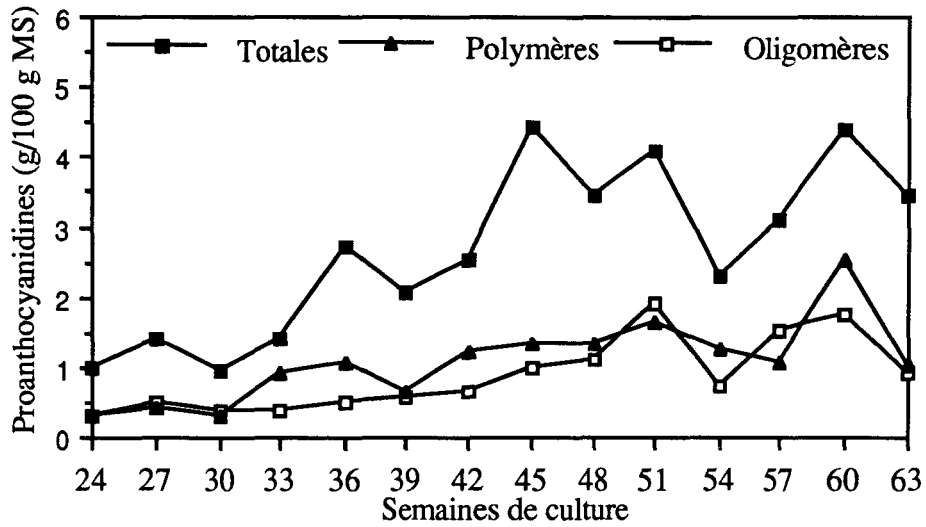


Figure 55 : Teneurs en proanthocyanidines totales, en polymères et en oligomères observées entre la 24 ème et la 63 ème semaine, sous 24 heures d'éclairément, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

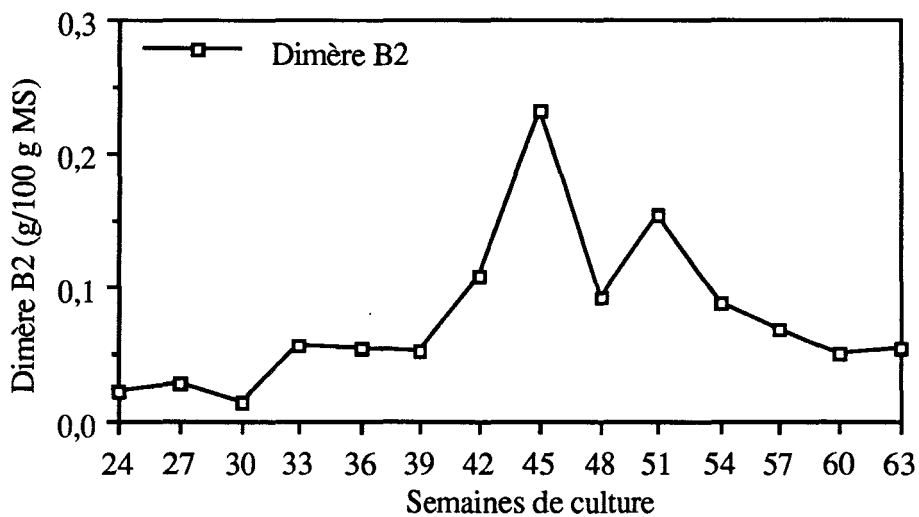


Figure 56 : Teneurs en proanthocyanidine dimère B2 entre la 24 ème et la 63 ème semaine, sous 24 heures de lumière, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

3. En lumière continue

En présence de lumière continue la production des polyphénols subit davantage de modifications.

3.1 Proanthocyanidines

Après le **transfert en lumière continue**, la production de proanthocyanidines s'est intensifiée mais reste irrégulière (**Figure 55**).

Pour les proanthocyanidines totales les maxima de production se situent aux semaines 45, 51 et 60 avec des valeurs au voisinage de 4 g/100 g MS. Compte tenu de la présence ponctuelle de valeurs en nette décroissance à la 54^{ème} semaine, nous avons jugé bon de fournir une valeur moyenne calculée pour la période des semaines 45 à 54 qui semble en général correspondre à une sorte de plateau de production. Cette moyenne, de l'ordre de 3.5 g/100 g MS, semble avoir été ultérieurement maintenue (2 à 3 ans de subculture) puisqu'on la retrouve dans l'étude d'une subculture sur 40 jours.

Les polymères et oligomères ont montré une progression lente mais analogue. Nous avons observé pour les polymères une certaine stabilité dans la production entre la 42^{ème} et la 57^{ème} semaine de culture (1,02 g -1,2 g/100 g MS). Une production importante d'oligomères est observée entre la 45^{ème} et la 63^{ème} semaine. La moyenne calculée sur cette période est de 1,3 g/100 g MS.

Pour la proanthocyanidine B2, les valeurs marquent des variations larges spécialement aux 45^{ème} et 51^{ème} semaines où deux maxima ont été enregistrés (respectivement 0,232 et 0,154 g /100 g de MS) (**Figure 56**). La teneur finale n'est pas très différente des teneurs initiales.

3.2 (-) Epicatéchine

La production de la (-) épicatéchine, qui était précédemment en constante augmentation depuis la 6^{ème} semaine de culture ne s'est presque pas modifiée après le transfert à la lumière continue (**Figure 57**). Contrairement aux proanthocyanidines, ce n'est qu'à partir de la 42^{ème} semaine de culture qu'une teneur importante est observée avec un maximum à la 45^{ème} semaine (2,988 g/100 g de MS).

Par la suite une diminution est enregistrée jusqu'à la 63^{ème} semaine de culture pour aboutir à une valeur supérieure à la valeur initiale.

Notons l'analogie entre les profils de production de la (-) épicatéchine (**Figure 57**) et de la proanthocyanidine dimère B2 (**Figure 56**). Cette observation peut être expliquée par le

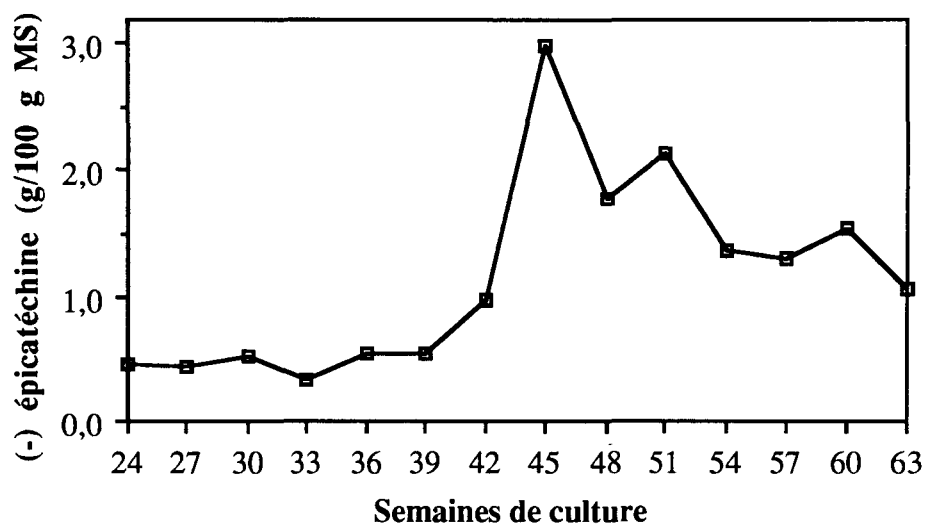


Figure 57 : Teneurs en (-) épicatechine entre la 24 ème et la 63 ème semaine, sous 24 heures de lumière, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

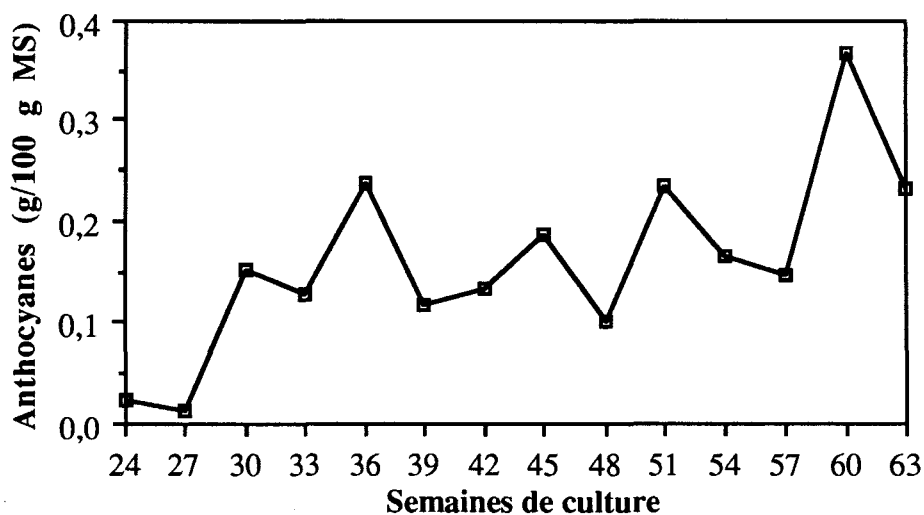


Figure 58 : Teneurs en anthocyanes entre la 24 ème et la 63 ème semaine, sous 24 heures de lumière, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

fait que la molécule dimère B2 est le résultat théorique d'une addition de deux entités de (-) épicatechine.

Cela pourrait expliquer les fluctuations similaires notées dans la production de ces deux types substances.

3.3 Anthocyanes

Exposées à la lumière continue les colonies tissulaires présentent rapidement (dès la 27^{ème} semaine) des valeurs accrues en anthocyanes (**Figure 58**). Malgré un certain nombre de fluctuations on observe globalement une augmentation générale des teneurs avec un maximum voisin de 0,35-0,40 g/100 g MS vers la 60^{ème} semaine de culture et une moyenne de 0,18 g/100 g MS entre les semaines 30 et 63.

3.4 Acide chlorogénique

L'acide chlorogénique est l'acide-phénol majoritaire des colonies tissulaires issues de cals formés à partir de tissus d'ovaires. La production augmente nettement après la mise en lumière continue (**Figure 59**). Des valeurs maximales sont notées aux 45^{ème}, 51^{ème} et 60^{ème} semaine de culture (0,971, 0,913 et 0,926 g/100 g MS) et la moyenne entre les semaines 42-63 est de 0,70 g/100 g MS. Il y a donc une augmentation globale durant cette période.

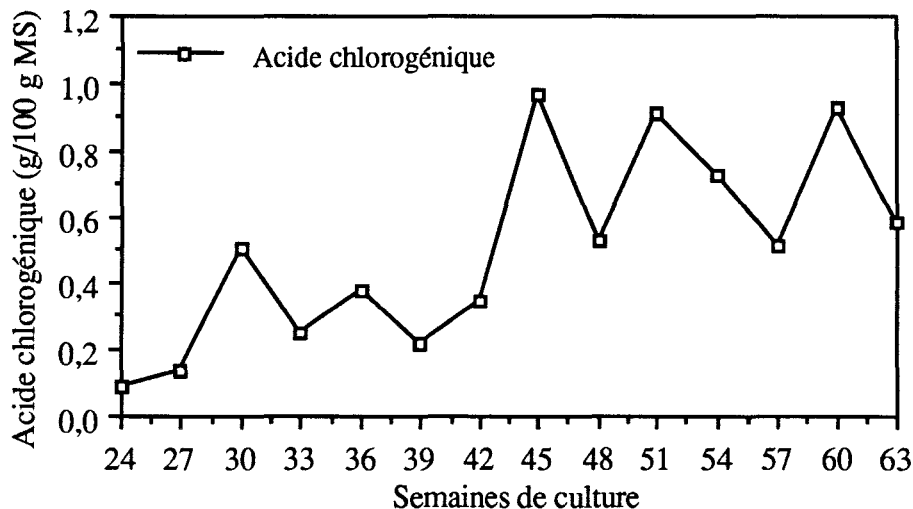


Figure 59 : Teneurs en acide chlorogénique entre la 24^{ème} et la 63^{ème} semaine, sous 24 heures de lumière, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

3.5 Hypéroside

L'hypéroside est le flavonoïde principal qui a été détecté et donc analysé. Nous n'avons par ailleurs observé que des traces d'isoquercitroside. La production d'hypéroside semble assez inconstante avec deux phases d'augmentation (semaine 27-36 ; maximum : 0,73 g/100 g MS et

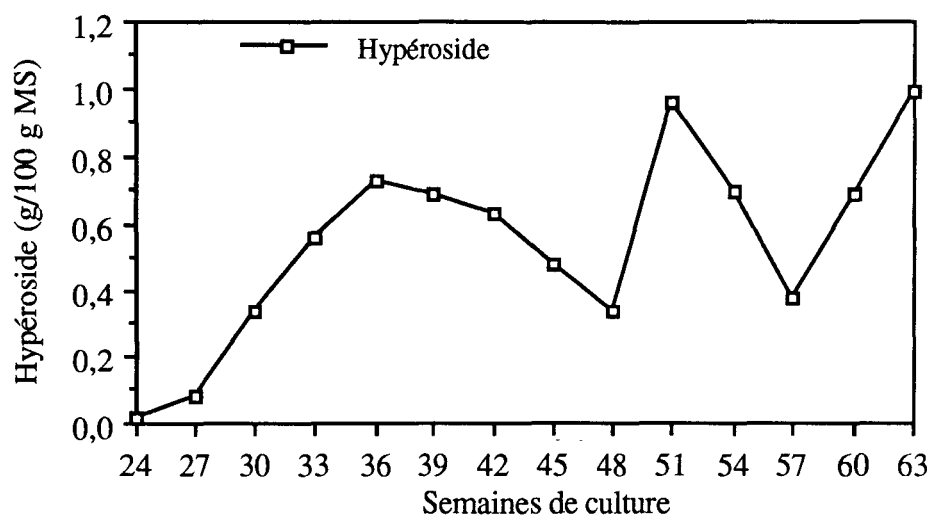


Figure 60 : Teneurs en hypéroside entre la 24^{ème} et la 63^{ème} semaine, sous 24 heures de lumière, au cours des subcultures successives des colonies tissulaires issues des boutons floraux

	Teneurs à la 24 ^{ème} semaine semaine photopériode 16h /8h g/100 g MS	Teneurs à la 63 ^{ème} semaine g/100 g MS	
		Photopériode 16h /8h	Lumière continue
Proanthocyanidines			
- Totales	1,004	1,643	3,444
- Polymères	0,124	0,450	1,039
- Oligomères	0,307	0,324	0,931
- Dimère B2	0,022	0,028	0,054
(-) épicatechine	0,465	0,452	1,071
Hypéroside	0,018	0,098	0,988
Acide chlorogénique	0,090	0,196	0,581
Anthocyanes	0,023	0,034	0,231

Tableau 13 : Comparaison des teneurs en polyphénols des colonies tissulaires issues de boutons floraux cultivées pendant 63 semaines sous une photopériode 16 h lumière/ 8h obscurité ou en lumière continue.

semaine 48-51 ; maximum : 0,96 g /100 g MS) au cours des subcultures successives avant d'aboutir à un optimum vers la 63^{ème} semaine (1g /100 g MS) (**Figure 60**).

Conclusions

A l'issue des 63 semaines de culture et malgré les fluctuations, nous avons pu considérer que la production en phénols est différente sous les deux conditions d'illumination. Sous un éclairage de 24 heures il est possible d'obtenir des teneurs en composés polyphénoliques intéressantes. Ces données, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, sont en concordance avec les travaux cités dans la littérature (Margna *et al.*, 1971, 1973 ; Moumou *et al.*, 1987, 1992a,b,c.). Le **tableau 13** résume les résultats comparatifs 16h/8h (lumière/obscurité) entre les valeurs initiales et finales.

- ➔ Sous une photopériode de 16h lumière : 8h obscurité, les teneurs finales sont en général **peu différentes** des **teneurs initiales** sauf dans le cas de proanthocyanidines polymères, de l'acide chlorogénique, et de l'hypéroside.
- ➔ En lumière continue malgré des fluctuations parfois importantes au cours de la cinétique, une **augmentation nette** a été observée pour **tous les composés** à la 63^{ème} semaine. Mais le temps de réaction à l'apport de lumière est très variable selon les composés. La (-) **épicatechine**, la **proanthocyanidine dimère B2** et les autres **proanthocyanidines** n'augmentent progressivement qu'à partir de la 30^{ème} semaine ce qui n'est pas sans rappeler les observations sur la relative indépendance par rapport à la lumière notée *in vitro* pour ces mêmes substances dans les colonies tissulaires de Sarrasin étudiées dans notre laboratoire par Moumou *et al.*, (1992b).
Par contre **l'hypéroside**, **l'acide chlorogénique** et surtout les **anthocyanes** sont nettement et immédiatement influencés par un apport de lumière.

Compte tenu de ces résultats nous avons choisi d'utiliser les colonies tissulaires cultivées à la lumière continue pour :

- ➔ étudier la production des polyphénols au cours d'une subculture de 40 jours.
- ➔ établir des suspensions cellulaires et analyser leur contenu en polyphénols au cours d'une subculture de 40 jours.
- ➔ essayer d'optimiser la production en phénols par des apports de composés en C₆-C₁ comme l'acide gallique et l'acide shikimique dans les milieux de culture.
- ➔ comparer les productions entre les colonies tissulaires et les suspensions cellulaires.

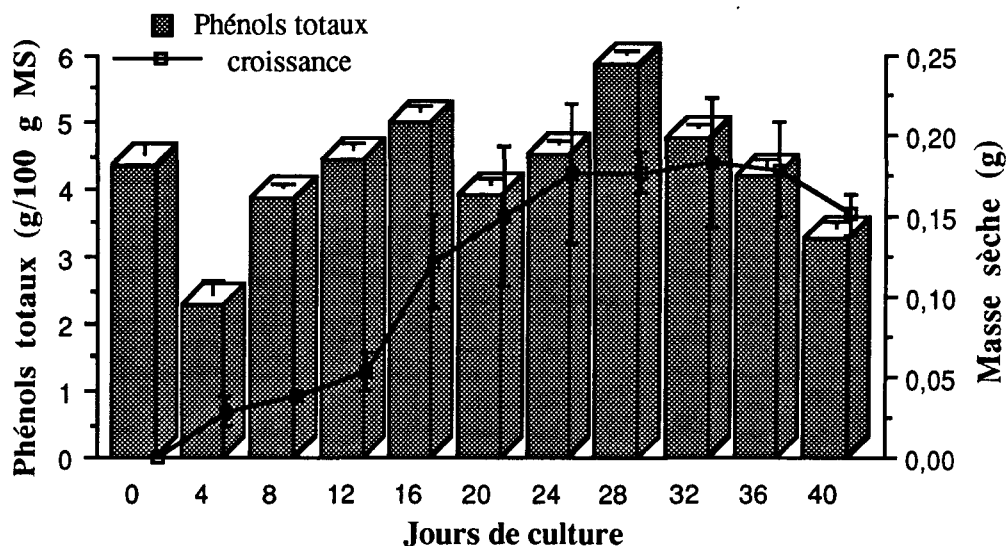


Figure 61 : Teneurs en phénols totaux au cours de la croissance d'une colonie tissulaire cultivée pendant 40 jours en lumière continue et à 22°C.

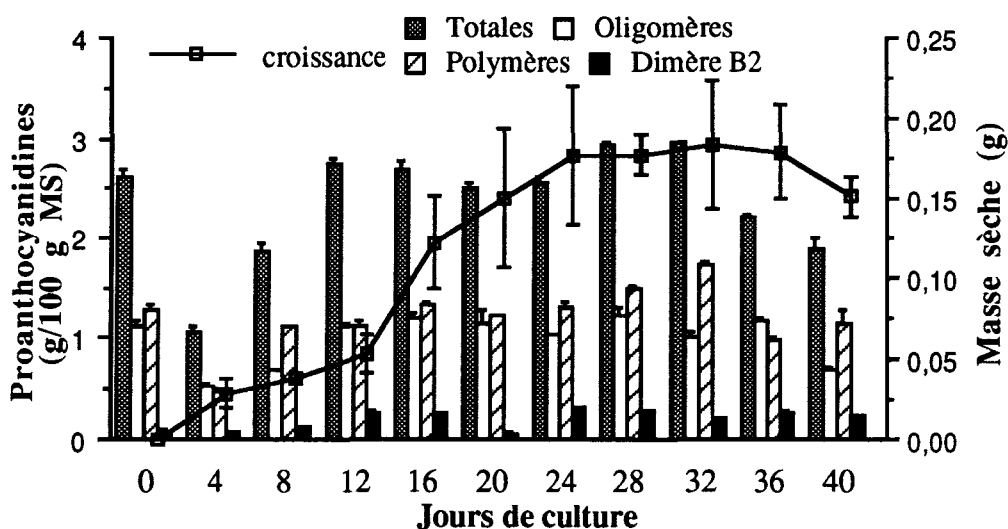


Figure 62 : Teneurs en proanthocyanidines totales, en oligomères, en polymères ainsi qu'en dimère B2 au cours de la croissance d'une colonie tissulaire cultivée pendant 40 jours en lumière continue et à 22°C.

III ANALYSE DE LA CROISSANCE ET DE LA PRODUCTION EN POLYPHENOLS DE COLONIES TISSULAIRES CULTIVEES EN LUMIERE CONTINUE

1. Evolution des polyphénols au cours d'une subculture de 40 jours

Cette étude a été effectuée pour tenter de déterminer durant la croissance des tissus, la période optimale de production de polyphénols ainsi que les périodes éventuelles d'apparition sélective de composés particuliers ayant un intérêt pharmacologique accru.

Nous avons donc étudié, à partir de colonies tissulaires âgées de 2 ans, l'évolution des polyphénols au cours d'une subculture de 40 jours avec des prélèvements tous les quatre jours.

1.1 Phénols totaux

La **figure 61** montre l'évolution des phénols totaux par rapport à la masse sèche. La croissance optimale (0,177-0,184 g) est observée entre le 24^{ème} et le 32^{ème} jour de culture. Cette période est également marquée par des teneurs importantes en phénols (5,890 g/100 g MS au 28^{ème} jour). Une synthèse très active se produit également au début de la phase de croissance (jours 4-16; 2,290 g - 4,985 g/ 100 g MS) mais à ce stade la biomasse est faible.

1.2 Proanthocyanidines

En ce qui concerne les proanthocyanidines (**Figure 62**) nous avons observé comme pour les phénols totaux deux périodes de production active. La première se situe entre le 4^{ème} et le 16^{ème} jour avec un maximum au 12^{ème} jour (2,756 g/100 g MS). La deuxième est observée entre le 20^{ème} et le 40^{ème} jour et la production optimale est atteinte au 32^{ème} jour (2,95 g/100 g MS). Il faut noter que l'évolution des teneurs en proanthocyanidines totales est parallèle à celle des phénols totaux.

Les oligomères, après avoir atteint un plateau dès le 12^{ème} jour restent assez stables jusqu'au 36^{ème} jour. Les valeurs moyennes varient autour de 1 g/100 g MS.

La même observation est faite pour les polymères : valeurs comprises entre 1,300 g et 1,370 g/100 g de MS sauf une légère baisse au 32^{ème} jour.

Nous avons observé également 2 vagues de synthèse pour la proanthocyanidine dimère B2 (**Figures 62 et 63**) : une augmentation rapide entre les 4^{ème} et 16^{ème} jours (0,086 à 0,263 g/100 g MS) est suivie par une nette baisse au 20^{ème} jour (0,066 g/100 g MS).

La production réaugmente à partir de ce point pour atteindre un maximum au 24^{ème} jour (0,321 g/100 g MS).

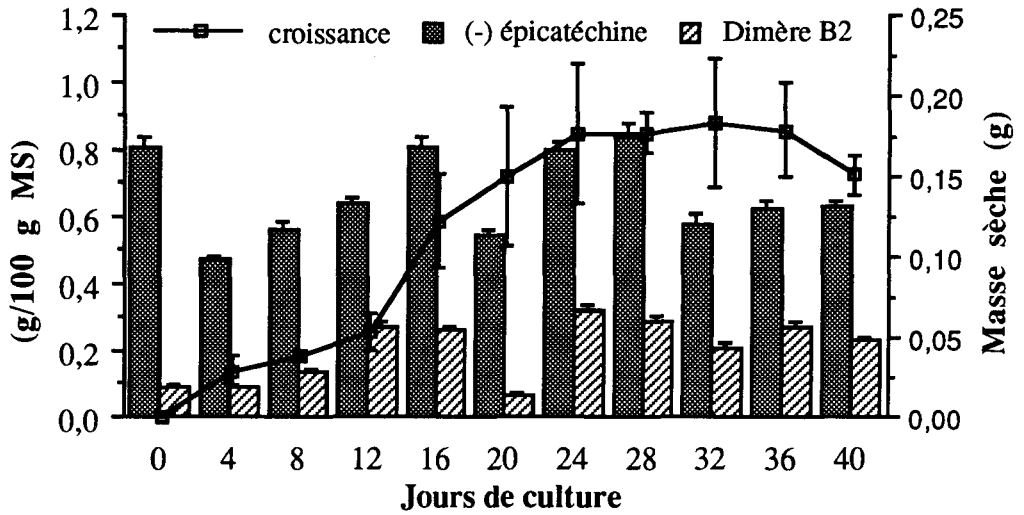


Figure 63 : Teneurs en (-) épicatechine au cours de la croissance d'une colonie tissulaire cultivée pendant 40 jours en lumière continue et à 22°C.

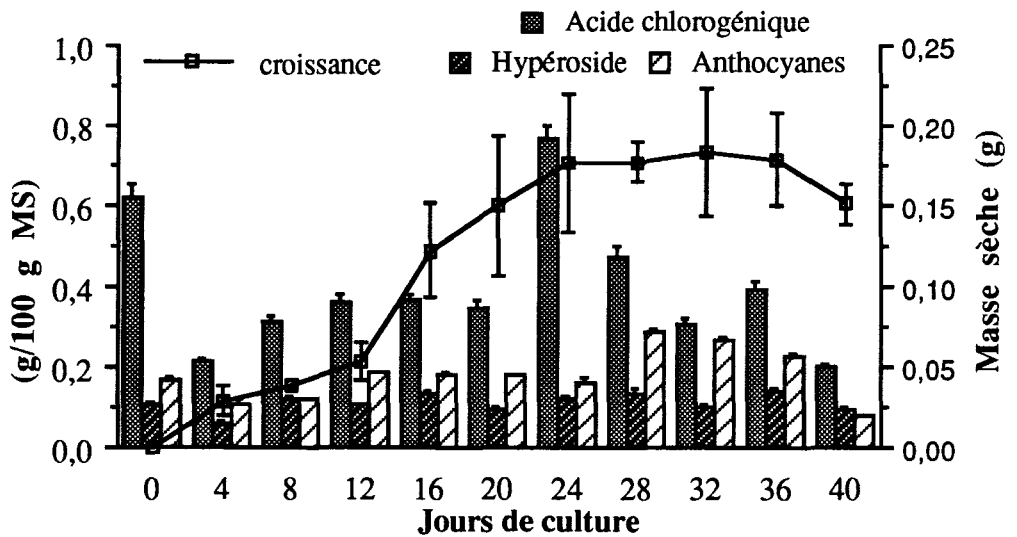


Figure 64 : Teneurs en acide chlorogénique, hypéroside et en anthocyanes au cours de la croissance d'une colonie tissulaire cultivée pendant 40 jours en lumière continue et à 22°C.

1.3 (-) Epicatéchine

La (-) épicatechine évolue parallèlement au dimère B2 et montre une augmentation des teneurs entre le 4^{ème} et le 16^{ème} jour (0,168-0,807) puis une baisse de production est observée au 20^{ème} jour (0,542 g/100 g MS) (**Figure 63**). A partir du 20^{ème} jour la quantité de (-) épicatechine croît pour atteindre un maximum de 0,830 g/100 MS au 28^{ème} jour.

1.4 Acide chlorogénique

L'acide chlorogénique, augmente du 4^{ème} au 24^{ème} jour pour atteindre une teneur de 0,769 g/100 g MS (**Figure 64**). Par la suite la production décroît, avec quelques fluctuations jusqu'au 40^{ème} jour (0,2 g/100 g MS).

1.5 Flavonoïdes

L'hypéroside, quant à lui, varie peu et présente des valeurs relativement constantes situées entre 0,061 et 0,143 g/100 g MS, au cours de la culture (**Figure 64**).

Un autre flavonoïde, l'isoquercitroside, détecté à l'état de traces, a des valeurs qui restent comprises entre 0,020 et 0,030 g/100 g MS.

1.6 Anthocyanes

La quantité d'anthocyanes relativement stable entre le 12^{ème} et le 24^{ème} jour (0,189-0,163 g/100 g MS) augmente pour atteindre un maximum du 28^{ème} au 32^{ème} jour avec respectivement 0,266 et 0,230 g/100 g MS (**Figure 64**).

Conclusions

- ➔ Pour tous les composés étudiés, les teneurs les plus importantes sont observées entre le 24^{ème} et le 32^{ème} jour de culture. Cette période est donc la plus favorable à la production de polyphénols d'autant plus qu'à ce stade la biomasse est importante.
- ➔ Il nous a été par contre, difficile de discerner une période privilégiée de production des dérivés particuliers comme **les oligomères, le dimère B2, la (-) épicatechine** ou **l'hypéroside** qui sont les plus intéressants.
- ➔ On peut se demander si pour certaines substances (proanthocyanidines, (-) épicatechine), il y a vraiment deux phases actives de synthèse séparées par une diminution au 20^{ème} jour où cette valeur faible est due à un accident momentané dans un plateau de production.

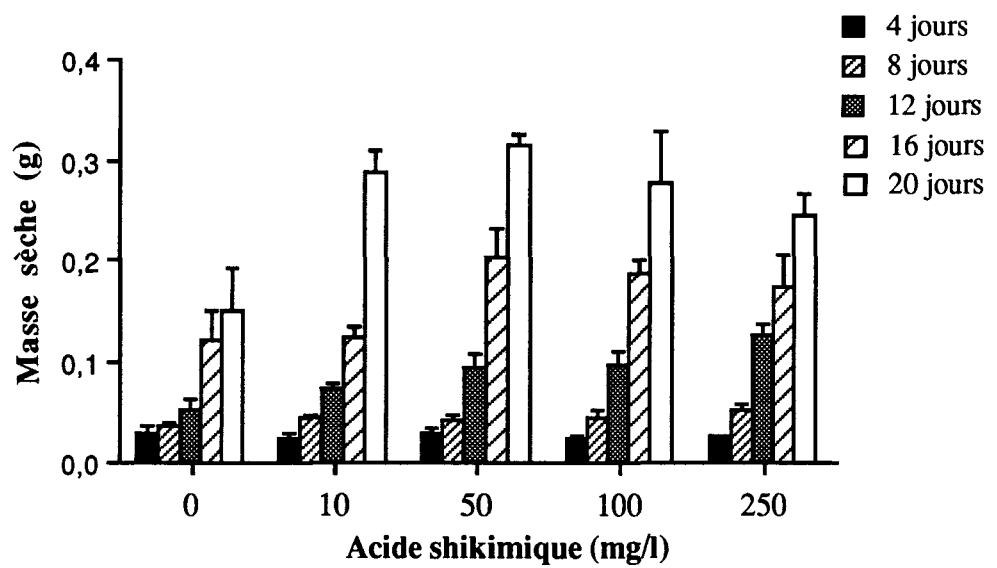


Figure 65 : Effet de l'acide shikimique sur la croissance des colonies tissulaires, cultivées en lumière continue à 22°C, après 4, 8, 12, 16 et 20 jours de culture

2. Action des acides shikimique et gallique sur la production en polyphénols

A partir des colonies tissulaires qui viennent d'être étudiées, nous avons essayé d'**optimiser la production** en composés polyphénoliques.

Une démarche classique consiste à trouver, dans les schémas généraux de la biosynthèse de ces molécules, des précurseurs susceptibles d'être incorporés en augmentant la production des phénols.

Guidés par ces éléments nous avons testé l'efficacité d'un précurseur important du métabolisme des polyphénols, l'**acide shikimique**. Nous avons également incorporé de l'**acide gallique** dans les milieux de culture des colonies tissulaires pour essayer d'induire une production de dérivés galloylés tels que la (-) épicatechine-gallate ou des dimères gallates qui seraient d'après la littérature (Hatano *et al.*, 1989) de meilleurs antioxydants que leurs homologues non galloylés.

Ceci a été le cas pour des colonies tissulaires de Sarrasin où l'incorporation de l'acide gallique dans le milieu de culture a fortement stimulé la production de flavane-3-ols et de proanthocyanidines galloylés (Moumou *et al.*, 1992a).

2.1. Incorporation de l'acide shikimique

2.1.1 Effets sur la croissance

L'étude a été réalisée sur une période de 20 jours de culture avec apport dans le milieu de culture de différentes concentrations d'acide shikimique. La croissance des colonies tissulaires ainsi que la production de polyphénols ont été mesurées tous les quatre jours. L'effet des concentrations d'acide shikimique (0,10, 50, 100, 250 mg.l⁻¹) sur la croissance après 4, 8, 12, 16 et 20 jours de culture est présenté dans la **figure 65**.

L'acide shikimique ne modifie pas notablement la croissance après 4 et 8 jours. A partir du 12^{ème} jour une influence favorable est observée pour pratiquement toutes les concentrations choisies. La croissance optimale est cependant observée en présence de 50 mg.l⁻¹ d'acide shikimique aux 16^{ème} et 20^{ème} jours. Par ailleurs ces résultats montrent que les concentrations plus élevées d'acide shikimique (100 et de 250 mg.l⁻¹) ralentissent la croissance qui reste néanmoins supérieure à celle observée pour les témoins.

2.1.2 Effets sur les polyphénols

En raison du nombre important des données, un tableau récapitulatif (**Tableau 14**) nous a permis de constater que la croissance maximale est toujours atteinte au 20^{ème} jour et que la production optimale des différentes catégories de composés polyphénoliques est

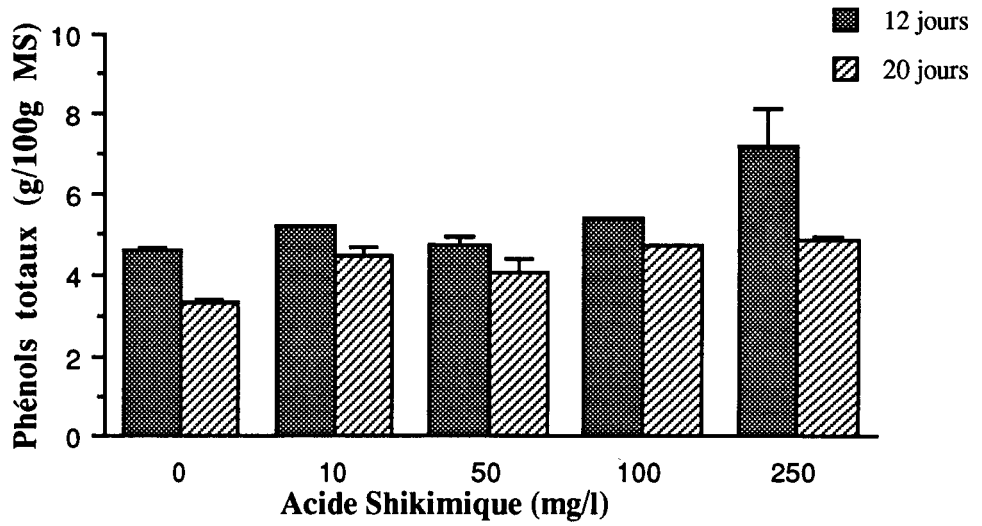


Figure 66 : Effet de l'acide shikimique sur les phénols totaux, produits par des colonies tissulaires cultivées en lumière continue à 22°C, après 12 et 20 jours de culture

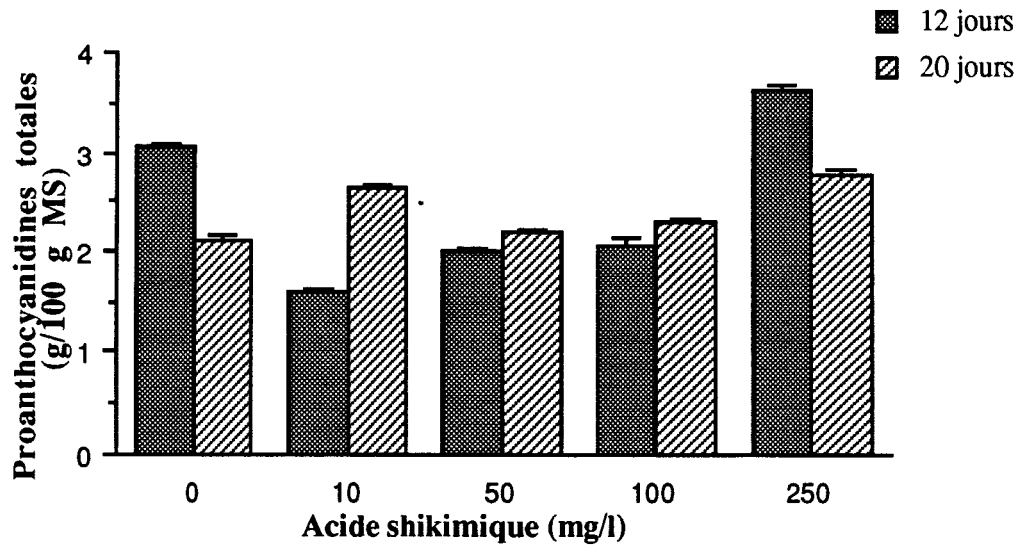


Figure 67 : Effet de l'acide shikimique sur les proanthocyanidines totales, produites par des colonies tissulaires cultivées en lumière continue à 22°C, après 12 et 20 jours de culture

toujours située soit au 12 ème soit au 20 ème jour. Dans certains cas, la production est d'ailleurs corrélée avec le maximum de croissance.

→ Compte tenu de ces observations nous n'avons fait figurer que les observations effectuées après 12 et 20 jours de culture pour simplifier l'expression de nos résultats.

2.1.2.1 Phénols totaux

Les cultures témoins produisent un taux de phénols totaux de 4,61 et 3,32 g/100 g MS respectivement au 12 et 20 ème jour de culture (**Figure 66**). Après **12 jours** une production maximale de phénols (7,22 g/100 g MS) est mesurée en présence de 250 mg.l⁻¹ d'acide shikimique alors que les concentrations inférieures induisent peu de changements. Après **20 jours**, toutes les concentrations d'acide shikimique provoquent de légères augmentations des teneurs par rapport aux cultures témoins.

2.1.2.2 Proanthocyanidines totales

Après **12 jours** de culture, une concentration de 250 mg.l⁻¹ d'acide shikimique induit la production maximale de **proanthocyanidines totales** (3,619 g/100 g MS) (**Figure 67**). Par contre, après **20 jours**, cette dose (250 mg.l⁻¹ : 2,773 g/100 g MS) n'apporte aucun avantage décisif par rapport à une concentration beaucoup plus faible comme celle de 10 mg.l⁻¹ (2,627 g/100 g MS).

2.1.2.3 Proanthocyanidine dimère B2

Si l'on considère la production de la **proanthocyanidine dimère B2** après **12 jours** de culture, elle est assez variable selon les concentrations d'acide shikimique (**Figure 68**) .

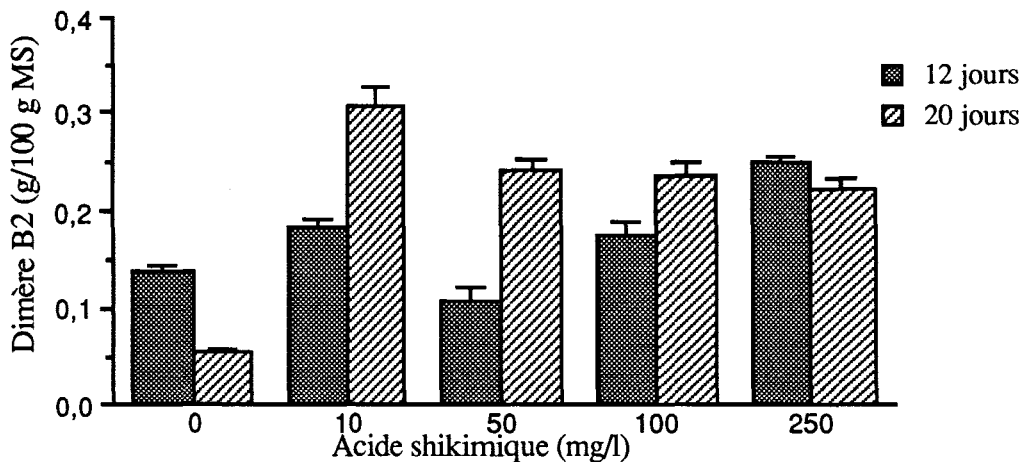


Figure 68 : Effet de l'acide shikimique sur la proanthocyanidine dimère B2, produite dans des colonies tissulaires cultivées en lumière continue à 22°C, après 12 et 20 jours de culture

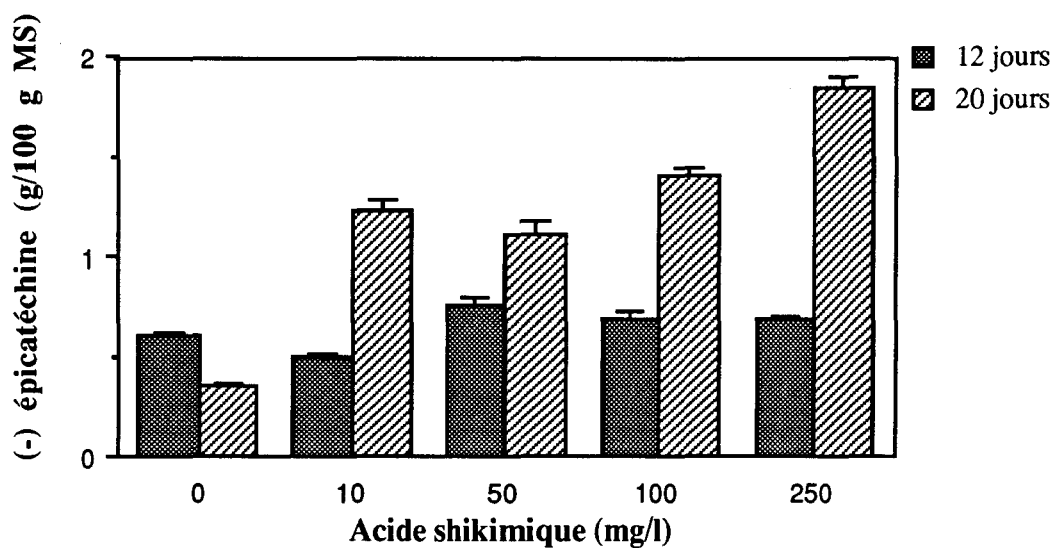


Figure 69 : Effet de l'acide shikimique sur la (-) épicatechine, produite dans des colonies tissulaires cultivées en lumière continue à 22°C, après 12 et 20 jours de culture

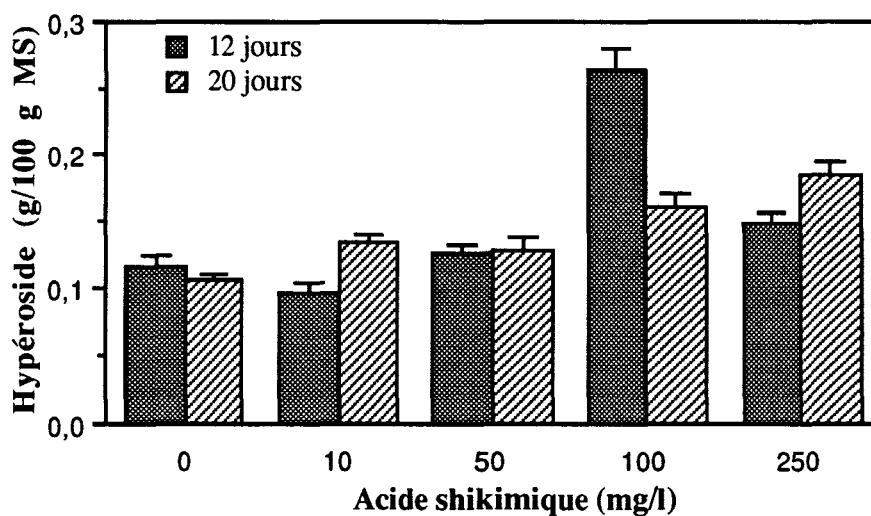


Figure 70 : Effet de l'acide shikimique sur l'hyperoside produit, dans des colonies tissulaires cultivées en lumière continue à 22°C, après 12 et 20 jours de culture

Manifestement, c'est après **20 jours** de culture avec **10 mg.l⁻¹** que la production est meilleure. Nous avons à ce moment une teneur qui est plus de **5,5 fois supérieure** (0,309 g/100 g MS) à celle des cultures témoins (0,055 g/100 g MS). Pour les autres concentrations (10 et 250 mg.l⁻¹) la production est toujours supérieure à celle des cultures témoins (**figure 65**) mais moindre que pour 250 mg.l⁻¹.

La dose de **10 mg.l⁻¹** d'acide shikimique semble la plus intéressante étant donné qu'avec certaines concentrations supérieures (100 et 250 mg.l⁻¹), nous obtenons une biomasse plus faible au 20^{ème} jour (**Figure 65**).

2.1.2.4 Catéchines

Après **12 jours** de culture, on n'observe qu'un effet très limité de l'acide shikimique sur la production de la (-) épicatechine (**Figure 69**).

Après **20 jours** de culture **250 mg.l⁻¹** d'acide shikimique multiplie la production de la (-) épicatechine jusqu'à **plus de 5 fois** (1,846 g/100 g MS) par rapport aux cultures sans précurseurs (0,366 g/100 g MS).

2.1.2.5 Hypéroside

La production obtenue dans des cultures témoins est estimée à 0,116 g/100 g MS après **12 jours** de culture (**Figure 70**).

Pour la même période une dose d'acide shikimique de **100 mg.l⁻¹** se distingue par une production nettement supérieure (0,263 g/100 g MS) alors que les autres doses apportent peu de modifications même après 20 jours de culture.

2.1.2.6 Acide chlorogénique

L'acide shikimique est un des précurseurs des acides hydroxycinnamiques parmi lesquels on trouve l'acide caféique qui en combinaison avec l'acide quinique sont les constituants de l'**acide chlorogénique**. Ce rôle bien connu dans la biosynthèse classique conforte nos résultats expérimentaux.

Après **12 jours** de culture, la production en acide chlorogénique augmente avec les doses d'acide shikimique (**Figure 71**). Un optimum est noté en présence de **250 mg.l⁻¹** d'acide shikimique (0,668 g/100 g MS).

Après **20 jours**, le maximum de production est plus ou moins identique pour toutes les concentrations mais reste inférieur à celui noté précédemment pour 250 mg.l⁻¹ à 12 jours.

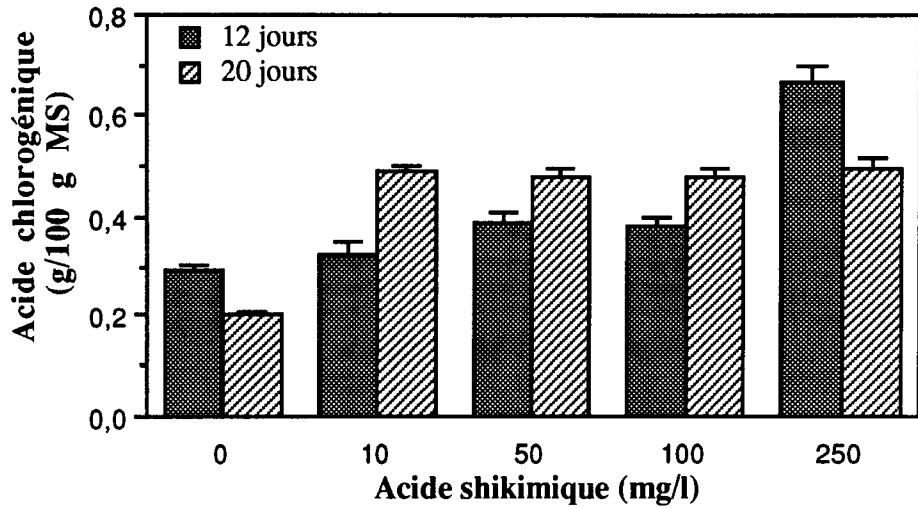


Figure 71 : Effet de l'acide shikimique sur l'acide chlorogénique, produit dans des colonies tissulaires cultivées en lumière continue à 22°C, après 12 et 20 jours de culture

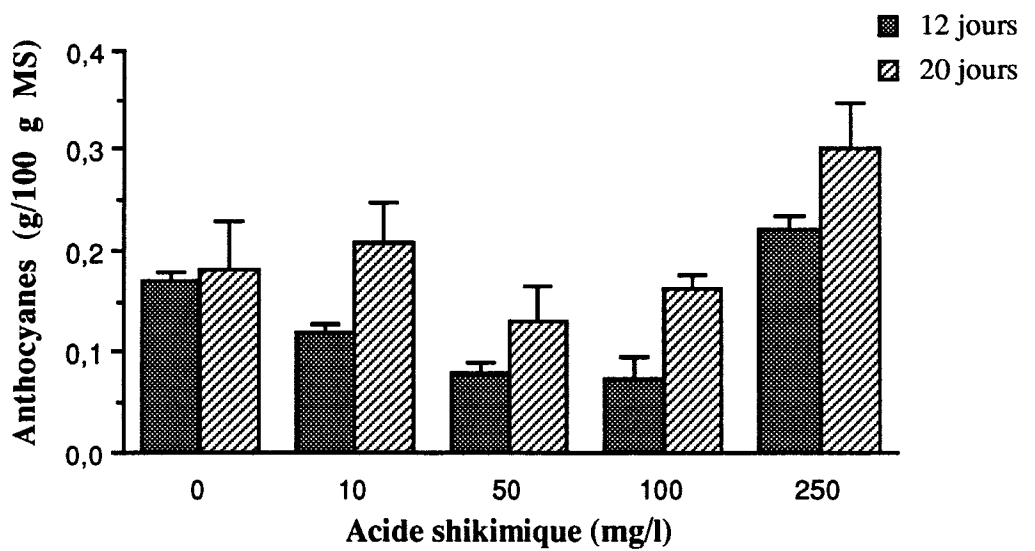


Figure 72 : Effet de l'acide shikimique sur les anthocyanes, produites dans des colonies tissulaires cultivées en lumière continue à 22±2°C, après 12 et 20 jours de culture

2.1.2.7 Anthocyanes

La seule concentration intéressante pour une production importante d'anthocyanes est celle de 250 mg.l⁻¹ (**Figure 72**). A cette dose nous avons observé une augmentation nette par rapport aux cultures témoins après 12 et 20 jours de culture (0,220 et 0,302 mg/100 g MS).

2.2. Incorporation de l'acide gallique

2.2.1 Effets sur la croissance

Le même protocole d'étude que celui utilisé pour l'acide shikimique a été employé (doses et intervalles de prélèvements). Dans ces conditions l'acide gallique ne stimule pas la croissance des colonies tissulaires et présente une toxicité importante pour les cellules à une concentration de 250 mg.l⁻¹ dont on perçoit les effets sous forme de brunissement et de début de nécrose dès 100 mg.l⁻¹.

Ce phénomène est analogue à celui observé par Moumou *et al.*, (1992a) sur les colonies de Sarrasin cultivées en présence de doses plus importantes (jusqu'à 500 mg.l⁻¹). Il apparaît ici que les doses utilisables et compatibles avec une croissance sont de 10 mg.l⁻¹ et de 50 mg.l⁻¹. La **Figure 73** compare les croissances des colonies tissulaires après 4, 8, 12, 16 et 20 jours de culture en présence des différentes concentrations d'acide gallique.

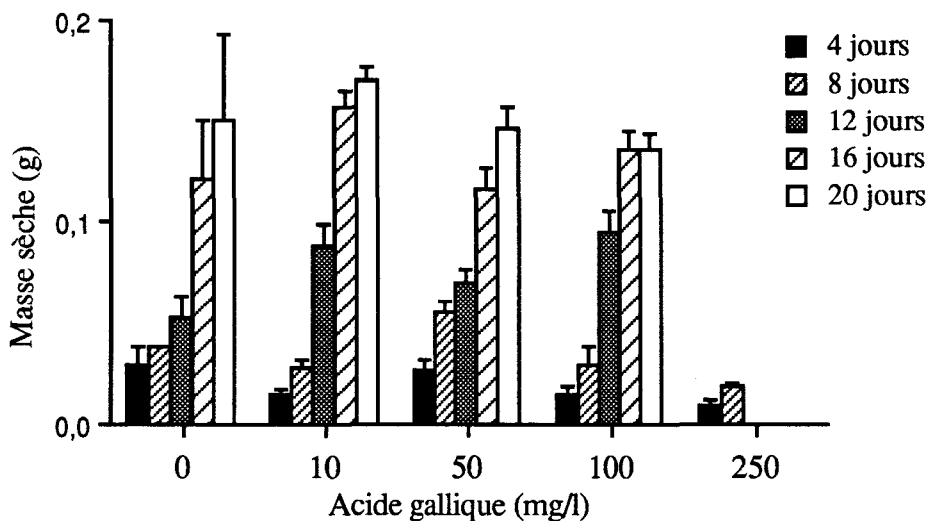


Figure 73 : Effet de l'acide gallique sur la croissance des colonies tissulaires, cultivées en lumière continue à 22°C, après 4, 8, 12, 16, et 20 jours de culture

2.2.2 Effets sur les polyphénols

Après examen de l'ensemble des effets de l'acide gallique sur les différentes catégories de phénols, il apparaît nettement que les teneurs obtenues sont le plus souvent égales ou

	Acide shikimique (mg. l ⁻¹)	Nombre de jours de culture	Polyphénols (g/100 g MS)	Production par rapport aux cultures témoins*
Phénols totaux	250	12	7,22	157
Proanthocyanidines totales	250	12	3,62	119
Dimère B2	10	20	0,31	127
(-) Epicatéchine	250	20	1,85	500
Hypéroside	100	12	0,26	227
Acide chlorogénique	250	12	0,67	229
Anthocyanes	250	20	0,30	166

Tableau 14 : Effets optimaux de l'apport d'acide shikimique sur la production en phénols de colonies tissulaires cultivées à la lumière continue et à 22±2°C. Les valeurs en polyphénols sont les productions maximales données avec le jour correspondant de la période de subculture et la dose correspondante en acide shikimique. Nous avons également calculé le pourcentage de production par rapport aux cultures témoins.(* cultures témoins =100%).

inférieures à celles du témoin et que les seuls cas d'augmentation des teneurs (dimère B2, (-) épicatechine et acide chlorogénique par exemple) sont observées dans des tissus sénescents.

Conclusions

- L'acide shikimique **augmente** nettement la **croissance** des colonies tissulaires, l'optimum étant observé pour 50 mg.l⁻¹. Cette augmentation de la biomasse est observée dès le 8^{ème} jour de culture.
- **Toutes les catégories de phénols** sont stimulées en présence de l'**acide shikimique**. En fonction des données recueillies sur la croissance et la production maximale de polyphénols, la dose de **250 mg.l⁻¹** d'acide shikimique est certainement la meilleure. Mais en raison du coût de cette substance (ce qui n'aurait pas été le cas si l'acide gallique avait été efficace), on peut considérer que la dose de **10 mg.l⁻¹** d'acide shikimique est suffisante pour obtenir une bonne production en **proanthocyanidines totales**, en **dimère B2** et en (-) **épicatechine**, qui rappelons le, sont les substances les plus actives.
- L'**acide gallique** a un effet néfaste sur la **croissance** des colonies tissulaires sauf à **10 et 50 mg.l⁻¹**; toutes les doses supérieures induisant une nécrose.
- Dans le cas de l'incorporation de l'acide gallique, des hausses apparentes de production en **proanthocyanidine dimère B2**, en (-) **épicatechine** et en **acide chlorogénique** se produisent en réalité dans des tissus en cours de nécrose. Ces résultats sont très différents de ceux obtenus par nous et par Moumou *et al.*, (1992a) dans des colonies tissulaires de Sarrasin.
- De plus notre espoir d'une possible galloylation des composés polyphénoliques notamment la (-) épicatechine et le dimère B2 ne s'est pas confirmé ; aucun gallate n'a été décelé, alors que les colonies tissulaires de Sarrasin citées ci-dessus avaient réagi positivement.

Nous avons résumé dans le **tableau 14** les effets les plus intéressants des différents apports d'acide shikimique sur la production en polyphénols des colonies tissulaires. Nous avons fait figurer les concentrations en acide shikimique et le temps de culture correspondant à la production optimale des polyphénols. Ces valeurs sont ensuite exprimées en pourcentage par rapport aux colonies tissulaires témoins cultivées pendant les mêmes périodes mais sans acide shikimique.

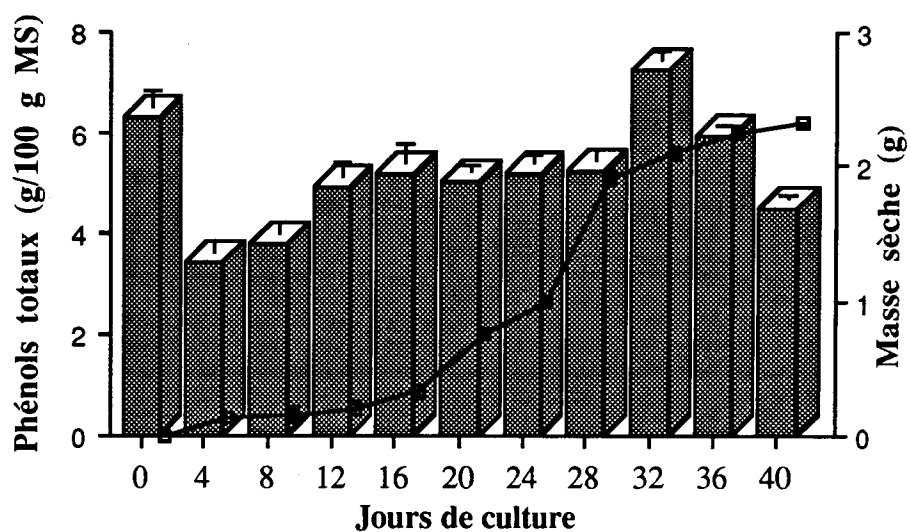


Figure 74 : Teneurs en phénols totaux au cours de la croissance des suspensions cellulaires cultivées pendant 40 jours en lumière continue et à 22°C.

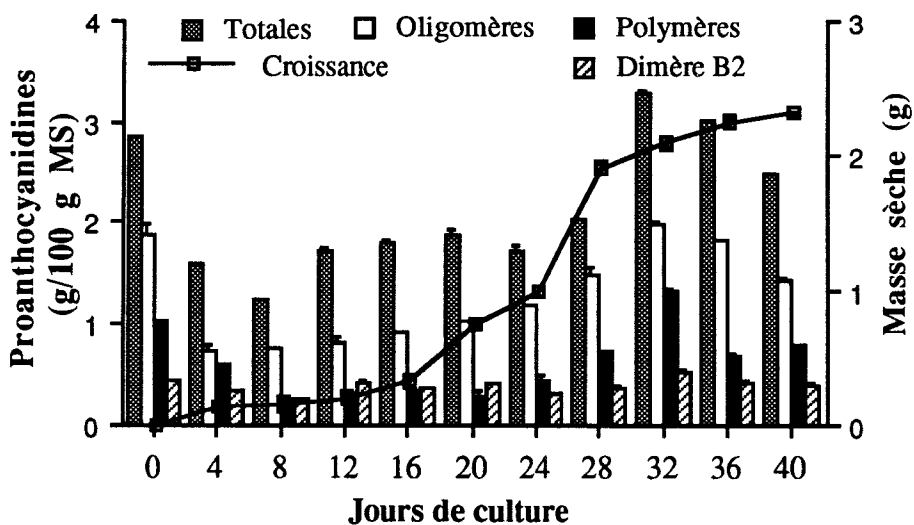


Figure 75 : Teneurs en proanthocyanidines totales, oligomères, polymères et du dimère B2 au cours de la croissance des suspensions cellulaires cultivées pendant 40 jours de culture en lumière continue et à 22°C.

IV. ETUDE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

1. Mise en place

Des suspensions cellulaires ont été initiées à partir des colonies tissulaires d'ovaires[®] en milieu liquide agité sous un éclairage continu à 22°C. Pour cela nous avons utilisé des milieux de même composition que ceux mis au point pour l'entretien des colonies tissulaires (**Tableau 11, cf. Matériel et méthodes**). Les cellules, jaunes au départ de la culture, rougissent légèrement en fin de chaque subculture (30 jours) (**Planche 4B en annexe**).

Les suspensions cellulaires, initiées à partir de colonies tissulaires d'ovaires[®] et âgées de 6 mois, ont d'abord été analysées en chromatographie sur couche mince et CLHP, pour déterminer la nature des différentes catégories de substances présentes.

Sur le plan qualitatif on retrouve la plupart des composés présents dans les colonies tissulaires, c'est à dire les **proanthocyanidines, l'acide chlorogénique, la (-) épicatechine, les anthocyanes**, ainsi que **des dérivés triterpéniques**. Toutefois ni la chromatographie sur couche mince, ni les analyses en CLHP n'ont permis de mettre en évidence l'hypéroside qui était présent dans les colonies tissulaires. A la suite de cette étude qualitative préliminaire nous nous sommes proposés de réaliser une analyse cinétique identique à celle effectuée sur les colonies tissulaires.

2. Evolution des polyphénols au cours d'une subculture de 40 jours

Les suspensions cellulaires ont été analysées à des intervalles de 4 jours sur une période de 40 jours.

2.1 Phénols totaux

Au début de la culture, nous avons noté une augmentation **des phénols totaux** entre le 4^{ème} et le 16^{ème} jour de culture (3,422-5,212 g/100 g MS) (**Figure 74**). La teneur se stabilise pour atteindre un plateau entre le 16^{ème} et le 28^{ème} jour. Au 32^{ème} jour de culture on observe ensuite une nette augmentation (7,258 g/100 g MS) qui coïncide avec la fin de la phase exponentielle de croissance. Les teneurs en phénols totaux diminuent ensuite.

2.2 Proanthocyanidines

Les proanthocyanidines (**Figure 75**) évoluent pratiquement de la même manière. La production optimale est atteinte vers le 32^{ème} jour de culture pour les **proanthocyanidines totales** (3,292 g/100 g MS), les **proanthocyanidines oligomères** (1,982 g/100 g MS) et **polymères** (1,320 g/100 g MS).

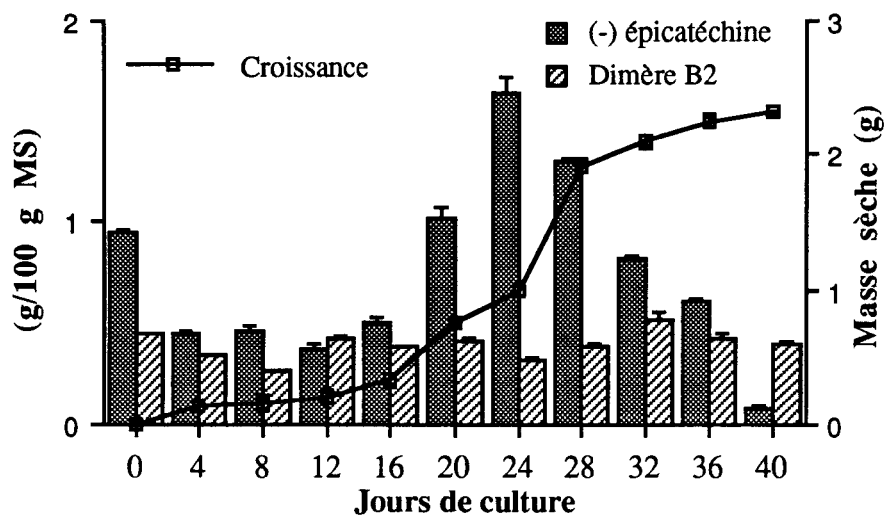


Figure 76 : Teneurs en (-) épicatechine et du dimère B2 au cours de la croissance des suspensions cellulaires cultivées pendant 40 jours de culture en lumière continue et à 22°C.

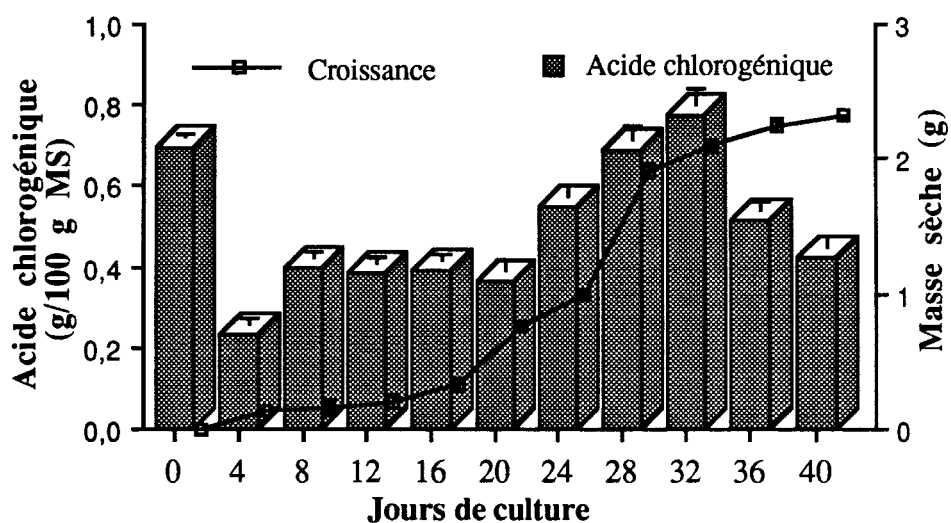


Figure 77 : Teneurs en acide chlorogénique au cours de la croissance des suspensions cellulaires cultivées pendant 40 jours de culture en lumière continue et à 22°C.

Ici encore, comme pour les colonies tissulaires (**Figures 61 et 62**), un nouveau parallélisme est observé entre la production de proanthocyanidines totales et les phénols totaux.

La quantité de **proanthocyanidine dimère B2** reste relativement constante pendant les 40 jours de la culture avec toutefois une légère augmentation au 32^{ème} jour avec 0,553 g/100 g MS.

2.3 (-) Epicatéchine

La teneur en (-) **épicatéchine** reste assez stable jusqu'au 16^{ème} jour de culture et présente une hausse très importante entre le 20^{ème} et le 28^{ème} jour, avec un pic au 24^{ème} jour de culture (1,641 g/100 g MS) (**Figure 76**). Contrairement aux résultats obtenus avec les colonies tissulaires, nous n'avons pas trouvé de parallélisme entre la production de la (-) épicatéchine et celle du dimère B2.

2.4 Acide chlorogénique

La teneur en **acide chlorogénique** (**Figure 77**) marque un palier du 8^{ème} jusqu'au 20^{ème} jour de culture et une production plus active est observée entre le 24^{ème} et le 32^{ème} jour, ce dernier correspondant à la teneur maximale de 0,778 g/100 g MS.

2.5 Anthocyanes

La production d'anthocyanes est très irrégulière au début de la culture. Les valeurs les plus importantes se situent en fin de culture (entre le 32^{ème} et le 36^{ème} jour), où une production maximale de 0,153 g/100 g MS est atteinte (**Figure 78**).

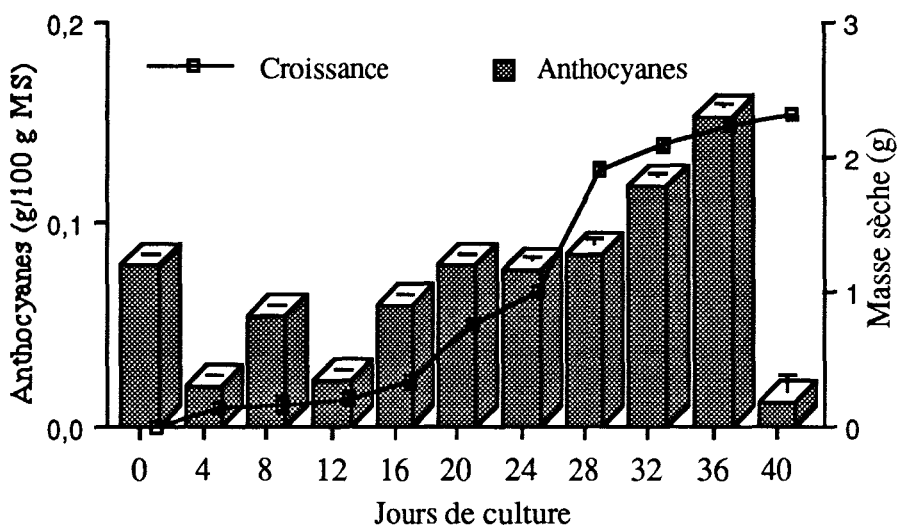


Figure 78 : Teneurs en anthocyanes au cours de la croissance des suspensions cellulaires cultivées pendant 40 jours de culture en lumière continue et à 22°C.

Conclusions

Cette étude cinétique des suspensions cellulaires nous fournit des informations analogues à celles obtenues à partir de colonies tissulaires.

- ➔ La majorité des composés polyphénoliques présentent une production **maximale** vers la fin de la **phase exponentielle de croissance** entre le 24^{ème} et le 36^{ème} jour de culture. Cette période serait donc la plus favorable pour effectuer des prélèvements. Un pic de production se situe fréquemment au **32^{ème} jour** de culture et concerne les **phénols totaux, les proanthocyanidines totales, les oligomères, les polymères, le dimère B2 et l'acide chlorogénique**.
Les teneurs maximales de (-) **épicatéchine** et **d'anthocyanes** sont observées respectivement au **24^{ème}** et **36^{ème}** jour de culture.
- ➔ Nous n'avons au cours de cette étude trouvé aucun parallélisme entre la production de (-) épicatéchine et celle du dimère B2 ; cette observation est **la première** dans le cours de nos essais **qui dissocie les périodes de productions optimales de ces deux dérivés**.

Polyphénols	Suspensions cellulaires		Colonies tissulaires	
	Production maximale (g/100 g MS)	Production moyenne (g/100 g MS)	Production maximale (g/100 g MS)	Production moyenne (g/100 g MS)
Phénols totaux	7,258 (j32)	5,062	5,890 (j28)	4,216
Proanthocyanidines totales	3,292 (j32)	2,082	2,959 (j32)	2,347
Proanthocyanidines oligomères	1,982 (j32)	1,222	1,227 (j28)	0,982
Proanthocyanidines polymères	1,320 (j32)	0,687	1,727 (j32)	1,195
Dimère B2	0,523 (j32)	0,385	0,321 (j24)	0,214
Epicatéchine	1,641 (j24)	0,727	0,799 (j24)	0,649
Acide chlorogénique	0,778(j32)	0,472	0,769 (j24)	0,375
Anthocyanes	0,153 (j36)	0,073	0,288 (j24)	0,180
Hypéroside	non détecté	non détecté	0,143 (j36)	0,111

Tableau 15 : Teneurs des composés polyphénoliques dans les suspensions cellulaires et les colonies tissulaires. Dans chaque cas, on exprime
- la teneur maximale : avec entre parenthèses le jour correspondant
- la teneur moyenne de toutes les mesures effectuées au cours de la période de 40 jours

V. COMPARAISON ENTRE SUSPENSIONS CELLULAIRES ET COLONIES TISSULAIRES

A la lumière des résultats précédents, il nous a paru intéressant de comparer les cinétiques de croissance et de production de polyphénols obtenus à partir des colonies tissulaires et des suspensions cellulaires.

La première différence nette est la plus forte production de **biomasse** par les suspensions cellulaires. Nous avons comparé dans la **figure 79** l'évolution de la masse sèche des colonies tissulaires et des suspensions cellulaires au cours de 40 jours de culture.

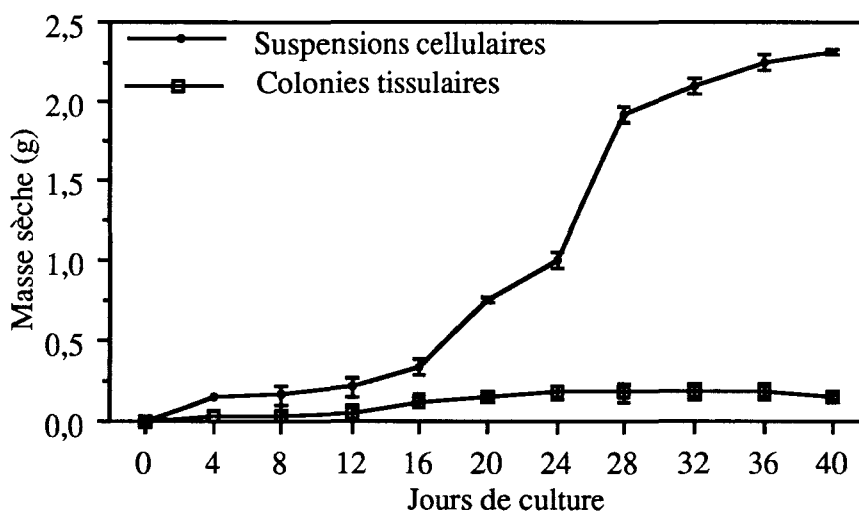


Figure 79 : Comparaison entre la croissance des colonies tissulaires et des suspensions cellulaires sur une période de 40 jours en lumière continue à 22°C.

A titre d'indication la masse sèche des colonies tissulaires n'est que de l'ordre de 0,184 g entre le 24^{ème} et le 32^{ème} jour. Pour les suspensions cellulaires durant la même période cette hausse est de 2,1 g, soit **12 fois plus**.

Si nous considérons les teneurs moyennes en **phénols** calculées sur la période de 40 jours de culture (**tableau 15**) nous pouvons donner les conclusions suivantes :

- Les **suspensions cellulaires** produisent globalement **plus de phénols** que les **colonies tissulaires** avec une teneur moyenne de **5,06 g/100 g MS** contre **4,21 g**.

➔ Dans les **suspensions cellulaires** la teneur moyenne en **proanthocyanidines totales** est plus basse (**2,08 g** : suspensions cellulaires et **2,347 g** : colonies tissulaires).

Celle des **polymères** des suspensions cellulaires représentent pratiquement la moitié de celle des colonies tissulaires (**0,687 g** : suspensions cellulaires et **1,195 g** : colonies tissulaires). Par contre la production **d'oligomères/100 g MS** est **supérieure** dans les suspensions cellulaires à celle des colonies tissulaires (**1,222 g** : suspensions cellulaires et **0,982 g** : colonies tissulaires) et cette tendance est confirmée pour la teneur en **proanthocyanidine B2** qui passe de **0,214 g** pour les colonies tissulaires à **0,385 g** pour les suspensions cellulaires.

➔ La production **d'épicatéchine** et **d'acide chlorogénique** est **légèrement plus élevée** dans les suspensions cellulaires.

➔ **Les anthocyanes** sont beaucoup moins abondants (**0,073 g** : suspensions cellulaires et **0,180 g** : colonies tissulaires) et **l'hypéroside** n'a pu être détecté.

C. CONCLUSIONS COMPARATIVES SUR LES CARACTERISTIQUES DU BOUTON FLORAL *IN VIVO*, DES COLONIES TISSULAIRES ET DES SUSPENSIONS CELLULAIRES *IN VITRO*

Après l'étude de la composition chimique de l'Aubépine *in vivo* et *in vitro*, nous pouvons, en guise de conclusion à ces deux volets, comparer les résultats de l'analyse du bouton floral *in vivo* à ceux des cultures cellulaires *in vitro* qui en dérivent : colonies tissulaires et suspensions cellulaires.

- De par sa complexité, le bouton floral constitue le tissu le plus riche en **phénols totaux** avec 9,97 g/100 g MS. Les suspensions cellulaires en produisent 7,26 g après 32 jours de culture tandis que les teneurs maximales dans les colonies tissulaires se situent autour de 5,9 g/100 g MS après 28 jours de culture.
- Le bouton floral est également le tissu contenant le plus de **proanthocyanidines totales** (4,03 g/100 g MS) et de **polymères** (2,48 g/100 g MS) par rapport aux suspensions cellulaires (totales : 3,29 g ; polymères : 1,32 g) et colonies tissulaires (totales 2,96 g ; polymères 1,73 g).
- Par contre les **oligomères de proanthocyanidines** sont plus abondants dans les **suspensions cellulaires** (1,98 g/100 g MS) que dans l'organe d'origine *in vivo* (1,49 g /100 g MS). La production dans les colonies tissulaires est moindre avec 1,23 g /100 g MS.
- De même nous avons une meilleure teneur en **dimère B2** dans les **suspensions cellulaires** après 32 jours de culture (0,52 g /100 g MS). Nous remarquons que les valeurs du bouton floral (0,34 g/100 g MS) et des colonies tissulaires (0,32 g /100 g MS après 24 jours de culture) sont voisines entre elles et moins élevées que celles des suspensions cellulaires.
- Des productions plus intéressantes en (-) **épicatéchine** ont également été notées dans les **suspensions cellulaires** cultivées après 32 jours (1,64 g/100 g MS). Le bouton floral et les colonies tissulaires sont plus pauvres avec respectivement 1,31 et 0,84 g/100 g MS
- La différence la plus nette entre l'organe *in vivo* et les cultures *in vitro* se situe au niveau des **dérivés flavonoïdiques**. En effet, *in vitro*, l'**hypéroside** et l'**isoquercitroside** (traces) sont les seuls flavonosides identifiés dans les

Composés polyphénoliques	Polyphénols (g/100 g MS)				
	Bouton floral initial	Colonies tissulaires		Suspensions cellulaires	
	Production	Production	Nombre de jours de culture	Production	Nombre de jours de culture
Phénols totaux	9,97	5,89	28	7,26	32
Proanthocyanidines					
- Totales	4,03	2,96	32	3,29	32
- Polymères	2,48	1,73	32	1,32	32
- Oligomères	1,49	1,23	28	1,98	32
- Dimère B2	0,34	0,32	24	0,52	32
(-) épicatechine	1,31	0,84	28	1,64	24
Flavonoïdes					
- Totaux	1,03	nd	-	0	-
- Hypéroside	0,73	0,14	36	0	-
- Vitexine-2''-O-rhamnoside	0,25	0	-	0	-
- Isoquercitroside	0,02	0,02	36	0	-
Acide chlorogénique	1,62	0,77	24	0,78	32
Anthocyanes	0	0,180	28	0,073	36

Tableau 16 : Production de polyphénols dans les colonies tissulaires et les suspensions cellulaires issues du bouton floral.

Nous avons pris en considération la période de culture correspondant à la production optimale exprimée en g pour 100 g de matière sèche, (nd = non déterminé)

colonies tissulaires et ils sont absents des suspensions cellulaires. Par contre, *in vivo*, le profil flavonoïdique, beaucoup plus complexe du **bouton floral**, inclut des quantités élevées en **hypéroside**, **vitexine-2"-O-rhamnoside**, **isoquercitroside** et d'autres flavonoïdes mineurs comme le **spiraeoside**.

- ➔ Le **bouton floral** montre une proportion plus élevée d'**hypéroside** (0,73 g/100 g MS) que les colonies tissulaires cultivées après 36 jours (0,14 g/100 g MS).
- ➔ La teneur en **isoquercitroside** dans le bouton floral et les **colonies tissulaires** est comparable avec des valeurs de 0,02 g/100 g MS.
- ➔ La production d'**acide chlorogénique** reste meilleure dans le **bouton floral** (1,62 g/100 g MS). Des quantités inférieures ont été observées dans les suspensions cellulaires (0,78 g /100 g MS après 32 jours de culture) et les colonies tissulaires (0,77 g /100 g MS après 24 jours de culture).
- ➔ Les **anthocyanes** semblent être l'originalité de nos cultures cellulaires et plus particulièrement des **colonies tissulaires**, qui contiennent une quantité plus importante (0,29 g/100 g MS après 28 jours de culture) que les suspensions cellulaires (0,073 g/100 g MS après 36 jour de culture). **Aucune** identification visuelle ou chromatographique **n'a permis de mettre en évidence des anthocyanes dans le bouton floral**.

On peut néanmoins remarquer que les pétales épanouis présentent parfois sur l'arbuste une légère nuance rosée chez *Crataegus monogyna* et qu'il existe des variétés d'ornement à pétales roses.

En résumé, comme le montre le **tableau 16**, nous pouvons dire que les teneurs en composés les plus actifs comme les **oligomères de proanthocyanidines**, le dérivé **dimère B2** et la (-) **épicatéchine** ont augmenté *in vitro* par rapport à l'organe correspondant *in vivo* et que nous avons en plus induit une **production d'anthocyanes** qui semblent conserver ici, comme chez les tissus de Sarrasin *in vitro*, l'intérêt d'être un marqueur visuel de synthèse des autres polyphénols. Les cultures cellulaires et plus particulièrement la suspension cellulaire utilisée représentent donc une source privilégiée pour la production de biomolécules actives d'autant plus que pour certaines d'entre elles les teneurs approchent ou dépassent celle de l'organe d'origine.

D. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES POLYPHENOLS *IN VIVO* ET *IN VITRO*

L'Aubépine est connue pour sa richesse en polyphénols surtout reflétée dans la littérature par l'étude de la composition en flavonoïdes et à un degré moindre par des études sur les flavane-3-ols.

En confirmant la richesse des tissus d'Aubépine monogyne *in vivo*, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à des catégories de polyphénols (catéchines, proanthocyanidines, flavonoïdes et acide phénols) connues pour leurs propriétés pharmacologiques et biologiques. Un nombre croissant de publications signalent des effets antioxydants et antiradicalaires de ces composés chez les végétaux dont l'intensité de l'action varie d'ailleurs selon la nature des molécules ainsi que selon le système expérimental utilisé.

La composition phénolique des organes d'Aubépine *in vivo* est très complexe. Cette complexité se retrouve dans la plante sèche destinée aux tisanes tout comme dans les préparations pharmaceutiques commerciales contenant de l'Aubépine sèche ou fraîche.

Les analyses des cultures cellulaires obtenues *in vitro* montrent une production importante en polyphénols pouvant égaler celle de certains organes d'origine. Cependant le profil analytique qualitatif est moins complexe que dans les tissus correspondants *in vivo*, avec une prédominance nette pour les dérivés de flavanols.

Pour ces diverses raisons, un premier objectif était de tenter de mettre en évidence des propriétés antioxydantes dans les extraits de plante fraîche, de cultures cellulaires, de préparations Pharmaceutiques et de rapporter les activités éventuelles aux teneurs en composés phénoliques totaux, fractionnés ou individuels et aux types de structures impliquées (flavonoïdes, flavanols...).

Un autre objectif de notre démarche concernant les extraits d'Aubépine *in vivo* était de définir la **période** appropriée pour la récolte en fonction de la composition en substances actives des **organes** prélevés et plus particulièrement ici par rapport aux activités antioxydantes.

Pour démontrer les potentialités antioxydantes nous avons effectué des mesures :

- de l'activité antilipoperoxydante
- de piégeage des espèces réactives de l'oxygène :
 - de l'anion superoxyde
 - du peroxyde d'hydrogène
 - de l'acide hypochloreux

A chaque fois, nous avons adopté le plan suivant afin de préciser le mieux possible les relations "**teneurs-activités**" et "**structures-activités**". Nous avons dans un premier temps déterminé les pouvoirs antioxydants de molécules standards soit majoritairement

présentes dans les tissus d'Aubépine, soit faisant référence en thérapeutique. Dans un second temps, les extraits ont été testés ("extraits totaux" ou "phases totales", "phases acétate d'éthyle", et "phases aqueuses résiduelles").

I. AUBÉPINE *IN VIVO* - matériel frais

1. Activité antilipoperoxydante

1.1 Polyphénols de référence

Les principaux composés détectés dans les extraits sont la (-) épicatechine, la proanthocyanidine dimère B2, l'acide chlorogénique, la vitexine-2''-O-rhamnoside et l'hypéroside. C'est pourquoi nous avons d'abord évalué les concentrations inhibitrices (CI₅₀), de ces substances qui proviennent toutes du commerce sauf le dimère B2 (**Tableau 17**). Nous y avons ajouté la rutine qui, bien qu'absente de nos extraits, constitue en quelque sorte une molécule de référence d'emploi thérapeutique parmi les flavonoïdes.

Les composés individuels les plus actifs, caractérisés par des concentrations inhibitrices (CI₅₀) plus faibles, appartiennent à la catégorie des flavanols : la proanthocyanidine dimère B2 (CI₅₀ = 2,96 x 10⁻⁶ M) et la (-) épicatechine (CI₅₀ = 6,74 x 10⁻⁶ M).

Dans le cas des flavonoïdes, le potentiel antioxydant est meilleur pour l'hypéroside (CI₅₀ = 32 x 10⁻⁶ M) que pour la vitexine-2''-O-rhamnoside (124 x 10⁻⁶ M), la rutine étant peu active.

Dans ce système d'étude, l'acide chlorogénique a également une activité faible.

En général le pouvoir antilipoperoxydant des flavonoïdes reste nettement moins élevé que celui des flavanols.

	PHENOLS TESTES	CI ₅₀ (10 ⁻³ g.l ⁻¹)	CI ₅₀ (10 ⁻⁶ M)
Flavanols	(-) Epicatechine	1,96±0,0165	6,74±0,56
	Dimère B2	1,714±0,098	2,96±0,016
Acide phénol	Acide Chlorogénique	24,74±0,008	69,88±0,22
Flavonoïdes	Vitexine-2''-O-rhamnoside	72,54±0,011	124,00±1,88
	Hypéroside	14,72±0,003	32,00±6,52
	Rutine	44,66±4,81	73,21±7,88

Tableau 17 : Concentrations inhibitrices (CI₅₀) des substances de référence (Extrasynthèse, France) correspondant aux dérivés individuels majoritaires dans l'aubépine *in vivo*, mesurées dans le système antilipoperoxydant.

1.2 Extraits totaux

Les figures 80 et 81 et le tableau 18 montrent la relation entre la teneur en phénols totaux et les activités antioxydantes dans les organes végétatifs (F1-F6) et reproducteurs (A-D) de l'Aubépine. Nous avons observé une corrélation directe entre la composition phénolique globale et les activités des extraits provenant de feuilles à différents stades, de fleurs et de fruits. Les **feuilles F2 et F3**, le **bouton floral** ainsi que les **fruits verts** sont les plus actifs avec respectivement 79%, 76%, 91% et 75% d'inhibition de la formation de malondialdéhyde.

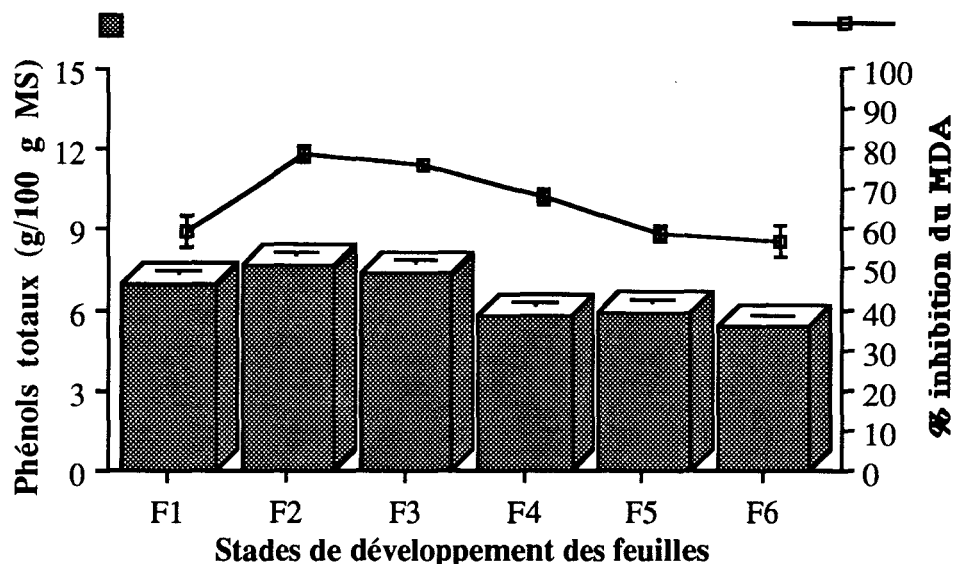


Figure 80 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits totaux des feuilles (F1-F6) et activités antioxydantes exprimées en pourcentage d'inhibition du malondialdéhyde (MDA)

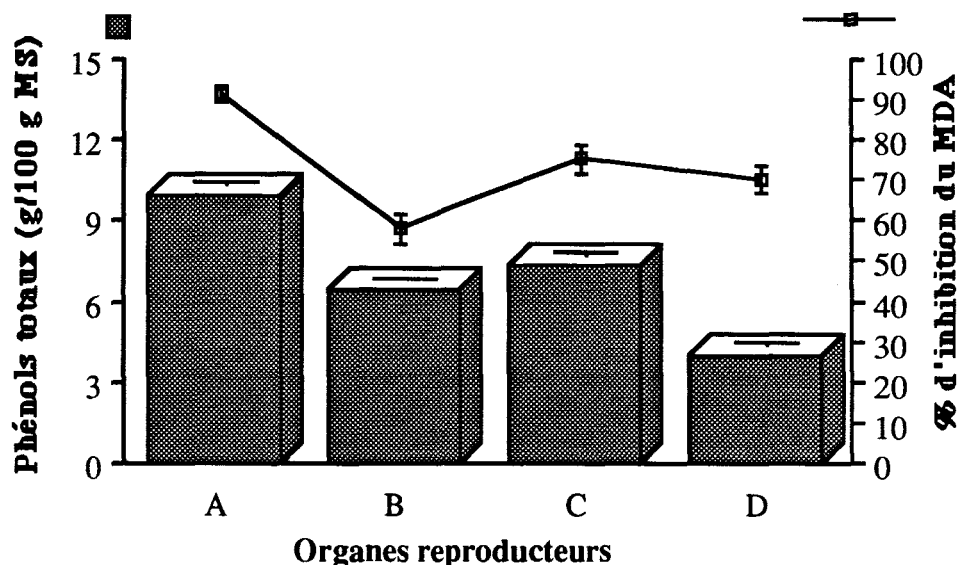


Figure 81 : Teneurs en phénols totaux dans les extraits totaux d'organes reproducteurs (A = bouton floral, B = fleur épanouie, C = fruit vert, D = fruit rouge) et activités antioxydantes exprimées en pourcentage d'inhibition du malondialdéhyde (MDA)

Les figures 82 et 83 et le tableau 18 comparent les activités antiliperoxydantes avec les teneurs en : proanthocyanidines totales, flavonoïdes totaux, (-) épicatechine, dimère B2, acide chlorogénique dans les mêmes organes végétatifs et reproducteurs.

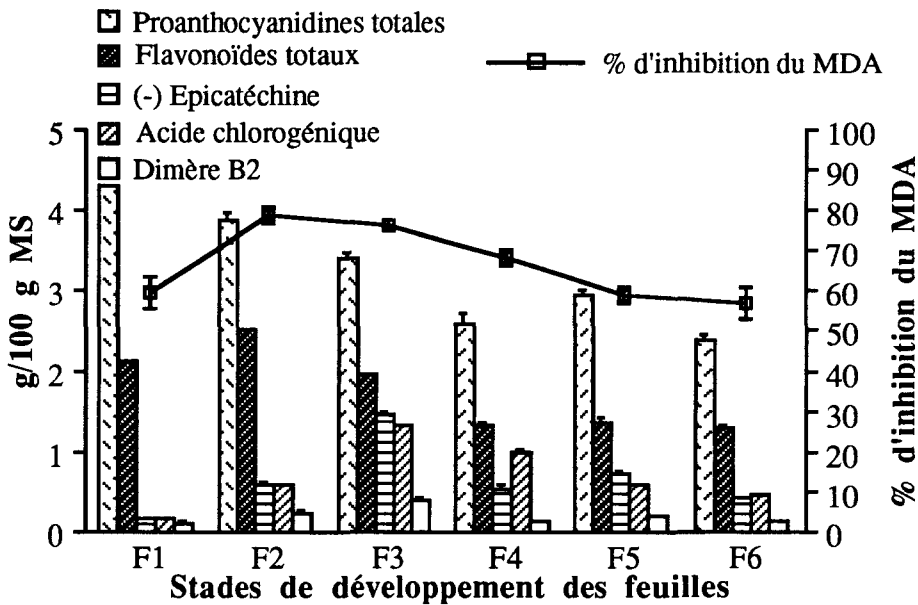


Figure 82 : Teneurs en polyphénols : proanthocyanidines totales, flavonoïdes totaux, (-) épicatechine, acide chlorogénique et dimère B2 dans les extraits totaux de feuilles (F1-F6) et activités antioxydantes exprimées en pourcentage d'inhibition du malondialdéhyde (MDA)

■ Dans les extraits totaux de feuilles, les composés dont les teneurs semblent le mieux correspondre aux activités antioxydantes sont les flavonoïdes totaux (Figure 82).

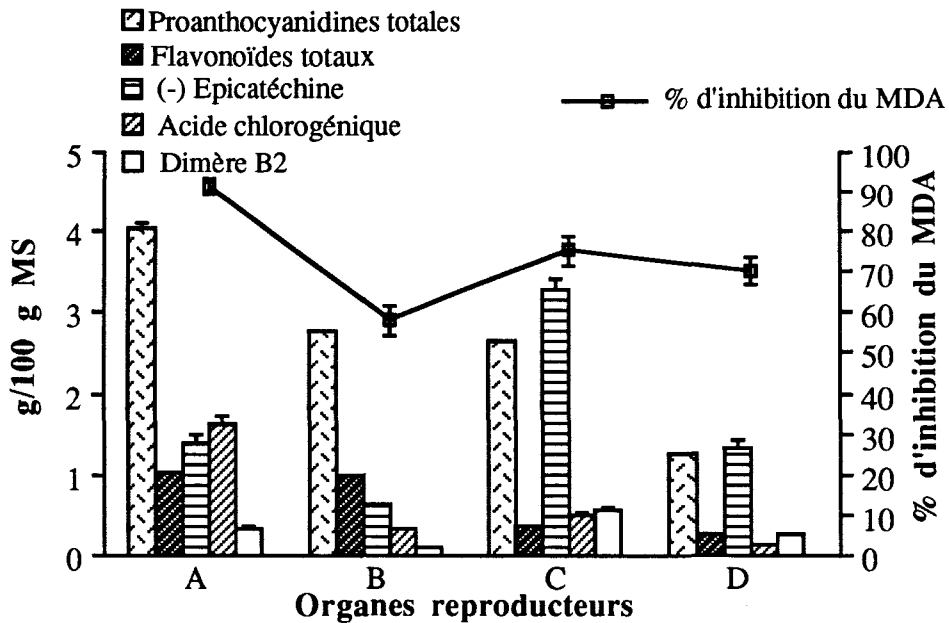


Figure 83 : Teneurs en polyphénols : proanthocyanidines totales, flavonoïdes totaux, (-) épicatechine, acide chlorogénique et dimère B2 dans les extraits totaux d'organes reproducteurs (A = bouton floral, B = fleur épanouie, C = fruit vert, D = fruit rouge) et activités antioxydantes exprimées en pourcentage d'inhibition du malondialdéhyde (MDA).

	Phénols totaux %	Proanthocyanidines oligomères %	Dimère B2 %	Epicatechine %	Acide chlorogénique %	Hypéroside %	Vitexine-2''-O- rhamnoside %	Isoquercitrine %
F1	20	27	53	84	13	79	46	47
F2	22	37	30	28	6	43	30	67
F3	33	33	37	49	30	84	50	86
F4	28	38	60	56	14	100	39	86
F5	44	43	69	87	21	100	51	100
F6	30	37	51	66	8	84	21	65
Moyenne	29±8	35±5	50±13	62±20	18±8	81±19	40±11	75±17
A	39	37	40	63	20	75	11	93
B	18	22	45	25	21	62	33	88
C	50	47	64	79	16	57	-	77
D	43	54	85	77	13	71	-	100
Moyenne	36±11	40±12	58±17	61±21	17±3	66±7	22±11	89±8

Tableau 19 : Pourcentages des différentes catégories de polyphénols dans des "phases acétate d'éthyle" des feuilles (F1-F6) et des organes reproducteurs (A-D) rapportés à la valeur correspondante considérée comme 100% dans les extraits totaux.

■ L'activité dans les organes reproducteurs semble pouvoir être mise en relation avec les proanthocyanidines totales et la proanthocyanidine dimère B2 ainsi qu'éventuellement avec la teneur en (-) épicatéchine (**Figure 83**). Les valeurs de CI₅₀ des étalons (-) épicatéchine et proanthocyanidine B2 semblent bien confirmer cette interprétation (**Tableau 17**).

1.3 Phases acétate d'éthyle

Les "phases acétate d'éthyle" qui proviennent d'un fractionnement des extraits totaux par de l'acétate d'éthyle (**Figure 16**) contiennent majoritairement de la (-) épicatéchine, des proanthocyanidines qui sont principalement des oligomères incluant la proanthocyanidine dimère B2 (dominante), des flavonoïdes moins polaires et de l'acide chlorogénique.

Nous avons voulu représenter pour les phases acétate d'éthyle les teneurs relatives des différents phénols (Tableau 19) en les exprimant en pourcentage rapporté aux valeurs des mêmes composés dans des extraits totaux considérés comme 100%. Ainsi nous avons noté que les phases acétate d'éthyle contiennent en moyenne dans le cas des feuilles 29% des phénols totaux et que dans le cas des organes reproducteurs ce pourcentage est de 36% .

Les oligomères de proanthocyanidines représentent 35 % des proanthocyanidines totales dans les feuilles et 40% dans les organes reproducteurs.

Les pourcentages moyens en dimère B2 (50%), (-) épicatéchine (62%) sont importants dans cette phase peu polaire pour les feuilles (respectivement 50% et 62%) et également pour les organes reproducteurs (58% et 61%).

La distribution moyenne de l'acide chlorogénique n'est que de 18% pour les feuilles et 17% pour les fleurs et fruits.

Parmi les flavonoïdes, l'hypéroside et l'isoquercitroside sont en majorité (81% et 75% dans les feuilles; 66% et 89% dans les organes reproducteurs) tandis que la vitexine-2''-O-rhamnoside est présente en quantité moindre (40% dans les feuilles ; 22% dans les organes reproducteurs).

▣► Les **figures 84** et **85** comparent l'activité antilipoperoxydante mesurée et la distribution des phénols dans les feuilles et les organes reproducteurs.

■ Les organes foliaires les plus actifs dans les phases acétate d'éthyle, contrairement aux extraits totaux, sont ceux des stades **F4** et **F5** avec respectivement 48% et 55% d'inhibition du MDA (**Figure 84**).

	Phenols (g/100 g MS)	Proanthocyanidines (g/100 g MS)	Flavonoïdes (g/100 g MS)	Acide chlorogénique (g/100 g MS)	Epicatéchine (g/100 g MS)	Dimère B2 (g/100 g MS)	Hyperoside (g/100 g MS)	Concentrations inhibitrices (CI ₅₀)	% Inhibition du MDA
F1	1,337±0,057	1,179±0,050	1,269±0,018	0,019±0,002	0,129±0,001	0,051±0,001	0,069±0,001	0,027	3,77±1,80
F2	1,710±0,340	1,454±0,038	1,716±0,007	0,035±0,004	0,163±0,003	0,072±0,002	0,206±0,010	0,023	21,60±5,37
F3	2,502±0,121	1,025±0,052	1,093±0,020	0,403±0,017	0,711±0,022	0,147±0,009	0,226±0,015	0,015	28,13±5,03
F4	2,500±0,077	1,420±0,015	0,700±0,023	0,136±0,019	0,291±0,013	0,081±0,003	0,209±0,018	0,004	48,97±3,14
F5	2,607±0,011	1,281±0,040	1,006±0,002	0,125±0,002	0,605±0,045	0,137±0,011	0,349±0,015	0,006	55,11±1,90
F6	1,625±0,124	0,890±0,035	0,830±0,005	0,040±0,001	0,286±0,034	0,069±0,004	0,246±0,007	0,007	35,00±6,10
A	3,930±0,030	1,489±0,430	0,699±0,003	0,322±0,015	0,884±0,05	0,135±0,009	0,547±0,030	0,011	65,6±10,00
B	1,129±0,091	0,605±0,018	0,710±0,012	0,069±0,006	0,157±0,003	0,044±0,001	1,197±0,077	0,010	30,00±0,80
C	3,710±0,169	1,247±0,059	0,241±0,050	0,078±0,007	2,600±0,150	0,366±0,010	0,133±0,016	0,006	46,70±8,20
D	1,707±0,100	0,680±0,018	0,186±0,008	0,018±0,001	1,020±0,090	0,218±0,013	0,017±0,027	0,008	28,10±3,90

Tableau 20 : Composition en polyphénols (g/100 g de masse sèche) et activités antioxydantes (% d'inhibition du MDA) des "phases acétate d'éthyle" des organes végétatifs (F1-F6) et reproducteurs (A-D).

Ceci peut être expliqué globalement par une teneur plus élevée en phénols totaux (F4 : 28%, F5 : 44%) et plus particulièrement parce qu'y figure une proportion plus importante de proanthocyanidines oligomères (F4 : 38%, F5 : 43%), de proanthocyanidine dimère B2 (F4 : 60%, F5 : 69%), de (-) épicatechine (F4 : 56%, F5 : 87%) et d'hypéroside (F4 : 100%, F5 : 100%) (Tableau 19).

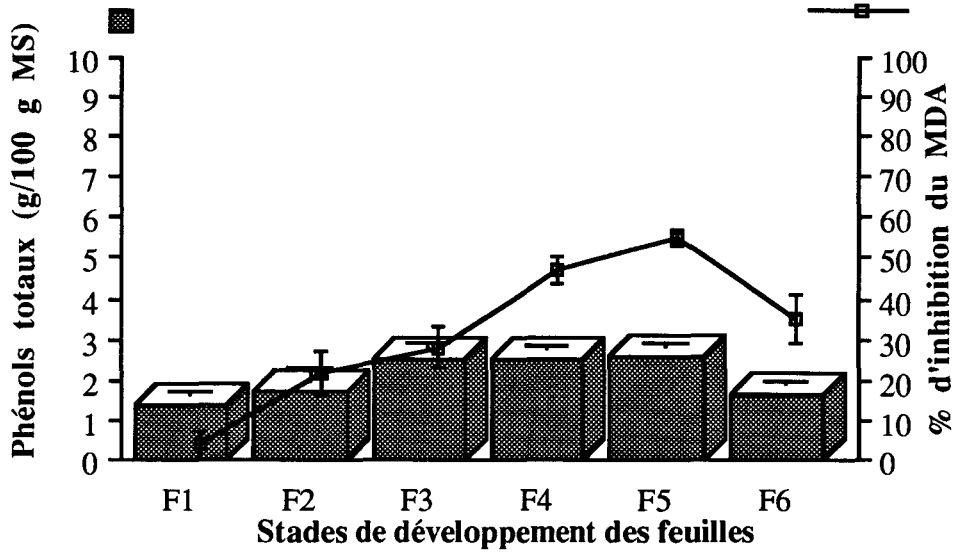


Figure 84 : Teneurs en phénols dans les "phases acétate d'éthyle" des feuilles (F1-F6) et activités antioxydantes exprimées en pourcentage d'inhibition du malondialdéhyde (MDA)

■ Avec les organes reproducteurs nous avons observé une corrélation identique entre les activités mesurées sur les "phases acétate d'éthyle" (Figure 85 et Tableau 20), et celles des extraits totaux (Figure 81).

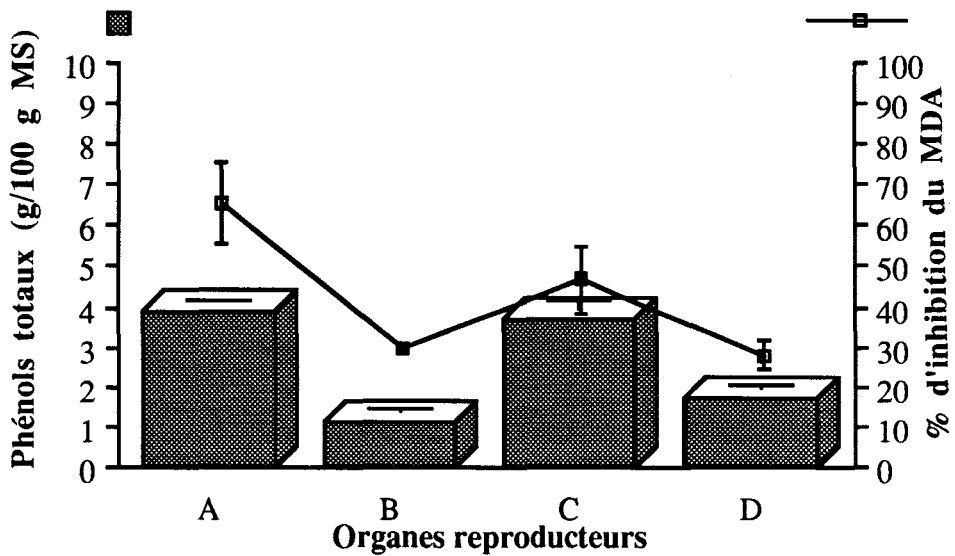


Figure 85 : Teneurs en phénols dans les "phases acétate d'éthyle" des organes reproducteurs (A = bouton floral, B = fleur épanouie, C = fruit vert, D = fruit rouge) et activités antioxydantes exprimées en pourcentage d'inhibition du malondialdéhyde (MDA)

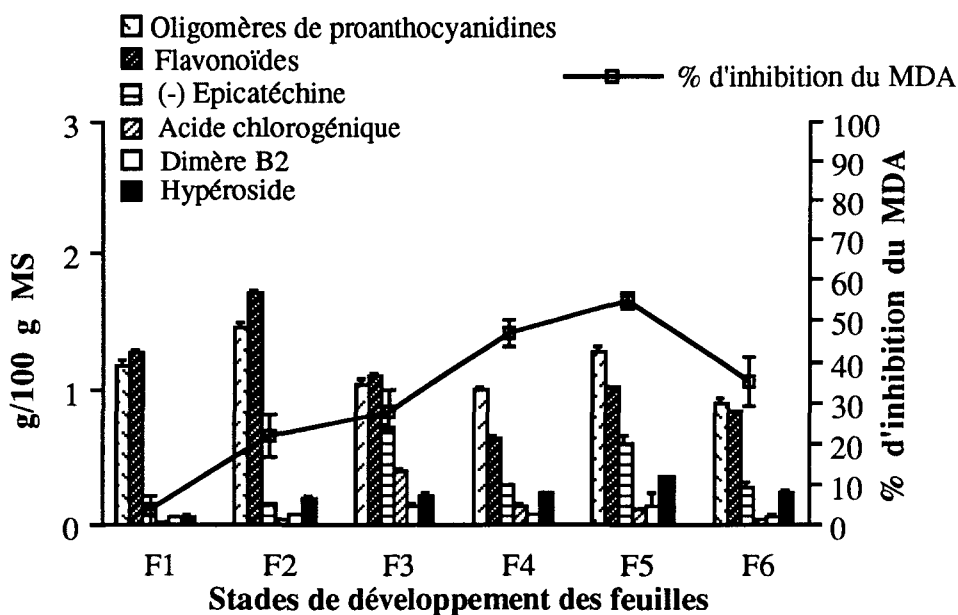


Figure 86 : Teneurs en polyphénols : proanthocyanidines oligomères, flavonoïdes, (-) épicatechine, acide chlorogénique, dimère B2 et hypéroside des extraits acétate d'éthyle de feuilles (F1-F6) et les activités antioxydantes exprimées en pourcentage d'inhibition du malondialdéhyde (MDA)

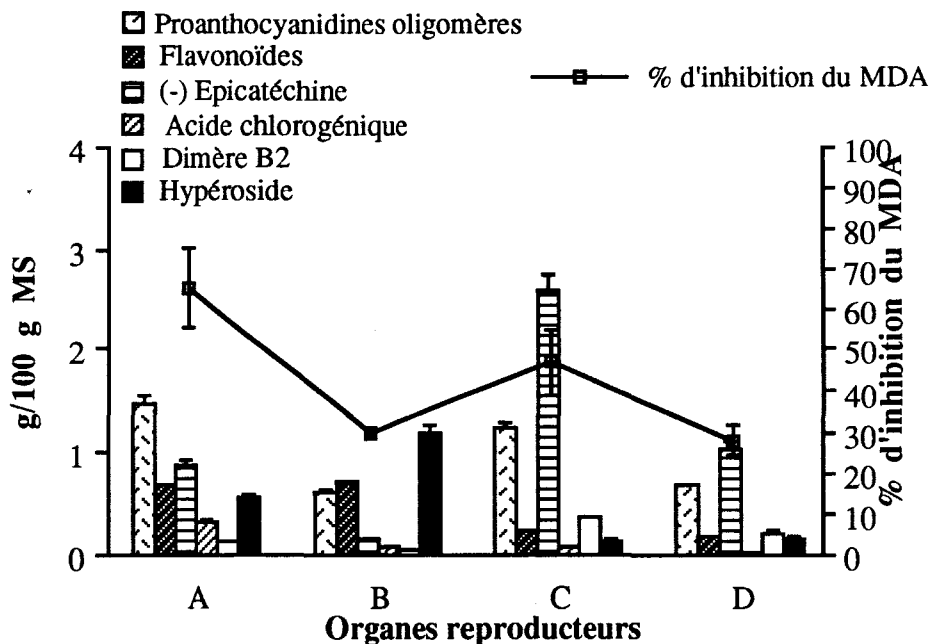


Figure 87 : Teneurs en polyphénols : proanthocyanidines oligomères, flavonoïdes, (-) épicatechine, acide chlorogénique, dimère B2 et l'hypéroside des extraits acétate d'éthyle des organes reproducteurs (A = bouton floral, B = fleur épanouie, C = fruit vert, D = fruit rouge) et les activités antioxydantes exprimées en pourcentage d'inhibition du malondialdéhyde (MDA)

Les valeurs d'inhibitions maximales sont enregistrées pour les **boutons floraux (A)** (66%) et les **fruits verts (C)** (47%).

Comme pour les extraits totaux, (**Figures 80-81**) il existe une corrélation directe entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante.

Une teneur en proanthocyanidines globales plus faible que dans les extraits totaux pourrait expliquer la diminution des activités antioxydantes. Pourtant, on ne peut pas attribuer cette diminution à l'absence des proanthocyanidines polymères dans les "phases acétate d'éthyle" car les polymères sont réputés inactifs et nos observations sur les phases aqueuses résiduelles qui les contiennent le confirment.

En cherchant à préciser dans les "phases acétate d'éthyle", l'intervention des catégories de polyphénols et des molécules isolées (structure-teneurs) sur l'activité antioxydante, il nous a été possible d'observer une corrélation avec les teneurs en hypéroside des extraits de feuilles (**Figure 86**). Cette relation ne subsiste cependant pas pour les organes reproducteurs pour lesquels (**Figure 87**) les proanthocyanidines totales et la (-) épicatéchine semblent, comme nous l'avons déjà observé avec les extraits totaux, être plus déterminantes.

1.4 Phases aqueuses résiduelles

Les phases aqueuses résiduelles obtenues après épuisement des extraits aqueux totaux par de l'acétate d'éthyle (**Figure 16**) contiennent principalement des polymères de proanthocyanidines (58% des proanthocyanidines totales des feuilles et 47% de proanthocyanidines totales des organes reproducteurs), de l'acide chlorogénique (80% du total), de la vitexine-2''-O-rhamnoside et des proportions peu élevées de dimère B2 et de (-) épicatéchine.

Les activités antioxydantes mesurées de ces extraits sont très faibles.

Conclusion

Dans cette étude les points essentiels que nous pouvons faire ressortir sont :

- ➡ Les composés standards testés présents dans nos extraits peuvent être classés par ordre décroissant de pouvoir antioxydant :
Proanthocyanidine dimère B2 > (-) épicatéchine > Hypéroside > Acide chlorogénique > Vitexine-2''-O-rhamnoside
- ➡ Les activités les plus importantes sont mesurées dans les **extraits totaux**. Les organes les plus actifs pour les **feuilles** sont les stades **F2** et **F3** (jeunes feuilles) et pour les **organes reproducteurs** le **bouton floral (A)** et le **fruit vert (C)**.

	Phénols	H ₂ O ₂ (10 ⁻³ g.l ⁻¹)	HOCl (10 ⁻³ g.l ⁻¹)	O ₂ ^{o-} (10 ⁻³ g.l ⁻¹)
Flavanols	Epicatéchine	0,351±0,014	0,96±0,038	1,53±0,066
	Dimère B2	0,58±0,018	1,52±0,062	2,48±0,089
Flavonoïde	Hypéroside	0,54±0,021	1,420±0,058	2,36±0,094
Acide phénol	Acide Chlorogénique	1,13±0,046	2,82±0,109	4,97±0,183

(A)

	Phénols	H ₂ O (10 ⁻⁶ M)	HOCl (10 ⁻⁶ M)	O ₂ ^{o-} (10 ⁻⁶ M)
Flavanols	Epicatéchine	1,21±0,048	3,31±0,013	5,27±0,022
	Dimère B2	1,00±0,031	2,62±0,010	4,28±0,016
Flavonoïde	Hypéroside	1,17±0,045	3,08±0,012	5,13±0,02
Acide phénol	Acide Chlorogénique	3,19±0,012	7,96±0,03	13,75±0,051

(B)

Tableau 21 : Concentrations inhibitrices (CI₅₀ exprimées en mg.l⁻¹ (A) et en μM (B)) des composés, correspondants aux dérivés individuels majoritaires dans l'aubépine *in vivo*. Les activités sont mesurées dans les systèmes de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de l'acide hypochloreux (HOCl) et de l'anion superoxyde (O₂^{o-})

- ➡ Le pouvoir antioxydant des “**phases acétate d'éthyle**” est en général **inférieur** à celui des extraits totaux ; les teneurs en **phénols** sont plus faibles.
- ➡ Nous observons dans **tous les cas** (extraits totaux et phases acétate d'éthyle) une corrélation nette entre les **phénols totaux** et les **propriétés antioxydantes**.
- ➡ Par contre nous ne pouvons affirmer qu'une catégorie de polyphénols ou une substance particulière serait à elle seule responsable de l'activité dans chaque cas.
Pour les **extraits totaux** les flavonoïdes (dans les **feuilles**), les proanthocyanidines totales, le dimère B2 et la (-) épicatéchine (dans les **organes reproducteurs**) sont les plus actifs.
Pour les **phases acétate d'éthyle** les composés qui influenceraient davantage l'activité seraient pour les feuilles l'hypéroside et les proanthocyanidines oligomères et pour les organes reproducteurs la (-) épicatéchine et les proanthocyanidines oligomères, mais l'interprétation est moins facile que pour les extraits totaux.
- ➡ Les activités antioxydantes mesurées dans les **phases aqueuses résiduelles** sont très faibles ou pratiquement négligeables et ces phases se caractérisent par une teneur élevée en proanthocyanidines polymères (Cf. **Polyphénols in vivo**).

2. Activités de piégeage des espèces réactives de l'oxygène

Trois autres systèmes d'évaluation des pouvoirs antioxydants ont été utilisés pour mettre en évidence et confirmer les activités des extraits d'Aubépine. Nous nous sommes limités à l'analyse des extraits totaux des organes végétatifs et reproducteurs.

Comme pour le test d'activité antilipoperoxydante nous avons essayé de trouver des corrélations entre les teneurs en phénols et les propriétés antioxydantes.

2.1 Polyphénols de référence

Les molécules isolées testées dans les 3 systèmes étudiés sont la (-) épicatéchine, le dimère B2, l'hypéroside et l'acide chlorogénique. Le **tableau 21** donne les valeurs correspondantes de CI₅₀. La proanthocyanidine dimère B2 et la (-) épicatéchine sont les composés les plus efficaces dans les 3 systèmes, suivis par l'hypéroside et l'acide chlorogénique.

Il faut noter que les activités de piégeage de ces composés s'inscrivent dans le même ordre d'efficacité observée précédemment pour les activités antilipoperoxydantes. Soulignons également que les CI₅₀ de composés comme la rutine et la vitexine-2''-O-rhamnoside n'ont pu être déterminées en raison de leur faible solubilité dans ces systèmes.

Organes foliaires (F1-F6) et reproducteurs (A-D)	H ₂ O ₂ CI ₅₀ (mg/l)	HOCl CI ₅₀ (mg/l)	O ₂ ^{°-} CI ₅₀ (mg/l)
F1	19,98	60,32	85,94
F2	5,52	13,05	24,23
F3	6,25	20,93	27,21
F4	8,83	35,00	39,32
F5	11,30	34,28	41,84
F6	12,67	49,57	58,90
A	2,90	8,49	12,62
B	11,36	39,23	51,71
C	10,54	32,23	49,56
D	17,09	61,71	76,06

Tableau 22 : Concentrations inhibitrices (CI₅₀) exprimées par rapport à la masse de matière sèche à l'origine des extraits totaux de feuilles (F1-F6) et d'organes reproducteurs (A = bouton floral, B = fleur épanouie, C = fruit vert, D = fruit rouge). Les valeurs sont calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de l'acide hypochloreux (HOCl) et de l'anion superoxyde (O₂^{°-}).

2.2 Extraits totaux

Les résultats obtenus dans les trois systèmes d'études montrent une corrélation nette entre les activités antioxydantes et les teneurs en phénols totaux dans les différents stades des organes végétatifs et dans tous les organes reproducteurs (Figures 88-89, tableau 22).

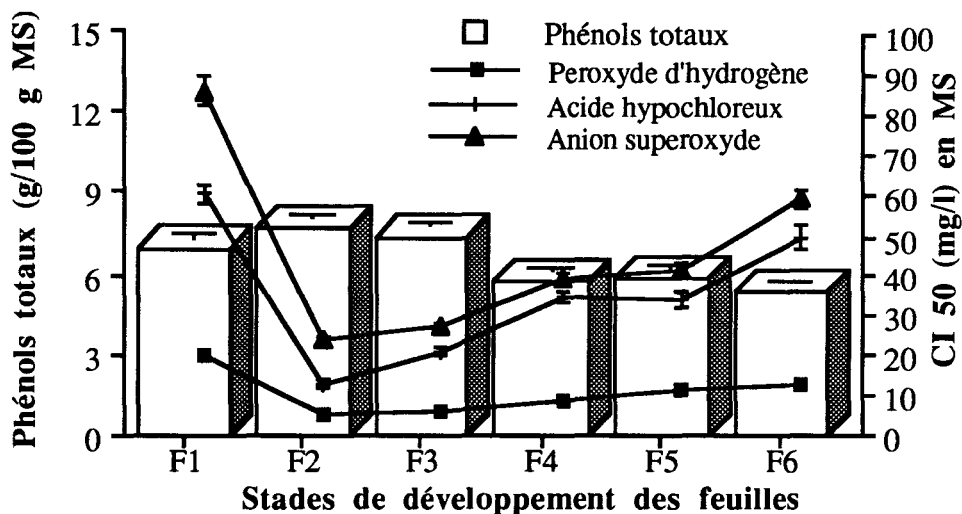


Figure 88 : Relation entre les teneurs en phénols totaux des extraits totaux des feuilles (F1-F6) et les valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde.

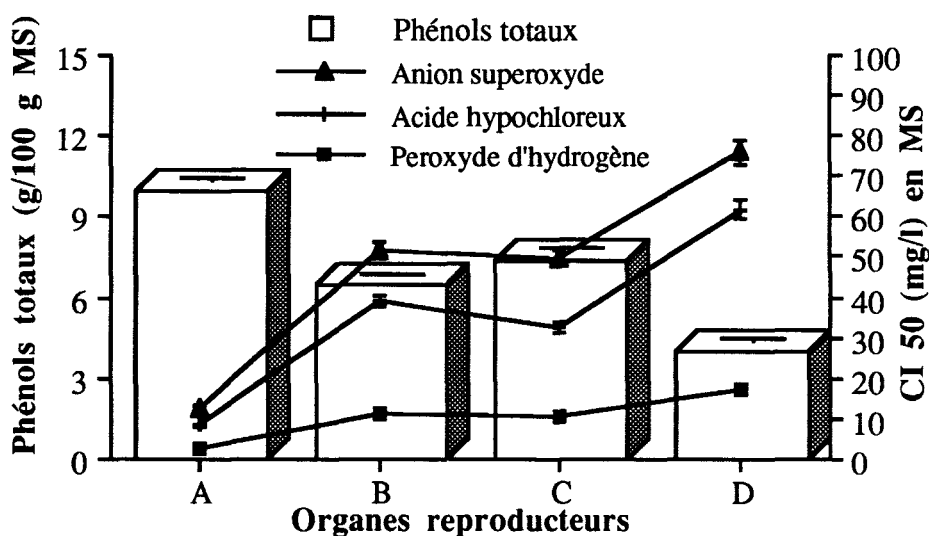


Figure 89 : Relation entre les teneurs en phénols totaux des extraits totaux des organes reproducteurs (A = bouton floral, B = fleur épanouie, C = fruit vert, D = fruit rouge) et les valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde.

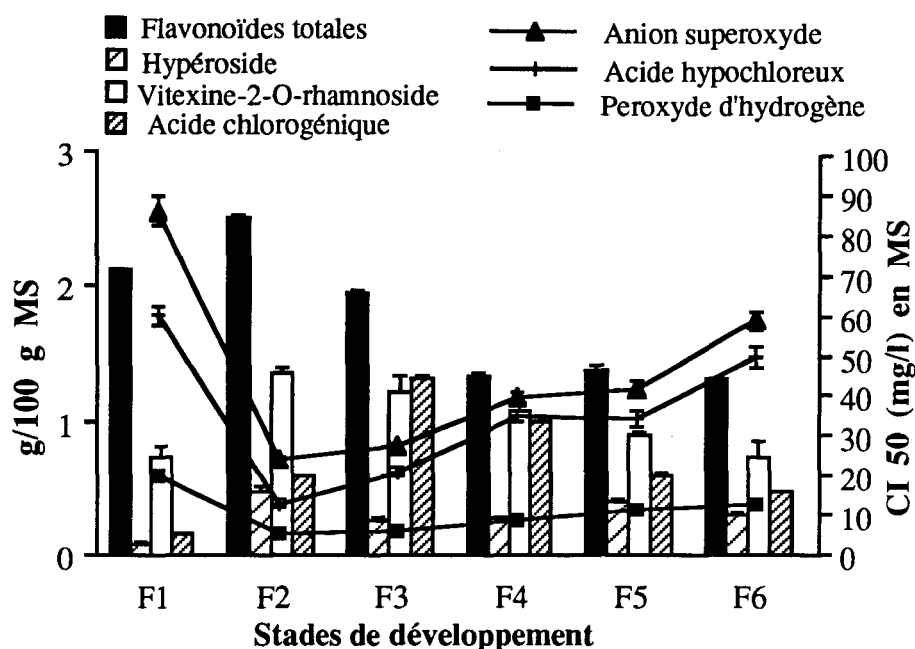


Figure 90 : Teneurs en polyphénols : flavonoïdes totaux, l'hypéroside, la vitexine-2-O-rhamnoside et l'acide chlorogénique des extraits totaux de feuilles (F1-F6) et les valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde.

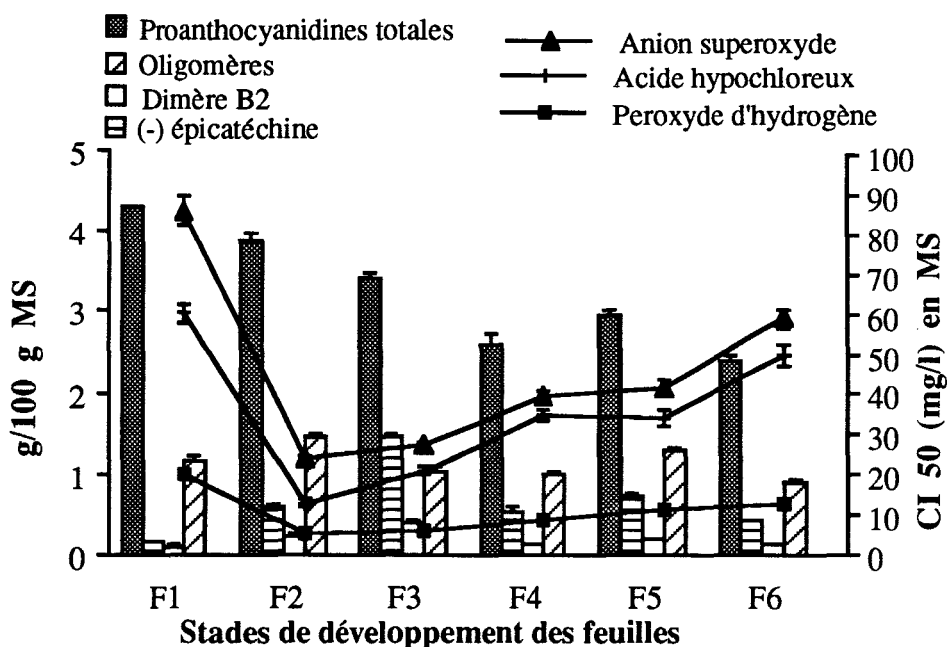


Figure 91 : Teneurs en polyphénols : proanthocyanidines totales, proanthocyanidines oligomères, dimère B2 et (-) épicatechine des extraits totaux de feuilles (F1-F6) et les valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde.

Les stades végétatifs F2 et F3, le bouton floral (B) et les fruits verts (C) sont les organes les plus actifs avec respectivement des valeurs de CI_{50} de 5,52 mg.l⁻¹, 6,25 mg.l⁻¹, 2,90 mg.l⁻¹ et 10,54 mg.l⁻¹. Ces données sont en concordance avec les résultats obtenus lors de l'évaluation du pouvoir antilipoperoxydant de nos extraits totaux (**Figures 80-81**).

▣ Les **figures 90 à 93** comparent les effets antioxydants avec les teneurs des polyphénols dosés par classes ou individuellement dans les organes foliaires et reproducteurs.

■ Dans les extraits de feuilles (**Figure 90**) on observe une bonne corrélation entre l'augmentation des activités antioxydantes et celle des teneurs en flavonoïdes totaux notamment avec celle de la vitexine-2''-O-rhamnoside et de l'hypéroside.

Les teneurs en proanthocyanidines totales ne semblent pas expliquer les activités enregistrées (**Figure 91**). Il faut néanmoins tenir compte du fait que les proanthocyanidines totales incluent des proportions variables de proanthocyanidines oligomères et polymères selon les stades étudiés. C'est pourquoi nous avons été amenés à considérer (**Tableau 19**) *les proportions de proanthocyanidines oligomères par rapport à celles des proanthocyanidines totales*.

D'après nos dosages, dans les feuilles, les proanthocyanidines oligomères, sont en quantités plus faibles au stade F1 (27% par rapport aux proanthocyanidines totales). Par contre les stades F2, F3, F4, F5 et F6, tous plus actifs, en contiennent des proportions plus importantes avec respectivement 37%, 33%, 38%, 43% et 37%. Les oligomères de proanthocyanidines semblent donc contribuer nettement à l'activité antioxydante. Les teneurs en proanthocyanidine dimère B2 (l'oligomère majeur) semblent bien liées aux activités décelées. Les teneurs les plus importantes en dimère B2 se situent aux stades F2 et F3 qui sont également les organes présentant la plus grande activité. Si la seule présence de ce dimère ne peut expliquer entièrement les effets enregistrés, sa contribution semble certaine.

Les teneurs en (-) épicatechine concordent bien avec les valeurs de CI_{50} pour tous les organes végétatifs sauf pour le stade F3.

Les activités antilipoperoxydantes ne semblent guère être influencées par l'acide chlorogénique.

■ Dans les organes reproducteurs l'action antioxydante semblerait plus nettement liée aux proanthocyanidines totales. Le cas du bouton floral montre une augmentation de l'activité antioxydante quand les teneurs en proanthocyanidines sont importantes et par contre une activité moindre est enregistrée pour le fruit rouge qui est l'organe le moins riche en proanthocyanidines (**Figure 92**). En fait, il est ici encore intéressant de

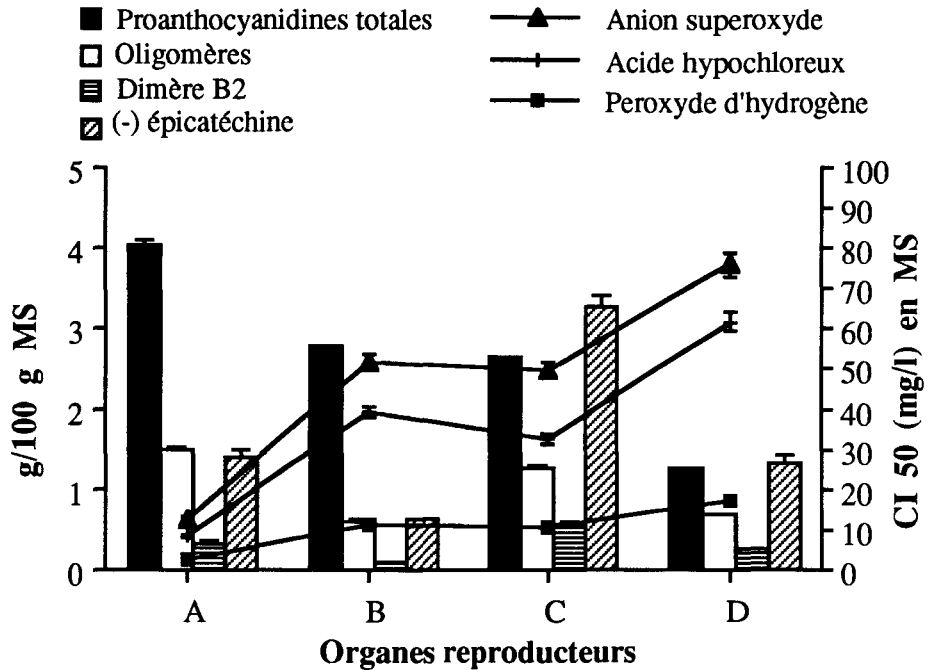


Figure 92 : Relation entre les teneurs en polyphénols : proanthocyanidines totales, proanthocyanidines oligomères, dimère B2 et (-) épicatechine dans les extraits totaux des organes reproducteurs (A = bouton floral, B = fleur épanouie, C = fruit vert, D = fruit rouge) et les valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités piégeuses du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde.

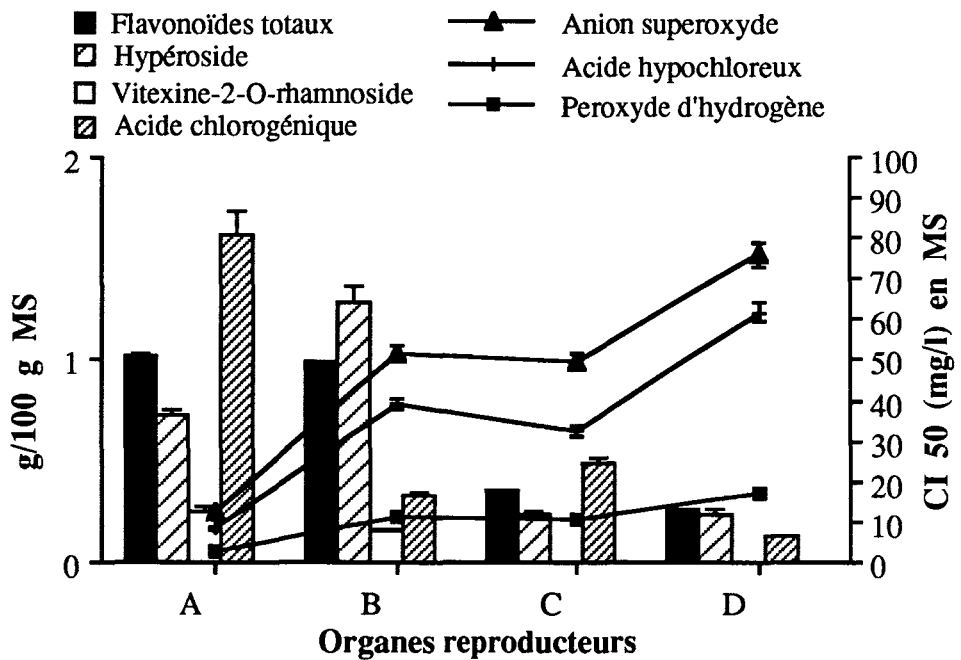


Figure 93 : Teneurs en polyphénols : flavonoïdes totaux, l'hypéroside, la vitexine-2-O-rhamnoside et l'acide chlorogénique des extraits totaux des organes reproducteurs (A = bouton floral, B = fleur épanouie, C = fruit vert, D = fruit rouge) et les valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités du piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde.

connaître les proportions d'oligomères présents. Le bouton floral, la fleur épanouie, le fruit vert et le fruit rouge contiennent respectivement 37%, 22%, 47% et 54 % d'oligomères (**Tableau 19**) et les valeurs de CI₅₀ les moins élevées sont mesurées pour les boutons floraux et les fruits verts.

L'activité plus faible du fruit rouge peut être expliquée par sa faible teneur globale en proanthocyanidines même si les oligomères y représentent une proportion majoritaire.

Les teneurs en acide chlorogénique se corrèlent également aux valeurs de CI₅₀ mesurées pour tous les organes reproducteurs (**Figure 93**).

Par contre les flavonoïdes, la (-) épicatechine et le dimère B2 ne semblent pas jouer individuellement de rôle prépondérant dans l'activité antioxydante (**Figure 93**).

Conclusion

L'utilisation de ces trois systèmes d'évaluation du pouvoir piégeur des espèces réactives de l'oxygène nous permet d'insister sur les points suivants :

- ➡ Les composés standards testés se comportent du point de vue activité comme dans le système d'étude précédent. Nous avons par ordre décroissant d'activité de piégeage : Dimère B2 > (-) Epicatechine > Hypéroside > Acide chlorogénique
- ➡ Dans les 3 systèmes d'études les extraits de **feuilles** les plus actifs correspondent aux stades **F2** et **F3** (jeunes feuilles). Parmi les fleurs, c'est l'extrait issu du **bouton floral** qui est le plus antioxydant tandis que celui issu du **fruit vert** présente la meilleure valeur de CI₅₀ parmi les fruits. Ces observations rejoignent celles faites dans le système antilipoperoxydant.
- ➡ Nous avons mis en évidence une **corrélation directe** entre les teneurs en **phénols totaux** et les **valeurs de CI₅₀** dans tous les extraits d'**organes reproducteurs** et pour pratiquement tous les stades de développement des **feuilles**.
- ➡ Les composés qui semblent influencer le plus sur l'inhibition des espèces réactives de l'oxygène sont :
 - Pour les feuilles** : les flavonoïdes totaux, les proanthocyanidines oligomères, le dimère B2 et la (-) épicatechine.
 - Pour les organes reproducteurs** : les proanthocyanidines totales et l'acide chlorogénique

Formes pharmaceutiques	Phénols totaux (g/100 g MS)	Proanthocyanidines totales (g/100 g MS)	Proanthocyanidines oligomères (g/100 g MS)	Dimère B2 (g/100 g MS)	(-) Epicatechine (g/100 g MS)	Acide chlorogénique (g/100 g MS)	Flavonoïdes totaux (g/100 g MS)	Hypéroside (g/100 g MS)	Vitexine-2''-O-rhamnoside (g/100 g MS)	Isoquercitroside (g/100 g MS)	H ₂ O ₂ (CI ₅₀ (mg de MS))	HOCl (CI ₅₀ (mg de MS))	O ₂ ^{•-} (CI ₅₀ (mg de MS))
Titrex	3,98	0,84	0,21	0	0,38	0,63	1,06	0,20	0,32	0,02	58,67	122,70	175,42
Arkotitrat	7,88	2,48	0,93	0,21	0,85	1,14	1,86	1,20	0,63	0,15	23,57	53,88	71,00
Extrait fluide	2,66	0,8	0,36	0,06	0,57	0,79	1,49	0,42	0,71	0,10	45,17	77,42	136,37
Teinture	3,85	1,11	0,47	0,11	0,70	0,90	1,74	0,51	0,53	0,03	31,85	64,32	97,28
Sommités fleuries	5,33	3,06	0,60	0,40	1,27	1,83	1,91	1,22	1,01	0,15	15,40	33,64	47,81
Fleurs	8,78	6,10	0,79	0,84	2,53	2,92	1,89	1,67	0,40	0,15	8,35	16,66	25,34

Tableau 23 : Composition phénoliques des formes et préparations pharmaceutiques (g/100 g masse sèche (MS)) du commerce et valeurs de CI₅₀ (mg de masse sèche) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde.

II. FORMES ET PREPARATIONS PHARMACEUTIQUES

Des préparations Pharmaceutiques à base d'Aubépine séchée sont prescrites ou utilisées en automédication notamment comme cardiosédatifs. Leurs activités antioxydantes n'ont jusqu'à maintenant pas été rapportées.

Dans le cas présent nous n'avons pris en compte que les systèmes de piégeage des espèces réactives de l'oxygène (piégeage de l'anion superoxyde, du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux). Les Préparations commerciales analysées sont des nébulisats (extraits dans l'éthanol à 30%) d'Aubépine : **Titrex®**, une poudre cryobroyée d'Aubépine : **Arkotitrat®** et enfin l'**Extrait fluide** (extraits dans l'éthanol à 45%) et la **Teinture** (extraite dans l'éthanol à 60%) d'Aubépine qui sont définis tous deux par les normes de la Pharmacopée Française. Toutes ces présentations pharmaceutiques sont préparées à partir de sommités fleuries et de fleurs séchées ou fraîches. C'est pourquoi nous avons aussi inclus pour comparaison, des matières premières Pharmaceutiques inscrites à la Pharmacopée comme les **Sommités fleuries séchées** et les **Fleurs séchées**. Il faut insister sur le fait que pour tous, le mode de préparation et d'extraction, de même que la matière première sèche ou fraîche, ont une influence importante sur la composition finale de ces formes pharmaceutiques. Les Sommités fleuries et les Fleurs séchées du commerce sont les seules à n'avoir subi aucun traitement industriel avant notre extraction selon la technique déjà décrite (**Figure 17**).

Activités de piégeage des espèces réactives de l'oxygène

▣► Le **tableau 23** et la **figure 94** montrent une bonne corrélation entre les teneurs en phénols totaux et les valeurs de CI₅₀ pour toutes les préparations sauf pour l'Arkotitrat®.

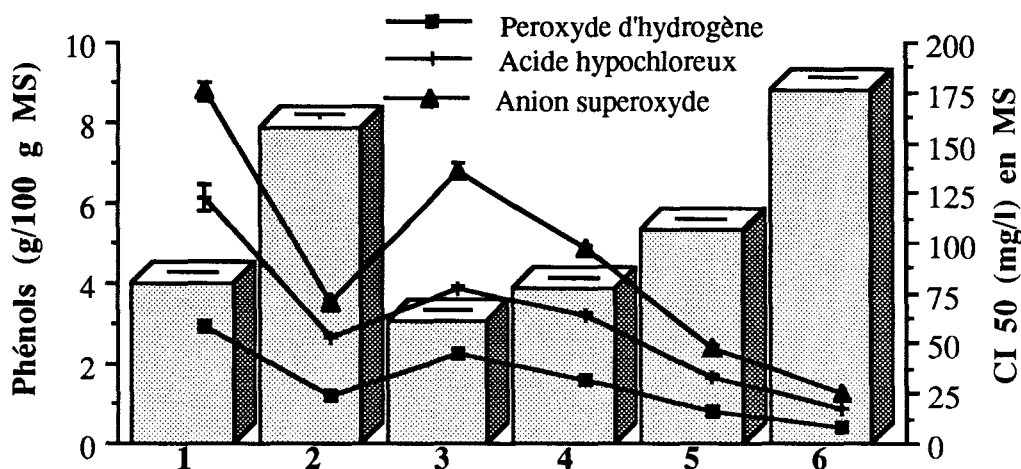


Figure 94 : Teneurs en phénols totaux des extraits totaux des formes pharmaceutiques commerciales (1 : Titrex®, 2 : Arkotitrat®, 3 : Extrait fluide, 4 : Teinture, 5 : Sommités fleuries séchées, 6 : Fleurs séchées) et valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde

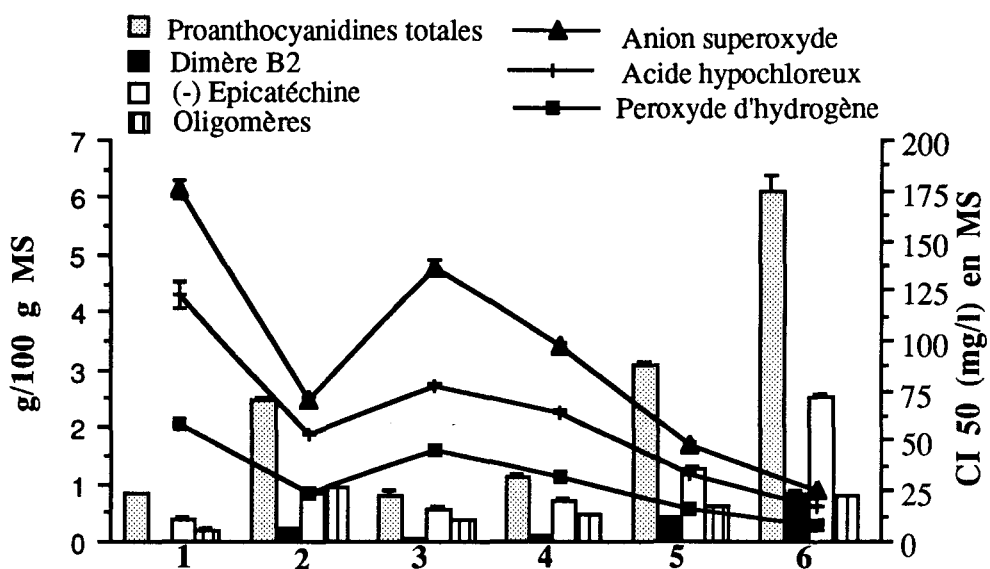


Figure 95 : Teneurs en polyphénols : proanthocyanidines totales, proanthocyanidines oligomères, dimère B2 et (-) épicatechine des extraits totaux des formes pharmaceutiques (1 : Titrex[®], 2 : Arkotitrat[®], 3 : Extrait fluide, 4 : Teinture, 5 : Sommités fleuries séchées, 6 : Fleurs séchées) et valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde.

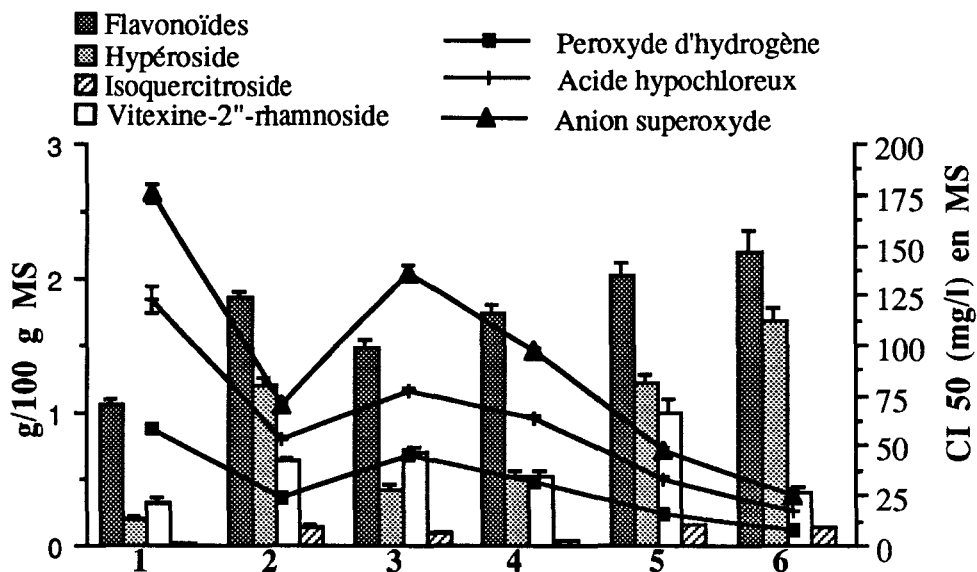


Figure 96 : Teneurs en polyphénols : flavonoïdes, hypéroside, isoquercitroside et vitexine-2-O-rhamnoside dans les extraits totaux des formes et préparations pharmaceutiques (1 : Titrex[®], 2 : Arkotitrat[®], 3 : Extrait fluide, 4 : Teinture, 5 : Sommités fleuries séchées, 6 : Fleurs séchées) et valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde.

Les **Fleurs séchées**, les **Sommités fleuries**, l'**Arkotitrat®** sont les plus riches en phénols totaux avec respectivement 7,32 , 5,33 et 7,89 g /100 g MS. Ces préparations sont également les plus actives avec des valeurs de CI₅₀ les moins élevées dans les trois systèmes d'études mais l'Arkotitrat® semble être un peu moins antioxydant malgré sa forte teneur en phénols totaux.

Le Titrex®, la Teinture et l'Extrait fluide contiennent des quantités inférieures de phénols totaux (3,99, 3,85 et 3,05 g/100 g MS) qui correspondent d'ailleurs à des activités plus faibles que dans les cas précédents.

■ Par catégories de polyphénols et composés individuels, nous avons observé une relation nette entre les dérivés de flavanes (proanthocyanidines totales et oligomères, dimère B2 et catéchines) et les valeurs de CI₅₀ (**Figure 95**). Les profils quantitatifs de ces composés sont analogues à ceux des phénols totaux (**Figure 94**).

Les préparations les plus riches en proanthocyanidines totales (de l'ordre de 6,1, 3,06 et 2,48 g/100 g MS) sont les Fleurs séchées, les Sommités fleuries et l'Arkotitrat®. Les quantités estimées pour la Teinture, le Titrex® et l'Extrait fluide sont plus faibles avec 1,11, 0,84 et 0,8 g/100 g MS. Pour les trois préparations les plus actives, il y a une relation nette entre les teneurs en proanthocyanidines totales et l'activité dans les trois systèmes.

Les quantités de proanthocyanidines oligomères des différentes Formes et Préparations Pharmaceutiques (Fleurs séchées, Sommités fleuries, Arkotitrat®, Teinture, Extrait fluide et Titrex®) sont respectivement 0,79, 0,60, 0,93, 0,47, 0,36 et 0,21 g/100 g MS. Une relation nette existe entre les effets antioxydants et les teneurs pour les fleurs séchées et les sommités fleuries séchées.

Les teneurs en proanthocyanidine dimère B2, (**Figure 95**), sont les plus fortes dans les Fleurs séchées (0,842 g/100 g MS), les Sommités fleuries (0,402 g/100 g MS) et l'Arkotitrat®, 0,214 g/100 g MS. la Teinture et l'Extrait fluide en contiennent un peu moins : respectivement , 0,106 et 0,057 g/100 g MS. Le dimère B2 n'a pratiquement pas été détecté dans le Titrex® et ceci prouve *a contrario* son influence puisque l'effet antioxydant est faible. Dans chacun des 3 systèmes de mesure d'activité antioxydante, les CI₅₀ les plus basses correspondent aux taux les plus élevés en proanthocyanidine B2 dans les Fleurs séchées, Sommités fleuries et l'Arkotitrat® (**Tableau 23**). De plus, le **tableau 21** montre des meilleures valeurs de CI₅₀ pour le dimère B2 standard.

Les proportions les plus élevées en (-) épicatechine sont présentes dans les deux drogues sèches les plus actives : les Fleurs (2,52 g/100 g MS) et les Sommités fleuries (1,269 g/100 g MS) et dans l'Arkotitrat® (0,847 g/100 g MS). Nous avons observé des

teneurs moins importantes dans la Teinture (0,695 g/100 g MS) et l'Extrait fluide (0,568 g/100 g MS). Le Titrex® semble être plus pauvre en (-) épicatechine avec seulement 0,381 g/100 g MS (**Figure 95**).

Il pourrait avoir une corrélation entre les valeurs de concentrations inhibitrices (CI 50) des extraits pharmaceutiques et les flavonoïdes totaux (**Figure 96**). Les teneurs les plus importantes sont notées dans les Formes et Préparations les plus actives : Fleurs séchées (2,17 g /100 g MS), Sommités fleuries séchées (2,01 g /100 g MS), Arkotitrat® (1,86 g /100 g MS) et Teinture (1,74 g/100 g MS). Mais les teneurs sont proches entre elles alors que les différences d'activité sont nettes. L'Extrait fluide et le Titrex® contiennent des teneurs plus faibles (1,49 et 1,06 g/100 g MS).

Pour les flavonoïdes individuels, c'est avec l'hypéroside que la relation teneur-activité ressort le mieux. Nous constatons ainsi que la forme la plus active, la Fleur séchée, contient une teneur maximale d'hypéroside (1,67 g/100 g MS) suivie par les Sommités fleuries séchées (1,22 g/100 g MS), l'Arkotitrat® (1,2 g /100 g MS), la Teinture (0,51 g /100 g MS), l'Extrait fluide (0,424 g/100 gMS) puis le Titrex® (0,198 g/100 g MS). Rappelons que l'hypéroside domine dans les organes reproducteurs contrairement aux dérivés de vitexine qui est plus élevé dans les feuilles.

Malgré les proportions relativement importantes en vitexine-2''-O-rhamnoside dans nos extraits (fleurs séchées : 0,4 g/100 g MS, sommités fleuries séchées : 1,01 g /100 g MS, Arkotitrat® : 0,634 g/100 g MS, Teinture : 0,51 g /100 g MS, Extrait fluide : 0,424 g /100 g MS et Titrex® : 0,198 g /100 g MS) nous n'avons trouvé aucune corrélation avec les valeurs de CI 50 mesurées.

Il en va de même pour l'isoquercitroside dont les teneurs sont beaucoup plus basses que celles des autres flavonoïdes (les teneurs variant entre 0,15 g pour les sommités fleuries et 0,02 g/100 g MS pour le Titrex®). Son influence sur l'ensemble de l'activité antioxydante est vraisemblablement faible.

L'acide chlorogénique est ici encore (comme dans les différents organes de plante et les cultures cellulaires) l'acide phénol majoritaire dans les formes et préparations pharmaceutiques commerciales. Les teneurs sont élevées pour les formes les plus actives : fleurs séchées (2,92 g/100 g MS), sommités fleuries séchées (1,83 g/100 g MS) et Arkotitrat® (1,14 g/100 g MS) (**Figure 97**). Des quantités moins importantes ont été mesurées dans la Teinture d'Aubépine (0,90 g/100 g MS) et l'Extrait fluide (0,79 g/100 g MS). A l'image d'autres classes de polyphénols, l'acide chlorogénique se trouve en quantité plus faible dans le Titrex® avec 0,63 g/100 g MS. D'après ces résultats, il

semble donc exister une relation nette entre les teneurs en acide chlorogénique et les activités antioxydantes.

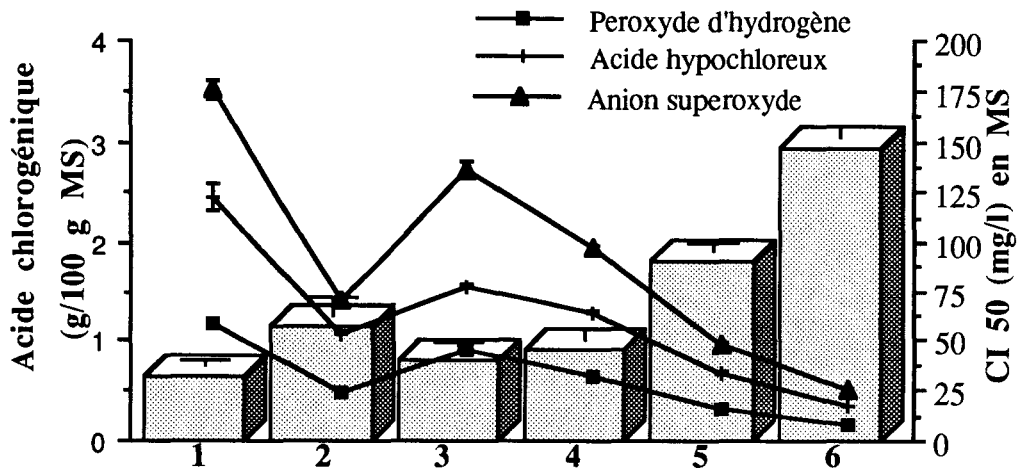


Figure 97 : Relation entre les teneurs en acide chlorogénique dans les extraits totaux des formes pharmaceutiques et commerciales (1 : Titrex®, 2 : Arkotitrat®, 3 : Extrait fluide, 4 : Teinture, 5 : Sommités fleuries séchées, 6 : Fleurs séchées) et valeurs de concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et des anion superoxyde

Conclusions

- ➡ Les trois formes les plus actives sont dans l'ordre la **fleur séchée**, les **sommités fleuries séchées** et l'**Arkotitrat®**. Les deux formes galéniques de la Pharmacopée sont moins antioxydantes, la **Teinture** étant plus efficace que l'**Extrait fluide**. Le **Titrex®** est la préparation la moins antioxydante.
- ➡ Nous retrouvons pour les formes pharmaceutiques une corrélation entre les **phénols totaux** et les **valeurs de CI₅₀**. A une teneur élevée en polyphénols correspond très souvent une forte activité antioxydante. Par ailleurs il semble que les composés les plus influents soient les proanthocyanidines totales, le dimère B2, la (-) épicatechine, l'hypéroside et l'acide chlorogénique, ce qui rappelle les résultats obtenus pour les effets antilipoperoxydants.
- ➡ Le mode d'obtention, le titre alcoolique du solvant utilisé lors de l'extraction industrielle et les opérations de concentration qui y sont liées, y compris la nébulisation, jouent certainement un rôle prépondérant dans la composition du produit final, laquelle se reflète dans l'activité antioxydante.

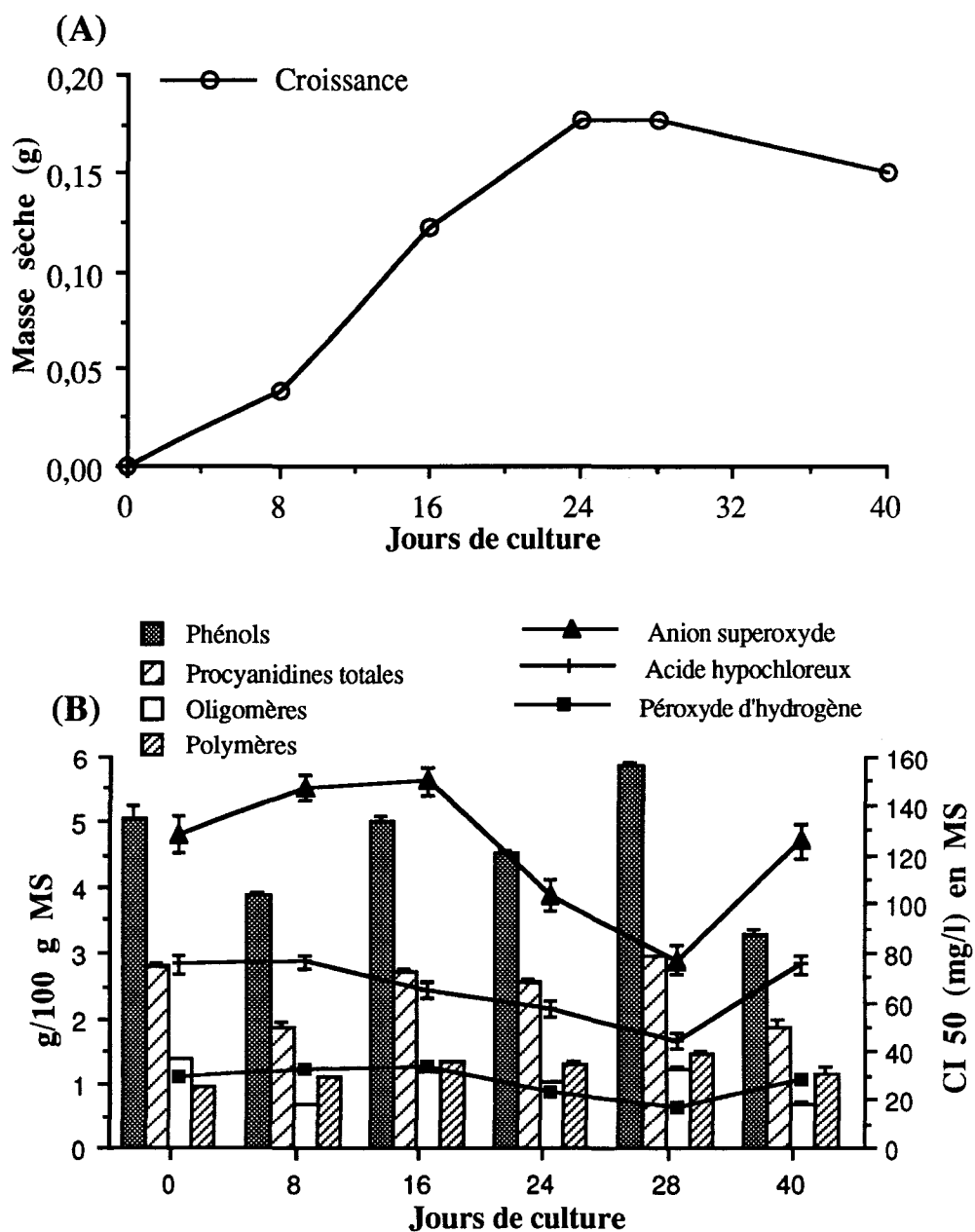


Figure 98 : Croissance des colonies tissulaires après 8, 16, 24, 28 et 40 jours de culture (A) et relation entre les teneurs en polyphénols (B) : phénols totaux, proanthocyanidines totales, proanthocyanidines oligomères, proanthocyanidines polymères des extraits et les valeurs des concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde (B).

III. CULTURES CELLULAIRES

Activités de piégeage des espèces réactives de l'oxygène

Les études d'activités antioxydantes des extraits de plante fraîche et de préparations pharmaceutiques d'Aubépine ont montré des effets très intéressants, corrélables à certains composés phénoliques. Il nous a donc paru intéressant d'effectuer une étude similaire à partir de cultures cellulaires. L'étude a été réalisée uniquement sur des extraits totaux provenant de colonies tissulaires; les "phases acétate d'éthyle" (cf. **Figure 16**) s'étant montrées peu actives.

L'étude du piégeage de $O_2^{\circ-}$, de H_2O_2 et de $HOCl$ a porté sur des colonies tissulaires, entretenues pendant plus de 2 ans. Des prélèvements ont été effectués régulièrement au cours d'une subculture de 40 jours : tous les 8 jours jusqu'au 24^{ème} jour (début du palier de croissance maximale), puis au 28^{ème} jour (croissance optimale et production phénolique maximale) et au 40^{ème} jour (fin de culture)(cf. **les polyphénols *in vitro***).

Les valeurs de concentrations inhibitrices (CI 50) restent relativement constantes entre la date de la mise en culture (jour 0) jusqu'au 16^{ème} jour dans les trois systèmes d'analyse des activités antioxydantes (**Figures 98-99**). Cette période se traduit par un début de croissance cellulaire (jour 0-12) suivie d'une phase exponentielle de croissance (jour 12-16). Une diminution de la CI50 à partir du 16^{ème} jour devient très nette au 24^{ème} jour pour atteindre une valeur minimale au 28^{ème} jour de culture qui correspond à l'activité antioxydante la plus importante. La masse de la matière sèche des colonies tissulaires est alors optimale. Elle diminue ensuite parallèlement à l'activité antioxydante. Malgré la similitude des courbes de CI50 pour les trois systèmes, celle due au piégeage de l'anion superoxyde paraît plus accentuée.

- Nous avons par la suite essayé de corrélér les valeurs de CI50 avec les teneurs en composés phénoliques.

Alors que la production en polyphénols baisse dès la mise en culture après 16 jours, les cellules qui sont en phase exponentielle de croissance présentent une première étape d'augmentation des teneurs en phénols (**Figure 98**). Dans l'extrait correspondant, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les valeurs de CI50 et les teneurs élevées en phénols totaux, en proanthocyanidines totales et oligomères, en (-) épicatechine et en dimère B2. Cet extrait, riche en composés les plus actifs, présenterait donc théoriquement tous les paramètres nécessaires pour posséder une activité antioxydante importante. Les faibles activités diffèrent radicalement de celles observées dans le cas de l'Aubépine *in vivo* et des Formes et Préparations pharmaceutiques.

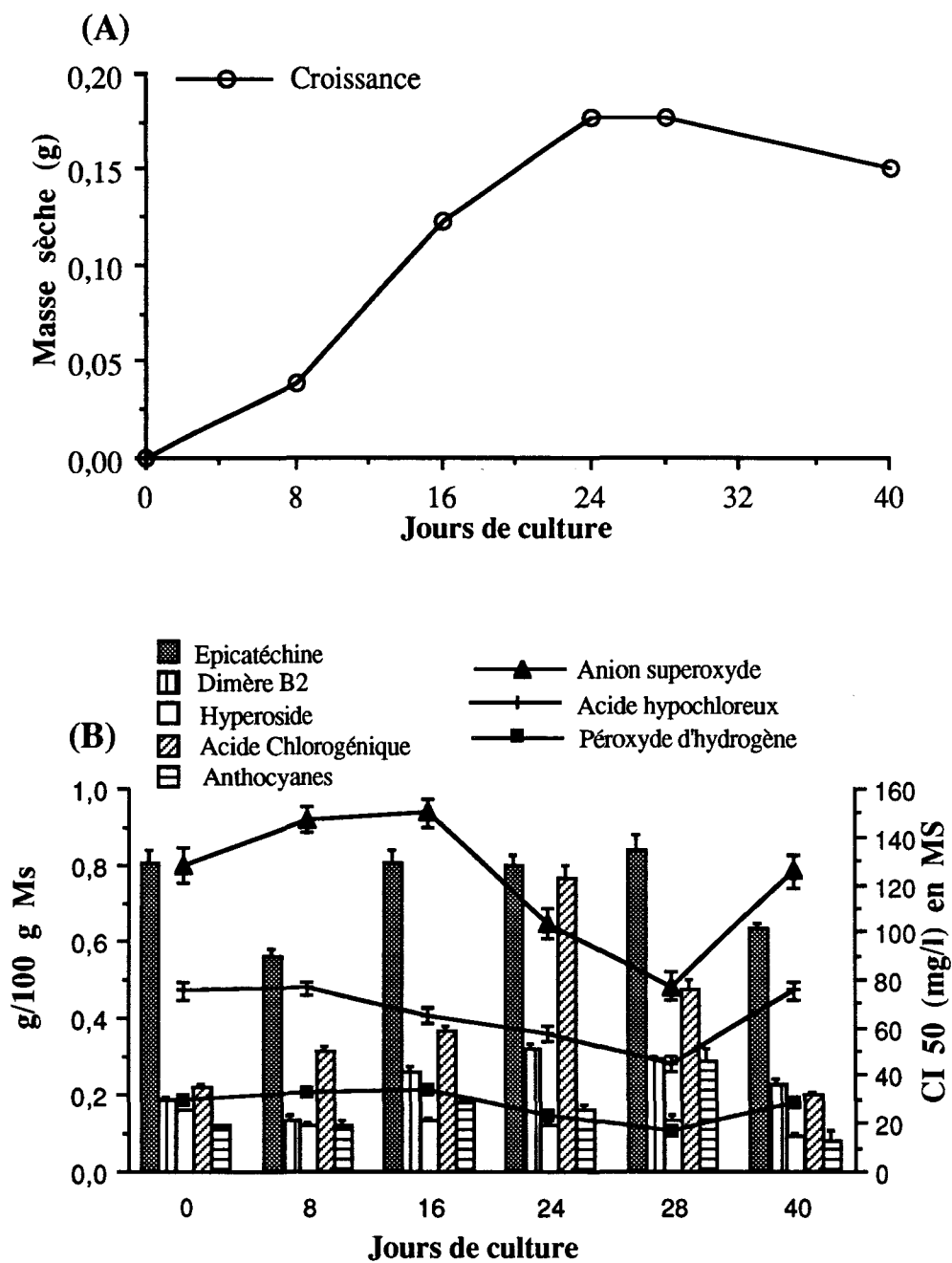


Figure 99 : Croissance des colonies tissulaires après 8, 16, 24, 28 et 40 jours de culture (A) et relation entre les teneurs en polyphénols : dimère B2, (-) épicatechine, hypéroside, acide chlorogénique et anthocyanes des extraits totaux et les valeurs des concentrations inhibitrices (CI₅₀) calculées à partir des activités de piégeage du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et de l'anion superoxyde (B).

Paradoxalement l'extrait issu du 24^{ème} jour de culture (**Figure 98-99**) montre une action antioxydante en forte progression alors que les teneurs en phénols totaux et proanthocyanidines totales et oligomères sont moins élevées. Par contre la (-) épicatechine, le dimère B2 et surtout l'acide chlorogénique sont en proportions plus importantes. Rappelons qu'au 24^{ème} jour de culture les colonies tissulaires sont en fin de croissance exponentielle.

Le 28^{ème} jour de culture combine une croissance maximale, une teneur en phénols optimale et l'activité antioxydante la plus importante. Nous avons à ce stade (**Tableau 24**) un maximum de phénols totaux, de proanthocyanidines totales et oligomères (qui ne diffèrent pourtant pas beaucoup de celles du 16^{ème} jour) et de (-) épicatechine ainsi que des teneurs élevées en dimère B2 et en acide chlorogénique.

Conclusion

Ces résultats nous permettent d'insister sur les points suivants :

- ➡ L'activité antioxydante maximale est mesurée dans des colonies tissulaires cultivées après 28 jours. Cette période correspond à une croissance cellulaire et une production polyphénolique maximales.
- ➡ Le parallélisme le plus net entre les valeurs de CI₅₀ et les teneurs en phénols semble se situer au début de la phase de croissance (jour 0-8) et plus particulièrement à la période où un palier de croissance est atteint (24^{ème} - 28^{ème} jours).
- ➡ Malgré que la composition en phénols soit plus simple pour les cultures cellulaires par rapport aux organes *in vivo*, des difficultés subsistent pour relier les activités antioxydantes et les teneurs en phénols. Ceci est spécialement le cas pour l'extrait issu des colonies tissulaires prélevées après 16 jours de culture. Certains constituants parmi les plus actifs habituellement (B2, (-) épicatechine, proanthocyanidines totales) qui sont présents à des teneurs élevées, semblent avoir moins d'influence sur l'activité.
- ➡ Par comparaison avec le bouton floral *in vivo*, qui contient le tissu d'origine (ovaire), les valeurs de CI₅₀ pour les extraits issus des colonies tissulaires montrent des activités plus faibles en particulier dans les essais concernant l'acide hypochloreux et l'anion superoxyde. Rappelons néanmoins que les colonies tissulaires ont des teneurs globales en phénols totaux et en proanthocyanidines totales inférieures à celle des boutons floraux et que ces colonies tissulaires

Jours	Phénols totaux (g)	Proanthocyanidines totales	Proanthocyanidines oligomères	Proanthocyanidines polymères	Dimère B2	(-) Epicatechine	Acide chlorogénique	Anthocyanes	Hypéroside	H ₂ O ₂ mg de MS	HOCl mg de MS	O ₂ ^{•-} mg de MS
0	5,04	2,80	1,41	0,97	0,18	0,80	0,22	0,12	0,16	29,36	75,26	127,72
8	3,88	1,88	0,68	1,11	0,13	0,56	0,31	0,12	0,12	33,48	76,71	147,00
16	4,96	2,70	1,21	1,34	0,26	0,81	0,37	0,18	0,14	34,63	64,88	150,28
24	4,54	2,56	1,03	1,30	0,32	0,80	0,77	0,16	0,12	23,67	57,66	103,20
28	5,89	2,94	1,22	1,49	0,29	0,84	0,48	0,29	0,14	17,59	44,52	77,22
40	3,28	1,88	0,68	1,16	0,23	0,63	0,20	0,077	0,09	28,70	75,50	125,43

Tableau 24 : Composition phénolique en g/ 100 g MS et valeurs de CI₅₀ en mg de MS calculées à partir de l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de l'acide hypochloreux (HOCl) et de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) des extraits de colonies tissulaires cultivées pendant de 40 jours sous un éclairage continu. Les extraits sont issus de prélèvements effectués au jour 0 (mise en culture), au jour 8 (phase de production active de phénols), au jour 16 (palier de production des phénols), au jour 28 (production maximale de phénols) et au jour 40 (fin de culture)

réunissent presque exclusivement les molécules qui, dans les essais des standards, ont fourni les meilleurs effets de piégeage.

- ▣➔ Attribuer une activité à des composés particuliers reste une démarche paradoxalement plus difficile pour ces colonies tissulaires que pour les organes *in vivo* et les préparations pharmaceutiques pourtant bien plus complexes.

Enfin, nous voulons insister sur le fait que les activités antioxydantes doivent être reliées essentiellement aux teneurs globales et à la somme des effets antioxydants des différentes catégories de composés plutôt qu'à des composés individuels.

CHAPITRE IV

DISCUSSION
ET
CONCLUSION

I. LES POLYPHENOLS DE L'AUBEPINE *IN VIVO*

1. L'Aubépine fraîche

Parmi les actions pharmacologiques de l'Aubépine, les effets neuro- et cardiosédatif, et l'augmentation du flux coronarien ont principalement été attribués aux polyphénols (Pietta *et al.*, 1986, Bézanger-Beauquesne *et al.*, 1990). Les deux espèces utilisées en Pharmacie pour leurs fleurs et sommités fleuries (*Crataegus monogyna* et *Crataegus laevigata*) sont très riches en polyphénols, principalement en acides phénols, en proanthocyanidines, en catéchines et en flavonoïdes.

Dans la littérature, les nombreuses études sur la composition polyphénolique des drogues utilisées sont surtout liées à la normalisation du contrôle analytique et à l'attribution des actions connues aux phénols majoritaires.

Depuis quelques années, les polyphénols végétaux sont de plus en plus étudiés pour leurs effets antioxydants et antiradicalaires. Leur avantage, comme en témoigne la littérature, est leur origine naturelle qui sert parfois d'argument pour les valoriser en usage alimentaire par rapport aux additifs antioxydants de synthèse.

Notre étude des phénols de la plante *in vivo* a été réalisée dans le but de mettre en relation les constituants (qualité, quantité) avec les activités antioxydantes au cours des différentes phases du cycle de développement.

■ Les deux principales caractéristiques de ce travail, résident dans **l'étendue de l'échantillonnage** récolté et d'autre part **dans les constituants phénoliques** étudiés.

□ L'échantillonnage présente une originalité particulière car nous avons prélevé systématiquement les organes foliaires et reproducteurs de la plante, sur les mêmes pieds et sur le même site au cours d'un cycle complet de développement, de mars à septembre (**Tableau 10**). Ces prélèvements systématiques étaient nécessaires avant d'affirmer dans une comparaison entre la plante *in vivo* et des cultures cellulaires *in vitro* que des substances absentes dans un cas étaient produites dans l'autre cas. Enfin, la littérature sur la composition phénolique de l'Aubépine est presque toujours consacrée aux boutons floraux, fleurs et sommités fleuries utilisés en Pharmacie, donc à une période de récolte précise et restreinte.

□ L'autre caractéristique de cette étude est l'analyse de la composition polyphénolique des échantillons qui a porté sur :

- des acides phénols représentés par **l'acide chlorogénique**,
- des flavonoïdes comprenant **l'hypéroside, la vitexine-2''-O-rhamnoside, l'isoquercitroside**. Les dérivés mineurs n'ont pas été pris en compte,

- des catéchines, plus particulièrement la (-) épicatechine,
- des **proanthocyanidines** que nous avons pu classer en (Figure 16) :
 - **proanthocyanidines totales** dans les extraits totaux,
 - **proanthocyanidines oligomères** présentes dans les phases acétate d'éthyle et dans lesquelles dominent les oligomères dont le **dimère B2** pour lequel nous disposons d'un témoin hors commerce séparé par nos soins,
 - **proanthocyanidines polymères** trouvées dans les phases aqueuses résiduelles.

Plusieurs de ces substances ont fait l'objet d'une attention particulière à cause, soit de leur abondance déjà connue dans la plante, soit de leur bonne hydrosolubilité compatible avec les systèmes de mesure d'activité ou à cause d'actions antiradicalaires déjà citées dans la littérature.

Le bilan de nos travaux sur la composition phénolique et son évolution dans les organes *in vivo* implique une série de **commentaires** :

- **Sur le plan qualitatif**, les substances détectées n'apportent pas de nouveauté par rapport à ce qui est déjà connu.
- **Sur le plan de l'évolution quantitative** des phénols durant le cycle de développement nous ferons un certain nombre de remarques.

Pour les feuilles, les teneurs en **phénols totaux** sont importantes et se situent entre 5,374 et 7,655 g/ 100 g MS. Les très jeunes feuilles (F2) sont les plus riches (Tableau 18).

Pour les organes reproducteurs, les valeurs s'établissent entre 4,00 et 9,966 g/100 g MS (bouton floral). On peut donc considérer l'Aubépine comme très riche en phénols et nous remarquerons que les teneurs maximales sont notées dans les organes très jeunes.

Les teneurs des différents **groupes de proanthocyanidines** sont également élevées (Tableau 18). Notons que les **proanthocyanidines totales** (entre 4,307 et 2,393 g/ 100 g MS) diminuent durant le cycle végétatif dans les organes foliaires, le bourgeon ayant la teneur maximale. Cette baisse se retrouve dans les organes reproducteurs (de 4,033 pour le bouton floral à 1,249 g/100 g MS pour le fruit rouge).

Les proanthocyanidines oligomères présentent des variations moins importantes et ne suivent pas la tendance citée pour les proanthocyanidines totales. On trouve pour les organes foliaires (Tableau 20) des valeurs de 0,890 g/100 g MS à 1,454 g/100 g MS pour les très jeunes feuilles (F2). Pour les organes reproducteurs, les teneurs sont plus variables, allant de 0,605 à 1,489 g/100 g MS dans le cas du bouton floral (A).

Les proanthocyanidines polymères représentent une part majoritaire des proanthocyanidines totales dans tout les cas, et on peut noter leur forte teneur dans les bourgeons (Figure 31) tout comme dans le bouton floral (Figure 32).

Le dosage de **la proanthocyanidine B2**, dimère majoritaire, montre dans les organes foliaires une évolution différente de celle des procyanidines oligomères et totales (Tableau 18) . Les valeurs s'échelonnent de 0,102 g/100 g MS dans le bourgeon à un maximum de 0,400 g/100 g MS dans les jeunes feuilles (F3). Pour les organes reproducteurs, les teneurs vont de 0,098 g/100 g MS à un maximum de 0,568 g/100 g MS dans les fruits verts. Rappelons que Thompson *et al.*, (1972) indiquent des valeurs allant de 0,1 à 0,5% pour le fruit vert. On peut donc considérer les deux organes les plus riches, les jeunes feuilles (F3) et le fruit vert, comme des sources potentielles intéressantes pour la séparation de dimère B2 standard.

Les teneurs en (-) **épicatechine** ne suivent pas l'évolution des proanthocyanidines totales (Figures 33-34) et les variations sont parallèles à celles du dimère B2 dans tous les cas (Tableau 18). Les teneurs pour les feuilles vont de 0,436 g/100 g MS à un optimum de 1,467 g/100 g MS dans le cas des jeunes feuilles F3, et pour les organes reproducteurs, de 0,632 g/100 g MS à 3,281 g/100 g MS dans le cas des fruits verts.

Les flavonoïdes totaux (Tableau 18, Figures 35-36), diminuent durant le cycle végétatif. Les teneurs s'étagent dans les feuilles entre 1,303 g et un optimum de 2,523 g/100 g MS pour les très jeunes feuilles (F2). Pour les fleurs et fruits les limites vont de 0,260 à 1,025 g/100 g MS pour le bouton floral. Lors des dosages des **flavonoïdes principaux**, nous avons constaté que :

→ pour les feuilles, **la vitexine 2"-O-rhamoside** prédomine avec des valeurs maximales aux stades des très jeunes feuilles et jeunes feuilles (F2 et F3, Figure 36). L'hypéroside est moins abondant.

→ pour les fleurs et les fruits, c'est **l'hypéroside** qui domine dans tous les cas, l'organe le plus riche étant la fleur épanouie (1,286 g/100 g MS).

Enfin, pour l'**acide chlorogénique**, on peut remarquer que dans le cas des feuilles son évolution ressemble à celle de la (-) épicatechine (Tableau 18), en passant par un maximum de 1,320 g/100 g MS dans les jeunes feuilles (F3). Par contre, les variations dans les fleurs et les fruits sont différentes et l'organe le plus riche est le bouton floral avec 1,617 g/100 g MS.

□ Les très jeunes feuilles (F2) et le bouton floral constituent manifestement les tissus les plus intéressants par leur hautes teneurs en divers phénols, dont les flavonoïdes, proanthocyanidines et catéchines. Le bouton floral est l'une des parties employées en Pharmacie. Ces deux tissus constituent de plus un matériel de choix pour l'installation de cultures cellulaires.

■ Enfin, pour situer nos résultats dans le contexte de la littérature sur les phénols de *Crataegus monogyna*, il faut particulièrement se rapporter à ceux de Thompson *et al.*, (1972), de Hierman *et al.*, (1986), de Kartnig *et al.*, (1987), de Petri *et al.*, (1988) et de Lamaison *et al.*, (1990 et 1991).

- Du point de vue de l'étendue de la période de végétation étudiée, notre échantillonnage est le plus large, allant du stade bourgeon (F1) au fruit mûr (D).
- Sur le plan analytique, nous trouvons en général des teneurs concordantes dans les mêmes organes, spécialement en flavonoïdes. Les différences parfois observées peuvent s'expliquer par les différences géographiques, climatiques, de traitement des organes (souvent séchés après récolte) et de méthodes d'extraction. Notre étude s'originalise par le dosage CLHP d'une proanthocyanidine bien individualisée, le dimère B2 séparé par nous. Notons que les teneurs trouvées concordent avec celles des organes définis comme une source extractive intéressante par Thompson *et al.* en 1972 (feuille, fruit vert).

En conclusion nos résultats sont en général en accord avec ceux de nos prédécesseurs, montrant que les **feuilles et fleurs** d'Aubépine monogyne sont plus riches en flavonoïdes et proanthocyanidines quand elles sont **récoltées au stade du bouton floral** et confirment la période recommandée par la Pharmacopée Française pour la récolte.

Il faut remarquer que le **fruit vert**, non utilisé par la Pharmacopée, vient s'ajouter à ces organes intéressants par leurs teneurs en proanthocyanidines oligomères, dimère B2, épicatechine et acide chlorogénique.

L'Aubépine est donc une source privilégiée pour l'obtention de fractions enrichies en certaines catégories ou sous-catégories de phénols et également pour l'isolement de standards comme le dérivé de vitexine acétylé et surtout la proanthocyanidine dimère B2 présente en quantités non négligeables.

2. Les Préparations Pharmaceutiques commerciales

L'Aubépine est utilisée en Phytothérapie sous un éventail de formes incluant, parmi les plus courantes :

- les fleurs et sommités fleuries inscrites à la Pharmacopée, pour emploi sous forme classique de tisanes
- les formes galéniques de la Pharmacopée (Teinture et Extrait fluide) destinées à être utilisées seules ou dans des préparations plus complexes
- diverses préparations commerciales destinées le plus souvent à la préparation de gélules comme la plante fraîche cryobroyée (Arkotitrat[®]), les extraits hydro-éthanoliques nébulisés (Titrex[®]) qui sont parmi les plus demandés ou d'autres présentations (Suspensions Intégrales de Plantes Fraîches : S.I.P.F[®])...

Il était difficile dans le cadre de notre étude sur la composition phénolique et les effets antioxydants des tissus *in vivo* et *in vitro* de ne pas ajouter celle des présentations commerciales pharmaceutiques que l'on vient de citer et qui proviennent toutes de la plante séchée sauf la poudre cryobroyée.

Nous avons exposé dans le chapitre "Matériel et Méthodes" les différents modes d'obtention. Ceux-ci comportent des éléments pouvant influencer de façon importante sur la composition phénolique finale, donc vraisemblablement sur l'activité : il s'agit en particulier du titre alcoolique lors de l'extraction et des étapes éventuelles de concentration (cas de l'Extrait fluide et des nébulisats). Pour ces préparations, la matière première était évidemment de qualité et conforme aux normes minimales de la Pharmacopée comme les fiches de contrôle le montrent. Dans tous les cas ce sont toujours **les fleurs séchées, les sommités fleuries séchées, le cryobroyat et la Teinture** qui se sont avérés être les plus riches en phénols.

Les teneurs en **phénols totaux** et en **proanthocyanidines totales** sont les plus importantes dans les deux drogues sèches (fleurs et sommités fleuries) et dans le cryobroyat. Viennent ensuite la Teinture, le nébulisat et enfin l'Extrait fluide qui est le moins riche. Les **proanthocyanidines oligomères** sont plus abondantes dans le cryobroyat que dans les fleurs et sommités fleuries, ce qui semble bien indiquer que les oligomères qui sont fragiles ont été

mieux respectés par congélation-broyage que par séchage. Parmi les oligomères, **le dimère B2** domine dans les fleurs (0,84 g /100 g MS) où il semble avoir été préservé au séchage. Par contre les teneurs diminuent nettement dans les autres préparations.

Les écarts des teneurs en **flavonoïdes totaux** des différentes préparations (entre 1,91 g et 10,6 g /100 g MS pour les sommités fleuries et le cryobroyat) sont moins importants que dans le cas des proanthocyanidines mais les teneurs en **hypéroside** varient plus nettement (entre 1,67 g et 0,20 g /100 g MS pour les fleurs et le nébulisat). Des teneurs assez importantes en **vitexine-2''-O-rhamnoside** ont généralement été observées.

Enfin **l'acide chlorogénique** est en général abondant dans toutes les formes pharmaceutiques, plus particulièrement les fleurs séchées, sommités fleuries et le cryobroyat.

II. LES POLYPHENOLS DE L'AUBEPINE *IN VITRO*

Les **jeunes feuilles** et **boutons floraux** de la plante, qui sont les organes les plus riches en polyphénols, ont servi de source pour initier des cultures *in vitro* avec pour objectif d'obtenir des lignées cellulaires productrices en phénols bioactifs.

Parmi les colonies tissulaires installées, cinq ne présentaient que des teneurs faibles en polyphénols avec essentiellement une production de dérivés triterpéniques sous forme d'hétérosides et aglycones libres. Ces derniers correspondent vraisemblablement à l'acide ursolique et à l'acide oléanolique. L'étude n'a pas été poursuivie.

Par contre les colonies tissulaires **issues d'ovaires**, cultivées sur un milieu B₅ de Gamborg contenant du 2,4-D et de la kinétine présentent de manière précoce des nodules rouges, colorés par des anthocyanes dont nous avons noté par ailleurs la relation avec la synthèse de phénols (Moumou *et al.*, 1992b). Cela nous a conduit à étudier cette colonie tissulaire d'une part en photopériode 16h lumière/8h obscurité et d'autre part à la lumière continue qui était susceptible d'exalter encore le phénomène de synthèse des phénols.

■ Aspect qualitatif.

Ces colonies tissulaires issues d'ovaires présentent comme les cinq autres des saponosides triterpéniques susceptibles de provoquer ultérieurement des difficultés dans les extractions et les séparations des composés purifiés mais aussi des polyphénols bien qu'en nombre plus réduit que dans l'organe d'origine. Nous avons pu montrer la présence :

- ➔ **d'anthocyanes** qui sont en cours d'étude actuellement et dont le principal serait la cyanidine-3- ou -5-O-galactoside. Ces dérivés sont absents ou non détectables dans le bouton floral frais. Il est manifeste que les anthocyanes

ont été ici comme dans le cas des cultures *in vitro* de Sarrasin des marqueurs visuels de la présence de phénols. Ce sont eux qui ont permis de séparer, parmi les souches installées à partir de différents tissus, celle qui a présenté la production la plus importante en polyphénols,

- **de dérivés de flavane-3-ols** (présents également *in vivo*) avec des proanthocyanidines parmi lesquelles des oligomères où dominent le **dimère B2** et la (-) **épicatéchine**,
- **de flavonoïdes** moins nombreux qu'*in vivo*, réduits à l'**hypéroside** accompagné de traces **d'isoquercitroside**. Remarquons que l'hypéroside qui domine *in vitro* est aussi le produit dominant dans les boutons floraux et les fleurs. Nous n'avons pas détecté *in vitro* de dérivés de C-glucosyl-flavones (vitexine-2''-O-rhamnoside, vitexine...) présents dans les feuilles *in vivo*.
- **d'un acide phénol** dominant comme dans la plante : l'**acide chlorogénique**.

■ Aspect quantitatif et évolution.

→ *La première étude réalisée sur 63 semaines* au cours de la période d'installation des colonies tissulaires permet de comparer deux conditions d'illumination (lumière 16h /8h obscurité et lumière continue) et implique une remarque générale. La lumière continue a joué un rôle déterminant sur la production des polyphénols en favorisant d'abord la synthèse d'anthocyanes. Nos analyses ont ensuite pratiquement toujours confirmé que les teneurs étaient plus élevées dans les colonies cultivées en lumière continue. Cette influence de la lumière confirme par exemple les résultats obtenus par d'autres chercheurs chez le Sarrasin aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Tohver *et al.*, 1969, Margna *et al.*, 1971, 1973, Moumou *et al.*, 1992b).

Les anthocyanes, dont nous avons souligné le rôle de marqueurs augmentent rapidement sous l'influence de la lumière et la teneur optimale s'observe lorsque les cultures sont exposées à la lumière continue (Figure 58). Elles sont actuellement en cours d'étude et font l'objet d'un travail plus approfondi sur la détermination de la structure des composés majoritaires.

Les proanthocyanidines quelle que soit leur catégorie sont en quantités nettement plus importantes sous lumière continue et on constate que les valeurs optimales obtenues *in vitro* se rapprochent de celles observées *in vivo* dans le bouton floral, ce qui constitue en soi un résultat intéressant. Ainsi :

- pour les **proanthocyanidines totales** les teneurs sont supérieures à 4 g/100 g MS (semaine 45) contre 4,033 g/100 g MS dans le bouton floral.
- Pour les **oligomères** : 1,3 g/100 g MS (valeur moyenne des semaines 45 à 63) à comparer aux 1,489 g/100 g MS du bouton floral.
- pour les **polymères**, la moyenne se situe autour de 1,02 g/100 g MS alors que la teneur dans le bouton floral est de 2,478 g/100 g MS.
- pour la **proanthocyanidine dimère B2**, on note des variations importantes avec un maximum à la 45^{ème} semaine de 0,232 g/100 g MS qu'il faut rapprocher de la valeur de 0,342 g/100 g MS du bouton floral. Nous avons également remarqué que l'augmentation des proanthocyanidines ne se produit qu'après un temps de latence après la mise de la culture à la lumière.

La (-) **épicatechine** est produite en quantité maximale en lumière continue (2,988 g/100 g MS) à la 45^{ème} semaine (Figure 57), ce qui équivalut à plus de 2 fois la teneur du bouton floral (1,4 g/100 g MS). Nous avons souvent noté une courbe d'évolution analogue entre la proanthocyanidine dimère B2 et la (-) épicatechine (Figures 56-57) qui ne nous étonne pas dans la mesure où la littérature signale dans les plantes des teneurs plus fortes en dimère B2 quand la (-) épicatechine est la catéchine dominante.

Pour les **flavonoïdes**, nous ne pouvions prendre en compte les valeurs globales comme dans le cas des organes *in vivo* mais seulement considérer les teneurs d'un composé dominant, pratiquement seul à être représenté dans les colonies tissulaires : **l'hypéroside**. Notons que sa production augmente immédiatement sous l'effet de la lumière (Figure 60) et que les valeurs ici encore sont maximales en lumière continue (1 g/100 g MS à la 63^{ème} semaine) alors que le bouton floral en contient 0,726 g /100 g MS.

Enfin pour **l'acide chlorogénique**, on retrouve des résultats similaires aux autres constituants. La teneur optimale observée en lumière continue (0,971 g/100 g MS à la 45^{ème} semaine) est cependant inférieure à celle du bouton floral (1,617 g/100 g MS).

Il faut néanmoins rappeler que certaines de ces valeurs maximales correspondent à des augmentations temporaires (pics) et qu'il semble parfois plus raisonnable de se référer aux valeurs moyennes de la production.

→ Ensuite, *l'étude durant une subculture de 40 jours* a permis de dégager dans l'évolution des colonies tissulaires une période optimale de production se

situant entre le 24^{ème} et le 32^{ème} jour de culture pour pratiquement tous les composés et catégories étudiés. Elle correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance, donc à une biomasse importante. La plupart des valeurs maximales ont été mesurées à cette période (phénols totaux : 5,089 g/100 g MS, proanthocyanidines totales : 2,95 g/100 g MS, (-) épicatechine : 0,830 g/100 g MS, hypéroside : 0,143 g /100 g MS, acide chlorogénique : 0,769 g/100 g MS, anthocyanes : 0,163 g /100 g MS).

➔ *Les suspensions cellulaires* initiées à partir de ces colonies tissulaires se sont avérées beaucoup plus riches en (-) **épicatechine** (1,641 g/100 g MS), en **proanthocyanidine dimère B2** (0,523 g/100 g MS) et en **oligomères de proanthocyanidines** (1,982 g/100 g MS) (Figures 74-77). Nous avons néanmoins constaté une diminution de la quantité d'anthocyanes et une quasi-absence de dérivés flavonoïdiques. Les suspensions cellulaires constitueraient donc **une source privilégiée** de composés bioactifs. En effet les teneurs en dérivés de flavane-3-ols (catéchines, proanthocyanidines) de ces suspensions cellulaires placent à un niveau de rendement *in vitro* relativement élevé parmi ceux qui sont cités dans la littérature. C'est également dans l'étude cinétique des suspensions cellulaires que nous avons pu **dissocier** pour la première fois **la période** de production maximale de la **proanthocyanidine dimère B2** de celle de la (-) **épicatechine**.

Par comparaison au bouton floral les productions de certains composés sont supérieures dans les suspensions cellulaires. C'est notamment le cas pour les **oligomères de proanthocyanidines** (suspensions cellulaires : 1,98 g/100 g MS, bouton floral : 1,49 g) et pour la **proanthocyanidine dimère B2** (suspension cellulaire : 0,52 g, bouton floral : 0,34 g/100 g MS) (Tableau 16). Nous devons insister particulièrement sur la production importante en proanthocyanidines oligomères qui rend ces tissus intéressants dans le cadre des perspectives à donner à ce travail. Les suspensions cellulaires continuent actuellement à être suivies durant leur évolution et elles seraient des outils de choix pour envisager une optimisation de la production en phénols soit par l'intermédiaire d'éliciteurs comme le chitosane ou des extraits fongiques, soit par l'apport de précurseurs.

■ Il est par ailleurs nécessaire de situer ces productions par rapport à celles trouvées dans la littérature.

Dans le cas de l'Aubépine, Schrall et Becker en 1977 ont obtenu des catéchines et des proanthocyanidines à partir de colonies tissulaires et de suspensions cellulaires de *Crataegus monogyna*. Ils ont surtout étudié l'influence de différentes hormones (ANA, 2,4-D, kinétine et acide gibbérellique) sur les teneurs en phénols totaux et en proanthocyanidines. Ils ont ainsi observé une meilleure production de ces composés (phénols totaux : 130 mg/100 g MS, proanthocyanidines totales : 90 mg/100 g MS) en présence d'ANA.

En 1993 Kartnig *et al.*, ont établi des cultures cellulaires à partir de jeunes bourgeons de *Crataegus monogyna* et ont identifié toute une série de flavonoïdes hétérosidiques ainsi que des aglycones : la vitexine, la vitexine-2''-O-rhamnoside, la rutine, l'hypéroside, l'apigénine, la lutéoline et la quercétine. Nous en avons détecté beaucoup moins. Des proanthocyanidines totales ont également été observées par ces chercheurs mais il faut signaler que les teneurs mesurées (170 mg/100 g MS) étaient nettement inférieures à nos propres résultats (3,3 g/100 g MS) tout en rappelant que les conditions de culture et les explantats utilisés étaient également différents. Ces auteurs soulignent par ailleurs que les cultures cellulaires produisent des quantités plus importantes d'oligomères que de polymères de proanthocyanidines. Ce point est intéressant et ils émettent l'hypothèse que la tendance à la polymérisation de ces composés serait moindre dans les cultures cellulaires que dans la plante.

Nos résultats ne semblent pas conforter totalement ces observations. En effet, comme dans la plante, nos colonies tissulaires contiennent des proportions élevées de proanthocyanidines polymères. Ce n'est que dans les suspensions cellulaires que nous observons la prédominance des oligomères.

En comparant les teneurs des cultures issues d'autres plantes classiquement connues comme riches en polyphénols, nos résultats ne montrent pas toujours des productions aussi élevées. Un exemple est celui de cultures cellulaires de *Marchaerantha gracilis* qui produisent jusqu'à 3 % de la matière sèche en anthocyanes (Harborne, 1980). De même des suspensions cellulaires de *Vitis* contiennent jusqu'à 2,9 g d'anthocyanes par litre de milieu de culture (Hirosumi *et al.*, 1991).

Dans notre laboratoire une série de travaux portant sur l'optimisation des conditions de culture de colonies tissulaires de *Fagopyrum esculentum* a permis d'obtenir des quantités intéressantes de (-)épicatéchine (0,5 à 2 mg.g⁻¹ de masse sèche),

d'épicatéchine 3-O-gallate (1,5 à 6 mg.g⁻¹ de masse sèche), de proanthocyanidines dont les dimères B2 (0,6 à 1,8 mg.g⁻¹ masse sèche) et B2-3'-O-gallate (3,5 à 6 mg.g⁻¹ de masse sèche) (Moumou *et al.*, 1992c).

Des suspensions cellulaires et des cals de *Cryptomeria japonica* produisent jusqu'à 26% de proanthocyanidines par rapport à la masse sèche (Ishikura *et al.*, (1983), Teramoto *et al.*, (1985)). Des résultats impressionnants ont été obtenus à partir de suspensions cellulaires de *Pseudotsuga menziesii* qui contiennent *in vivo* des quantités importantes de catéchines et de proanthocyanidines. Ainsi Stafford *et al.*, (1980) ont obtenu un rendement de proanthocyanidines allant jusqu'à 40 g/100 g MS dans des suspensions cellulaires. Les composés produits sont principalement des catéchines, de la gallocatéchine, de l'épigallocatéchine et les procyanidines dimères B1, B2, B3 et B4. Mais cette production est cependant encore inférieure à celle des cultures de *Ginkgo biloba* qui accumulent jusqu'à 50 à 60 g de proanthocyanidines et de prodelphinidines pour cent grammes de masse sèche (Stafford *et al.*, 1986).

→ Dans une étape ultérieure nous avons essayé d'optimiser la production en polyphénols de nos cultures tissulaires. Parmi les différentes méthodes citées dans la littérature : l'incorporation de précurseurs, l'élicitation par le chitosane (Liu *et al.*, 1993) ou par des extraits fongiques (Bernards *et al.*, 1991) et l'utilisation d'inhibiteurs de croissance (Yamamoto *et al.*, 1987), nous avons choisi l'incorporation de composés en C₆-C₁ tels que l'acide gallique et l'acide shikimique. Dans notre laboratoire, un apport d'acide gallique à des colonies tissulaires de Sarrasin (Moumou *et al.*, 1992a) nous a permis d'obtenir des quantités accrues de proanthocyanidine B2-3'-O-gallate en multipliant son rendement par sept environ par rapport aux colonies tissulaires témoins. Il faut souligner que les dérivés galliques sont connus pour être des composés pharmacologiquement plus actifs que leurs homologues non estérifiés (Hatano *et al.*, 1989). De plus, les travaux de Dewick et Haslam (1969) ont démontré que l'acide shikimique est le précurseur privilégié de la formation de l'acide gallique et de ses dérivés. Ces observations sont par ailleurs confirmées par Saijo *et al.*, (1983) qui ont obtenu de l'épigallocatéchine après avoir incorporé de l'acide shikimique dans les milieux de cultures de thé (*Camellia sinensis*). Notre but, sans viser des études poussées du métabolisme, était de tenter d'obtenir des dérivés galloylés de catéchines ou de dimères.

Nos colonies tissulaires cultivées en présence d'acide shikimique, montrent une augmentation de leur croissance pour toutes les concentrations utilisées y compris les plus faibles (10 à 250 mg.l⁻¹) (Figure 65). La

concentration la plus faible (10 mg.l^{-1}) combine bien les effets stimulants sur la croissance et sur la production de polyphénols. Toutes les catégories de composés phénoliques : **les proanthocyanidines totales, oligomères, le dimère B2, la (-) épicatechine** ainsi que **l'hypéroside, l'acide chlorogénique et les anthocyanes** sont stimulés en présence d'acide shikimique (Figures 66-72). Les productions en proanthocyanidines totales sont proches (3,6 g /100 g MS) de celles du bouton floral (4 g/100 g MS). Par contre nous avons une meilleure production de (-) épicatechine dans ces colonies tissulaires (1,84 g/100 g MS) que dans l'organe d'origine (1,4 g/100 g MS). Les bons rendements en polyphénols que nous avons obtenus en présence d'acide shikimique rejoignent les observations faites par Shah *et al.*, (1978) qui ont amélioré la production des colonies tissulaires de *Crotalaria* en présence de différents acides phénols.

Par contre, les résultats obtenus en ajoutant de l'acide gallique dans les milieux de culture des colonies tissulaires se sont avérés décevants malgré quelques augmentations ponctuelles de la (-) épicatechine, du dimère B2 et de l'acide chlorogénique. L'acide gallique s'est montré toxique pour les colonies tissulaires à presque toutes les concentrations utilisées (Figure 73). Cette toxicité, marquée par une inhibition de la croissance des cellules, a été également observée par Moumou *et al.*, (1992a) dans le cas du Sarrasin.

Par ailleurs notre souhait d'obtenir une galloylation de composés polyphénoliques ne s'est pas réalisé dans cet essai. Aucun ester gallique n'a été décelé ni avec l'acide shikimique, ni avec l'acide gallique. Soulignons que les auteurs cités précédemment ont obtenu des dérivés galloylés à partir de plantes contenant déjà *in vivo* ces types d'esters. Par contre l'Aubépine *in vivo* ne contient aucun de ces dérivés. On pourrait alors comprendre l'absence de gallates dans nos cultures, celles-ci ne possédant vraisemblablement pas les équipements enzymatiques nécessaires à la formation de ces substances.

III. ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES POLYPHENOLS *IN VIVO* ET *IN VITRO*

On connaît les dommages provoqués par les radicaux libres et autres espèces réactives de l'oxygène sur les molécules biologiques tout comme leur rôle dans la dégradation des aliments. Le nombre de pathologies attribuées aux radicaux libres est important.

Parmi les molécules pouvant contribuer à reconstituer un équilibre en faveur des défenses antioxydantes de l'organisme ou pouvant servir dans la conservation des aliments, les phénols végétaux suscitent un intérêt croissant.

La littérature concernant les activités antioxydantes et antiradicalaires des phénols végétaux est abondante. Comme nous en avons donné un bref aperçu dans les rappels concernant les radicaux libres et plus particulièrement dans le tableau 9, les données concernent surtout des flavonoïdes aglycones ou hétérosidiques (en général des dérivés de flavonols), mais aussi des proanthocyanidines (oligomères faiblement polymérisés), des catéchines, divers tanins galliques plus ou moins polymérisés, des acides phénols, plus rarement des anthocyanes et des coumarines.

Lors de travaux précédents dans notre laboratoire sur les proanthocyanidines et les catéchines produites par les colonies tissulaires de Sarrasin *in vitro*, notre attention avait été attirée sur l'intérêt potentiel de certaines molécules produites, dont des esters galliques de catéchines et de proanthocyanidines oligomères.

Nos résultats expérimentaux confirment ou complètent les données analytiques sur l'Aubépine *in vivo* et les préparations pharmaceutiques tout en apportant la connaissance nouvelle du contenu phénolique de cultures tissulaires *in vitro*. Par ailleurs il était intéressant de mesurer les activités antioxydantes dans les extraits issus de ces différents tissus d'autant plus que parmi les substances présentes figuraient des dérivés déjà signalés comme actifs. De plus, dans la mesure où la plante est utilisée en thérapeutique sous forme d'extraits complexes, il devenait logique de comparer les activités antioxydantes des extraits totaux issus des différents tissus et préparations pharmaceutiques à celles de fractions moins complexes (fractions "acétate d'éthyle" ou fractions aqueuses résiduelles).

Quatre systèmes de mesure ont été employés pour tester les extraits et les standards, mais tous n'ont pas été appliqués à chaque type de matière première pour des raisons liées au déroulement du travail. Les effets antilipoperoxydants ont été mesurés en premier sur les extraits de tissus *in vivo*. Par la suite, nous avons mesuré sur des extraits de tissus *in vivo*, des préparations pharmaceutiques et des tissus *in vitro*, les effets de piégeage des espèces réactives de l'oxygène. Remarquons que ces systèmes impliquent une bonne hydrosolubilité des extraits (utilisé sous forme de lyophilisats) et des phénols standards, écartant obligatoirement des standards peu ou non hydrosolubles comme par exemple la vitexine.

La démarche consistait donc à établir, dans les extraits et fractions plus ou moins complexes, des relations entre les teneurs des différents constituants et les activités antioxydantes.

Dans les quatre systèmes, certaines des activités des molécules standards sont importantes, soit par le taux élevé d'inhibition de production du malondialdéhyde, soit par les CI_{50} obtenues dans les autres systèmes dont les valeurs sont connues pour d'autres antioxydants comme le glutathion et la N-acétyl cystéine.

Ces activités s'échelonnent à chaque fois par ordre décroissant comme suit : **proanthocyanidine B2 > (-) épicatechine > hypéroside > acide chlorogénique**. Dans l'un des systèmes nous avons pu tester la vitexine 2''-O-rhamnoside présente dans les feuilles de la plante. Elle a l'action la plus faible, la rutine étant légèrement plus active. Globalement il ressort que les dérivés de flavane-3-ols sont les plus actifs, avec un avantage net pour le dimère B2 alors que les flavonoïdes ont des actions parfois intéressantes mais plus faibles. Nos résultats pour la (-) épicatechine et le dimère B2 sont comparables à ceux obtenus par Hatano *et al.*, (1989) dans un système différent de piégeage du radical diphenylpicrylhydrazyl.

Il y a très peu de publications consacrées aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires des extraits d'Aubépine ou des molécules issues de celles-ci par fractionnement. Bonte *et al.*, (1991) ont montré l'activité antiradicalaire d'un extrait hydroglycolique de l'autre espèce : *Crataegus laevigata* (=oxyacantha) par protection de kératinocytes soumis à une agression radicalaire. Budzianowski *et al.*, (1991) ont montré les effets antilipoperoxydants de C-glucosylflavones isolées à partir de *Crataegus monogyna*.

■ Nos résultats pour les **organes d'Aubépine monogyne *in vivo*** font ressortir plusieurs points :

Dans les quatre systèmes se dégagent plusieurs organes qui sont les plus actifs : les jeunes feuilles (stades F2 et F3), le bouton floral (A) et le fruit vert (D) (Figure 10). Les meilleures activités pour les extraits totaux sont celles du bouton floral : (91,4 % d'inhibition du MDA dans la lipoperoxydation (Tableau 18) et CI_{50} respectivement de 2,9, 8,49 et 12,62 mg. l⁻¹ pour le piégeage de H₂O₂, HOCl et O₂^{o-} respectivement (Tableau 22). Les jeunes feuilles des stades F2 et F3 ont des activités un peu inférieures et assez proches entre elles. Ces organes sont pratiquement ceux que la Pharmacopée Française utilise comme matière première après séchage. Remarquons que des Pharmacopées d'Europe de l'Est utilisent aussi le fruit mûr.

Les relations les plus nettes entre la composition phénolique des extraits totaux et les activités antioxydantes s'établissent dans les quatre systèmes de mesure avec les

teneurs en **phénols totaux**. Une légère dualité apparaît ensuite dans l'influence des catégories ou molécules phénoliques sur l'activité selon que l'on considère les feuilles ou les organes reproducteurs.

Pour les feuilles, les **flavonoïdes** semblent jouer un rôle assez net dans tous les systèmes, mais les **proanthocyanidines oligomères**, le **dimère B2** et la (-) **épicatéchine** influent aussi dans le piégeage des espèces réactives de l'oxygène.

Pour les organes reproducteurs, les **proanthocyanidines totales** semblent influencer l'activité antioxydante dans tous les systèmes. Ce rôle est complété par la proanthocyanidine **dimère B2** et la (-) **épicatéchine** dans la lipoperoxydation et par les **proanthocyanidines oligomères** et l'**acide chlorogénique** pour le piégeage des espèces réactives de l'oxygène.

Un effet additif des différentes substances est vraisemblable. En effet les phases acétate d'éthyle qui sont moins riches en phénols et en proanthocyanidines ont des effets antioxydants inférieurs aux extraits totaux.

Soulignons enfin les faibles activités des phases aqueuses résiduelles qui contiennent principalement les proanthocyanidines polymères.

- Pour les **préparations pharmaceutiques** testées, nous n'avons pu effectuer que des mesures de piégeage des espèces réactives de l'oxygène sur les extraits totaux.

On peut remarquer que toutes les activités sont importantes quelle que soit la forme testée, mais qu'il est possible de classer par ordre décroissant d'effet antioxydant : les matières premières séchées (Tableau 23) (fleurs puis sommités fleuries), la poudre cryobroyée de plante fraîche (Arkotitrat[®]), les deux formes liquides de la Pharmacopée (Teinture puis Extrait fluide), puis le nébulisat issu d'une extraction hydroéthanolique (Titrex[®]).

Les présentations les plus actives sont celles qui contiennent le plus de **phénols totaux**, de **proanthocyanidines totales**, de **dimère B2** et de (-) **épicatéchine**, et enfin de **flavonoïdes**, surtout l'**hypéroside**. Ces formes les plus actives (parties sèches, poudre cryobroyée) sont celles qui ont subi le moins de transformations. Les formes dont la préparation comprend des stades de concentration (Extrait fluide, nébulisat) sont moins actives et contiennent moins de proanthocyanidines qui sont des substances relativement fragiles. L'influence du dimère B2 est aussi confirmée par l'activité moindre de la préparation où elle est absente (nébulisat).

- Les **extraits des colonies tissulaires *in vitro*** ont été testés dans les systèmes de piégeage des espèces réactives de l'oxygène. Il s'agit d'extraits totaux des colonies tissulaires récoltées durant une étude cinétique sur 40 jours .

Les valeurs de CI50 diminuent à partir du 16^{ème} jour de culture pour atteindre une valeur minimale au 28^{ème} jour, reflétant ainsi une activité antioxydante croissante. Le 16^{ème} jour correspond à une croissance active accompagnée d'une augmentation de production en tous les phénols, et la période du 28^{ème} jour se situe en phase stationnaire de croissance combinée souvent avec une teneur maximale en polyphénols.

Les activités sont inférieures à celles du bouton floral et des préparations pharmaceutiques, tout comme les teneurs en phénols totaux et proanthocyanidines totales. Dans ces extraits beaucoup moins complexes que ceux des organes *in vivo*, on retrouve encore une fois un parallélisme entre les effets et les teneurs en phénols totaux, proanthocyanidines totales et oligomères, (-) épicatechine, proanthocyanidine dimère B2 et acide chlorogénique.

Il y a donc une grande similitude de comportement entre les tissus d'origines différentes (*in vivo*, préparations pharmaceutiques et culture *in vitro*). L'avantage des cultures *in vitro* est, grâce à leur profil moins complexe et à leur particularité de réunir les molécules les plus actives, de permettre de conclure un peu plus nettement sur l'influence de telle ou telle substance ou catégorie, même si elles sont moins abondantes.

Malgré tout, si nous sommes parvenus à relier les activités les plus importantes à des teneurs élevées en phénols totaux et en proanthocyanidines, il ne serait pas judicieux de généraliser d'une manière absolue sur la participation spécifique d'une molécule ou d'une catégorie de substances à l'activité. Il semble raisonnable de relier les activités antioxydantes aux teneurs globales et à une addition des propriétés des différents composés dans les extraits souvent complexes des tissus analysés.

Dans ce contexte certains de nos résultats rejoignent les constatations d'autres auteurs sur des relations structures-activités. Das *et al.*, 1990, Yuting *et al.*, 1990, Jovanovic *et al.*, 1994, Krol *et al.*, 1994 ont montré que les flavonoïdes comportant des groupements hydroxylés en position 3', 4' sur le noyau B et en position 5, 7 sur le noyau A sont dotés de pouvoirs antioxydants. Toutes ces caractéristiques sont présentes plus particulièrement chez le flavonoïde le plus actif de nos extraits végétaux, l'hypéroside. De plus Ariga *et al.*, (1988) ont évalué les activités antioxydantes de dérivés de flavanes (catéchines, proanthocyanidines B1 et B3) extraits à partir des graines de *Vigna angularis*. Ils ont particulièrement insisté sur le nombre de groupements phénoliques dans ces composés susceptibles d'expliquer les potentialités antioxydantes.

Nous avons également constaté que les dérivés de flavones et de flavonols (hypéroside, vitexine-2''-O-rhamnoside, rutine) présentaient des pouvoirs inférieurs à ceux mesurés pour les dérivés de flavanes ((-) épicatechine, proanthocyanidine dimère B2). Ces résultats sont différents de ceux déjà obtenus par d'autres auteurs (Younes *et al.*, 1981, Torel

et al., 1986, Ratty *et al.*, 1988, Morel *et al.*, 1992) qui classent les dérivés de flavanes comme moins actifs que les flavones et flavonols. Mais, soulignons que les conditions expérimentales et de dissolution sont différentes des nôtres.

En guise de **conclusion**, nous pouvons mettre l'accent sur les intérêts multiples de l'utilisation potentielle de l'Aubépine ou de ses extraits fractionnés comme antioxydants.

→ Commençons par rappeler que des extraits d'Aubépine figurent dans la composition de crèmes "anti âge" ou employées en cosmétologie et que nos résultats, même s'ils ne sont pas obtenus avec les mêmes extraits viennent partiellement conforter ce type d'emploi.

→ Un autre intérêt des antioxydants se situe dans le domaine alimentaire où l'on a maintenant tendance à préférer aux dérivés de synthèse (BHA (butylhydroxyanisol), BHT (Bromohydroxytoluène) et des propyl gallates) des additifs naturels auxquels on attribue à priori un préjugé d'innocuité qui demanderait à être vérifié. L'attribution à certains polyphénols d'une part importante de l'activité antioxydante des extraits de tissus d'Aubépine *in vivo* et *in vitro* peut contribuer à améliorer la connaissance des antioxydants potentiellement utilisables.

→ Enfin, dans le domaine de la thérapeutique, et malgré les bonnes activités constatées, nous ne pouvons actuellement affirmer que les extraits d'Aubépine et leurs molécules phénoliques les plus actives pourront être utilisés tels quels demain contre certaines pathologies liées à la surproduction de radicaux libres. On sait qu'il y a loin de l'action *in vitro* dans des tests pharmacologiques à l'application en médecine.

De plus, comme ont essayé de le définir Halliwell (1990, 1991) et Aruoma (1994), des données supplémentaires sont indispensables pour la sélection de futurs antioxydants efficaces et utilisables. Ces critères concernent entre autres l'adaptation du type d'antioxydant à la nature des biomolécules à protéger, le besoin d'une concentration adéquate de l'antioxydant sur son site d'action, son mode d'action individuel, si possible l'absence d'effets pro-oxydants de l'antioxydant lui-même (certains antioxydants phénoliques des végétaux ont des effets pro-oxydants néfastes pour des biomolécules comme l'ADN et les protéines), et l'absence de nocivité.

On voit donc toutes les difficultés du passage de la démonstration d'une activité précise à ses applications dans le domaine thérapeutique. Néanmoins, nous pensons avoir montré à travers notre étude de l'Aubépine monogyne que des usages thérapeutiques empiriques et officiels dans un domaine précis ne limitent pas l'ouverture des recherches vers de nouvelles applications potentielles. De ce point de vue, les médecines traditionnelles constituent un réservoir très intéressant pour la recherche dans le futur.

BIBLIOGRAPHIE

AFANAS'EV I., DOROZHKO A.I., BRODSKII A.V., KOSTYUK A. and POTAPOVITCH A.I., 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **38** : 1763-1769.

ALARY J., 1984. BHA-BHT-Gallates (antioxydants phénoliques). *Lyon Pharm.*, **35** : 91-93.

ALIBERT G., RANJEVA R. et BOUDET M.A., 1977. Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Vég.*, **15** : 279-301.

AMMON H.P.T. und HANDEL M., 1981. *Crataegus*, Toxikologie und Pharmakologie. *Planta Med.*, **43** : 105-120, 209-239, 313-322.

AMMON H.P.T. und KAUL R., 1994a. *Crataegus*, Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegusextrakten, Flavonoiden und Procyanidinen, Teil 1: Historisches und Wirkstoffe. *Dtsche. Apoth. Ztg.*, **134** : 2433-2436.

AMMON H.P.T. und KAUL R., 1994b. *Crataegus*, Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegusextrakten, Flavonoiden und Procyanidinen, Teil 2: Wirkungen auf das Herz. *Dtsche. Apoth. Ztg.*, **134** : 2521-2535.

AMMON H.P.T. und KAUL R., 1994c, *Crataegus*, Herz-Kreislauf-Wirkungen von Crataegusextrakten, Flavonoiden und Procyanidinen, Teil 3: Wirkungen auf den Kreislauf. *Dtsche. Apoth. Ztg.*, **134** : 2631-2636.

ARIGA T., KOSHIYAMA I., FUKUSHIMA D., 1988. Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from Azuki beans in aqueous systems. *Agric. Biol. Chem.*, **52** : 2717-2722.

ARUOMA O.I., HALLIWELL B., HUEY B.M. and BUTLER J., 1989. The antioxydant action of N-acetylcysteine : Its reaction with H_2O_2 , OH° , O_2° , $HOCl$. *Free Rad. Biol. Med.*, **6** : 593-597.

ARUOMA O.I., 1994. Nutrition and health aspects of free radicals an antioxidants. *Fd. Chem. Toxic.*, **32** : 671-683.

ARUOMA O.I., SPENCER J.P.E., BUTLER J. and HALLIWELL B., 1995. Commentary reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals. *Free Rad. Res.*, **22** : 187-190

ASEN S., STEWART R.N. and NORRIS K.H., 1977. Anthocyanin and pH involvement in the color of "Heavenly Blue" Morning glory. *Phytochem.*, **16** : 1118-1119.

- BAHORUN T., 1990. Etude des Proanthocyanidines des tissus de Sarrasin (*Fagopyrum esculentum* Moench). Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies présenté à l'Université de Technologie de Compiègne, 50 p.
- BAHORUN T., TROTIN F., POMMERY J., VASSEUR J. and PINKAS M. 1994a. Antioxidant activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Planta Med.*, **60** : 323-328.
- BAHORUN T., TROTIN F. and VASSEUR J. 1994b. Comparative polyphenolic productions in *Crataegus monogyna* callus cultures. *Phytochem.*, **37** : 1273-1276.
- BARRETT M.W., KLYNE W., SCOPES M.P., FLETCHER A.C., PORTER L.P. and HASLAM E., 1979. Plant proanthocyanidins. Part 6. Chiroptical studies, Circular dichroisme of plant procyanidins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* : 2375-2377.
- BATE-SMITH E.C. and SWAIN T., 1956. Leucoanthocyanins. In : The chemistry of vegetable tannins. A Symposium, Croydon, Soc. Leather Trades chemistry, p109.
- BERETZ A., HAAG-BERRURIER M. et ANTON R., 1978. Choix de méthodes pharmacologiques pour l'étude des activités de l'Aubépine. *Pl. Med. Phytother.*, **12** : 305-314.
- BERNARDS M.A., STRACK D., WRAY V. and ELLIS B.E., 1991. Caffeoyl glucosides in fungal challenged tomato suspension cultures. *Phytochem.*, **30** : 497-499.
- BEZANGER-BEAUQUESNE L., PINKAS M., TORCK M. et TROTIN F., 1990. Plantes médicinales des régions tempérées, 2^{ème} édition, Ed. Maloine, 172-173.
- BIDET D., GAIGNAULT J.C., GIRARD P. et POTIER P., 1987. Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique : Du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. *L'actualité Chimique* : 89-97.
- BIRCH A.J., 1963. In : Chemical Plant taxonomy, Ed. Swain T., Academic Press New York, p148.
- BOHM B.A., BERLOW S. and STUESSY T.F., 1983. Flavonoid variation in *Clibadium trianae* and *C. surinamense*. *Phytochem.*, **22** : 2743-2744.
- BOHM B.A., 1988. The minor flavonoids. In : The flavonoids. Advances in research since 1980, Ed. Harborne J.B., Chapman and Hall, New York, 329-388.
- BONEFELD M., FRIEDRICH H. and KOLODZIEJ H., 1986. (+) catechin-3-rhamnoside from *Erythroxylum novogranatense*. *Phytochem.*, **25** : 1205-1207.

- BONIFACE M., BONIFACE B., CAZIN J.C., CAZIN M. et LUYCKX J., 1972. Calcul sur ordinateur, de la dosz efficace par la méthode des probits : Application au calcul d'une dose léthale 50. Bull. Soc. Chim. Lille, **4** : 187-195.
- BONTE F., NOEL-HUDSON M.S., WEPIERRE J., MEIBECK A. et LEGALL F., 1990. Activité antiradicalaire d'extraits d'Aubépine et de Tussilage. Revue de Phytothérapie Pratique, 10-11.
- BOTHA J.J., DESMOND A.Y., FERREIRA D. and ROUX D.G., 1981a. Synthesis of condensed tannins. Part I. Stereoselective and stereospecific synthesis of optical pure 4-arylflavan-3-ols and assessment of their absolute stereochemistry at C-4 by means of circular dichroism. J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 1213-1219.
- BOTHA J.J., FERREIRA A.D. and ROUX D.G., 1981b. Synthesis of condensed tannins Part 4: A direct biomimetic approach to [4,6] and [4,8] biflavonoids. J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 1235-1245.
- BOUKHARTA M., GIRARDIN M. et METCHE M., 1988a. Procyanidines galloylées du sarment de vigne (*Vitis vinifera*). Séparation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse. J. Chromatogr., **455** : 406-409.
- BOUKHARTA M., 1988b. Etude des Flavonoïdes de *Vitis vinifera*. Structure des Proanthocyanidines des pépins de raisin, de sarments et de feuilles de vigne. Thèse présentée à l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 258 p.
- BOURZEIX M., 1993. Influence des proanthocyanidols du raisin et du vin sur la santé. Polyphenolic Phenomena, Ed. Scalbert A., INRA Editions, Paris.
- BRADFORD M.A., 1976. A rapid sensibility method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. Analyt. Biochem., **72**: 248-254.
- BUDZIANOWSKI J., PAKULSKI G. and ROBAK J., 1991. Studies on antioxidative activity of some C-glycosylflavones. Pol. J. Pharmacol. Pharm., **43** : 394-401.
- BROWNLEE H.E., HEDGER J., SCOTT I.M., 1992. Effects of a range of procyanidins on the Cocoa pathogen *Crinipallis pernicios*a. Physiol. Mol. Plant Pathol., **40** : 227-232.
- BRUNETON J., 1987. Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie. Ed. Technique et Documentation, Paris.

- BRUNETON J., 1993. Pharmacognosie et Phytochimie. Plantes médicinales. Ed. Technique et Documentation, Paris.
- ← CHAN A.C., 1992. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. Can. J. Physiol. Pharmacol., **71** : 725-731.
- CHARRIERE-LADREIX Y. and TISSUT M., 1981. Foliar flavonoid distribution during *Spinacia* chloroplast isolation. Planta, **151** : 309-313.
- CONN E.E., 1979. Biosynthesis of cyanogenic glycosides. Naturwiss., **66** : 28-34.
- COOPER J.E. and RAO J.R., 1992. Localized changes in Flavonoid Biosynthesis in roots of *Lotus pedunculatus* after infection by *Rhizobium loti*. Plant Physiol., **100** : 449-450.
- COSTE H., 1937. Flore descriptive et illustrée de la France. Librairie Scientifique et Technique, Paris, **II** : 65.
- CZICHI U. and KINDL H., 1977. Phenylalanine ammonia lyase and cinnamic acid hydrolases as assembled consecutive enzymes on microsomal membranes of cucumber cotyledons: Cooperation and subcellular distribution. Planta, **134** : 133-143.
- CZOCHANSKA Z., FOO L.Y., NEWMAN R.H. and PORTER L.J., 1980. Polymeric proanthocyanidins stereochemistry, structural units and molecular weight. J. Chem. soc., Perkin Trans I, 2278-2286.
- DAS H.C. and WEAVER G.M., 1972. Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. J. Chromatogr., **67** : 105-111.
- DAS M., BICKERS D.R. and MUKHTAR H., 1984. Plant phenols as *in vitro* inhibitors of glutathione-S-transferase(s). Biochem. Biophys. Res. Commun., **120** : 427-433.
- DAS N.P. and PEREIRA T.A., 1990. Effects of flavonoids on thermal autoxidation of Palm oil : Structure and activity relationships. JAOCS, **67** : 255-258.
- DAS N.P. and RAMANATHAN L., 1992. Studies on flavonoids and related compounds as antioxidants in food. In : lipid-soluble antioxidants : Biochemistry and Clinical applications, Ed. A.S.H. Ong and L. Packer, Birkhäuser Verlag, Basel/ Switzerland, 295-306.
- DAS A., WANG J. H. and LIEN E. J., 1994. Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship(SSAR) analysis. Progress in Drug Research, Ed. Ernst Jucker, Birkhäuser Verlag, Basel, **42** : 133-136.

- DAUGHET J.C., BERT M., DOLLEY J., BEKAERT A. and LEWIN G., 1993. 8-methoxykaempferol-3-néohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna*. *Phytochem.*, **33** : 1503-1505.
- DECHARNEUX T., DUBOIS F., BEAULOYE C., WATTIAUX-DE CONINCK S. and WATTIAUX R., 1992. Effect of various flavonoids on lysosomes subjected to an oxidative or an osmotic stress. *Biochem. Pharmacol.*, **44** : 1243-1248.
- DELCOUR J.A., SERNEEL S. E.J., FERREIRA D. and ROUX D.G., 1985. Synthesis of condensed tannins, Part 13. The first 2,3-trans 3,4-cis procyanidins. Sequence of units in trimer of mixed stereochemistry. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 669-676.
- DELLE MONACHE F., FERRARI F., POLE-TUCCI A. and MARINI-BETTOLO G.B., 1972. Catechins with (+)- Epi-configuration in nature. *Phytochem.*, **11** : 2333-2335.
- DE OLIVEIRA M.M., SAMPAIO M.R.P., SIMON F., GILBERT B. and MORS W.B., 1972. Antitumor activity of condensed flavanols. *An. Acad. Brasil*, **44** : 41-44.
- DE SILVA D.M. and AUST S.D., 1993. Ferritin and ceruloplasmin in oxidative damage: review and recent findings. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **71**: 715-720.
- DEWICK P.M. and HASLAM E., 1969. Phenol biosynthesis in higher plants. Gallic acid. *Biochem. J.*, **113** : 537-541.
- DIDRY N., PINKAS M. et TORCK M., 1982. Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de divers espèces de *Grindelia*. *Pl. Med. Phytother.*, **XVI** : 7-15.
- DODET B., Mai 1991. La chasse aux radicaux libres oxygénés. *Biofutur*, 23-34.
- DOSKOTCH R.W., MIKHAIL A.A. and CHATTERJI S., 1973. Structure of the water-soluble feeding stimulant for *Scolytus multistriatus* : a revision. *Phytochem.*, **12** : 1153-1155.
- DUBOIS G.E., GROSBY G.A. and SAFFRON P., 1977. Non nutritive sweeteners : taste-structure relationships for some new simple dihydrochalcones. *Science*, **195** : 397-399.
- ELLIS C.J., FOO L.Y. and PORTER C.J., 1983. Enantiomerism : a characteristic of the Proanthocyanidin chemistry of the monocotyledones. *Phytochem.*, **22** : 483-487.
- EMERIT I., 1994. Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer : Possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Rad. Bio. Med.*, **16** : 99-109.
- ENGEL D.W., HATTING H.M., HUNDT H.K.L. and ROUX D.G., 1978. Conformation and absolute configuration of 8-bromotetra-O-methyl- (+)-catechin. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **16** : 695.

ENGELSHOWE R., 1983. Dimere Proanthocyanidine als Gerbstoffvorstufen in *Juniperus communis*. *Planta Med.*, **49**: 170-175.

ENGELSMA G., 1969. The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in Gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. VI. Phenol synthesis. *Acta Bot. Neerl.*, **18** : 347-357.

EZAKI-FURUICHI E., NONAKA G.I., NISHIOKA I. and HAYASHI K., 1986. Isolation and structures of procyanidins (condensed tannins) from *Raphiolepis umbellata*. *Agric. Biol. Chem.*, **50** : 2061-2067.

FACINO R. M., CARINI M. , ALDINI G., BOMBARDELI E., MORAZZUNI P. and MORELLI R., 1994. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidins from *Vitis vinifera* : A mechanism for their capillary protective action. *Arzneim Forsch. Drug Res.*, **44** : 592-601.

— FAVIER A., 1986. Radicaux libres et oligoéléments. C.R. de la 4^{ème} journée de Médecine Fonctionnelle, Paris.

— FAVIER A., SAPPEY C., LECLERC P., FAURE P. and MICOUD M., 1994. Antioxidant status and lipid peroxidation in patients infected with HIV. *Chemico-Biological Interactions*, **91** : 165-180.

FEENY M., 1992. The evolution of chemical ecology : contributions from the study of herbivores insects. In : *Herbivores, their interactions with secondary plant metabolites*, Ed. Rosenthal, G. and Berenbaum M., 2nd edition, Academic press, New-York, 1-44.

FICARRA P., FICARRA R., TOMMASINI A., De PASQUALE A., GUARNIERA F.C. and IAUK L., 1983. Analysis of 2-phenyl-chromon derivatives and chlorogenic acid. *Il Farmaco*, **39** : 343-354.

FLETCHER A.C., PORTER L.J., HASLAM E. and GUPTA R.K., 1977. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* : 1628-1637.

FLEURIET A. et MACHEIX J.J., 1977. Effet des blessures sur les composés phénoliques des fruits de tomates "cerises" (*Lycopersicum esculentum* var *Cerasiforme*). *Physiol. Vég.*, **15** : 239-250.

FONTECAVE M. and PIERRE J.L., 1991. Activation et toxicité de l'oxygène. Principes des thérapeutiques antioxydantes. *Bull.Soc. Chim. Fr.*, **128** : 505-520.

FOO L.Y. and PORTER L.J., 1978. Prodelphinidin polymers : Definition of structural units. J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 1186-1190.

FOO L.Y. and PORTER L.J., 1980. The phytochemistry of proanthocyanidin polymers. Phytochem., **19** : 1747-1754.

FOO L.Y., JONES W.T., PORTER C.J., WILLIAMS V.M., 1982. Proanthocyanidin polymers of fodder legumes. Phytochem., **21** : 933-935.

FOO L.Y., 1986. The first natural 2,3-cis dihydroflavonol and rationalisation of the biogenesis of 2,3-cis proanthocyanidines. J. Chem. Soc. Chem. Comm., 675-677.

FOURNIER P., 1947. Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Tome I, Ed. Lechevalier, Paris.

FREUDENBERG K. and WEINGES K., 1959. Condensation of catechin, stereochemistry of the flavandiols group. Chem. and Industry, 486-487.

FRIEDRICH V.H. and WIEDEMAYER H., 1976. Die gerbstoffbildner in *Ephedra helvetica*. Planta med., **30** : 163-173.

FRYER M.J., 1992. The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol). Plant Cell environ. , **15** : 381-392.

GAMBORG U.L., MILLER R.A. and OJIMA K., 1968. Nutrient requirements suspension cultures of Soybean root cells. Exp. Cell. Res., **50**: 151-158.

GARNIER G., BEZANGER-BEAUQUESNE L. et DEBRAUX G., 1961. Ressources médicinales de la flore Française. Ed. Vigot, Paris.

GEISSMAN T.A. and DITTMAR H.F.K., 1965. A proanthocyanidin from avocado seed. Phytochem., **4** : 359-368.

GEISSMAN T.A. and YOSHIMURA N.N., 1966. Synthetic proanthocyanidins. Tetrahedron letters, **24** : 2669-2673.

GHAZAL S.A., ABUZARQA M. and MAHASNEH A.M., 1992. Antimicrobial activity of *Polygonum equisetiforme* extracts and flavonoids. Phytother. Res., **6** : 265-269.

GRISEBACH H. and BARZ W., 1969. Biochemie der Flavonoids. Naturweiss, **56** : 538-544.

HAHN F., KLINKHAMMER F. and UBERDORF A., 1960. Pharmakologische untersuchungen über *Crataegus oxyacantha*. Arzneim Forsch., **10** : 825-829.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., 1986. Oxygen free radicals and iron relation to biology and medicine. Some problems and concepts. Arch. Biochem.Biophys., **246** : 501-514.

HALLIWELL B., 1988, Albumin : an important extracellular antioxydant, Biochem. Pharmacol., **37** : 569-571.

HALLIWELL B., 1990. How to characterize a biological antioxidant. Free Rad. Res. Com., **9** : 1-36.

HALLIWELL B., 1991. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection?. Drugs, **42** : 569-605.

HARBORNE J.B. and SIMMONDS N.W., 1964a. The natural distribution of the phenolic aglycones, In : Biochemistry of Phenolic Compounds, Ed. Harborne J.B., Academic Press, New York, 129-170.

HARBORNE J.B., 1964b. Plant Polyphenols. XI. The structure of acylated anthocyanins. Phytochem., **3** : 151-160.

HARBORNE J.B., 1966. Comparative Biochemistry of flavonoids. II. 3-desoxyanthocyanins and their systematic distribution in Ferns and Gesnerads. Phytochem., **5** : 589-603.

HARBORNE J.B., 1967. Flavone and flavonol pigments. In : Comparative Biochemistry of the flavonoids, Ed. Academic Press, London, 37-62.

HARBORNE J.B. and KING L., 1976. Flavonoid sulphates in the Umbelliferae. Biochem. Syst. Ecol., **4** : 111-115.

HARBORNE J.B., 1980. Plant phenolics. In : Encyclopedia of Plant Physiology. New series. Secondary plant products, Ed. Bell E.A. and Charlwood B.V., Springer Berlin, Heidelberg, New-York, **8** : 330-402.

HARBORNE J.B., GIRIJA A.R., DEVI H.M. and LAKHSMI N.K.M., 1983. Anthochlor pigments from the petals of *Mussaenda hirsutissima* and *Zinnia linearis*. Phytochem., **22** : 2741-2142.

HARBORNE J.B., WILLIAMS C.A. and WILSON K.L., 1985. Flavonoids in leaves and inflorescences of Australian Cyperaceae. Phytochem., **24** : 751-766.

HARBORNE J.B. and GRAYER R.J., 1988. The anthocyanins. In : The flavonoids. Advances in research since 1980, Ed. Harborne J.B., Chapman and Hall, New-York, 1-18.

HARBORNE J.B, 1989. General procedures and measurement of Total Phenolics. In : Methods in Plant Biochemistry, Ed. Academic Press, London, **1** : 1-28.

HARMAN D., 1994. Free radical Theory of Aging. Ann. New York Acad.Sciences, **717** : 1-15.

HASLAM E., 1969. (+)- Catechin-3-O-gallate and a polymeric proanthocyanidin from *Bergenia* sp. J. Chem. Soc., 1834-1838.

HASLAM E., OPIE C.T. and PORTER L.J., 1977a. Procyanidin Metabolism - A hypothesis. Phytochem., **16** : 99-102.

HASLAM E., 1977b. Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry. Phytochem., **16** : 1625-1640.

HASLAM, E., 1982. Proanthocyanidins. In : The Flavonoids, Advances in research, Ed. Harborne J.B. and Mabry T.J., Chapman and Hall, New-York, 417-447.

HASLAM, E., Secondary metabolism, 1986. Fact and fiction. Nat. Prod. Rep., **3** : 217-224.

HATANO T., EDAMATSU R., HIRAMATSU M., MOTI A., FUJITA Y., YASUHARA T., YOSHIDA T., OKUDA T., 1989. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem. Pharm. Bull., **37** : 2016-2021.

HATHWAY D.E. and SEAKINS J.W.T., 1957. Autooxidation and polyphenols. Part III. Autooxydation in neutral aqueous solution of flavans related to catechin. J. Chem. Soc., 1562-1566.

HATTORI S., 1962. Glycosides of flavones and flavonols, In : The chemistry of flavonoid compounds, Ed. Geissman T.A., Pergamon Press, 317-352.

HAYASE F. and KATO M., 1984. Antioxydant compounds of sweet potatoes. J. Nutri. Sci. Vitaminol., **30** : 37-46.

HELLER, W. and HAHLBROCK K., 1980. Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyse the formation of naringenin chalcone. Arch. Biochem. Biophys., **200** : 617-622.

HEMINGWAY R.W. and LAKS P.E., 1985, Condensed tannins : A proposed route to 2R-3R - (2, 3-cis) proanthocyanidins, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 746-747.

- HERTOG M.G.L., HOLLMAN P.C.H. and VENEMA D.P., 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **40** : 1591-1598.
- HERTOG M.G.L., FEUKENS J.M., HOLLMAN P.C.H., KATAN M.B. and KROMHOUT D., 1994. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study. *Nutri. Cancer*, **22**: 175-184.
- HIERMAN A., KARTNIG T. und AZZAM S., 1986. Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung der Procyanidine in *Crataegus*. *Sci. Pharm.*, **54**: 331-337.
- HIRASURNA, T.J., SHULER M.L., LACKNEY V.L. and SPANSWICK R.M., 1991. Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures. *Plant sci.*, **78** : 107-120.
- HRAZDINA G., ALSCHER-HERMAN, R. AND KISH V.M., 1980. Subcellular localization of flavonoid synthesizing enzymes in *Pisum*, *Phaseolus*, *Brassica* and *Spinacia* cultivars. *Phytochem.*, **19**: 1355-1359.
- HRAZDINA G., MARX G.A. and HOCH H.C., 1982. Distribution of secondary plant metabolites and their biosynthetic enzymes in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant Physiol.*, **70** : 745-748.
- HSU F.L., NONAKA G.I. and NISHIOKA I., 1985. Tannins and related compounds XXXIII : Isolation and characterization of procyanidins in *Dioscorea cirrhosa* Loun.. *Chem. Pharm. Bull.*, **33** : 3293-3298.
- IKIGAI H., NAKAE T., HARA Y. and SHIMAMURA T., 1992. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochem. Biophys. Acta*, **1147** : 132-136.
- ISHIKURA N. and TERAMOTO S., 1983. Procyanidins and catechins from callus and cell suspension cultures of *Cryptomeria japonica*. *Agric. Biol. Chem.*, **47** : 421-423.
- ISHIMARU F.L., NONAKA G.I. and NISHIOKA I., 1987. Flavan-3-ol and procyanidin glycosides from *Quercus miyagii*. *Phytochem.*, **26** : 1167-1170.
- IWATA S., FUKAYA Y., NAKAZAWA K. and OKUDA T., 1987. Effects of tannins on the oxidative damage of Mouse Ocular Lens. I. Using the oxidative Damage Model induced by Xanthine-Xanthine oxidase system. *J. ocul. Pharmacol.*, **3** : 227-238.
- JACQUES D., HASLAM E., BEDFORD G.R. and GREATBANKS D., 1974. Plant procyanidins. Part II : proanthocyanidin-A₂ and its derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* : 2663-2771.

JERUMANIS J., 1979. Separation et identification de "flavonoïdes" par CLHP. Eur. Brew. Conv. Proc., 309-319.

JONES W.T., BROADHURST R.B. and LYTTLETON J.W., 1976. The condensed tannins of pasture legume species. Phytochem., **15** : 1407-1409.

JOVANOVIĆ S.V., STEENKEN S., TOSIĆ M., MARJANOVIĆ B. and SIMIĆ M.G., 1994. Flavonoids as antioxidants. J. Am. Chem. Soc., **116** : 4846-4851.

JURD L., CORSE J., KING A.D. Jr., BAYNE H. and MIHARA K., 1971. Antimicrobial properties of 6,7 dihydroxy-, 7,8 dihydroxy-, 6-hydroxy- and 8-hydroxycoumarines. Phytochem., **10** : 2971-2974.

KAKIUCHI N., KUSOMOTO I.T., HATTORI M., NAMBA T., HATANO T., OKUDA T., 1991. Effect of condensed Tannins and related compounds on reverse transcriptase. Phytother. Res., **5** : 270-272.

— KARTNIG T., HIERMAN A. und AZZAM S., 1987. Untersuchungen über die Procyanidin- und Flavonoidgehalte von *Crataegus monogyna*-Drogen. Sci. Pharm., **55** : 95-100.

— KARTNIG T., KOGL G. and HEYDEL B., 1993. Production of flavonoids in cell cultures of *Crataegus monogyna*. Planta Med., **59** : 537.

KASHIWADA Y., NONAKA G.I., NISHIOKA I., JIANN-HUNG LEE K., BORI I., FUKUSHIMA Y., BASTOW K.F. and LEE K.H., 1993. Tannins as potent Inhibitors of DNA Topoisomerase II *in vitro*. J. Pharm. Sci., **82** : 488-492.

KREUZALER F. and HAHLBROCK K., 1972. Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants : formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxy flavanone from p-coumaroyl Coenzyme A and malonyl Coenzyme A). FEBS Letters, **28** : 69-72.

KOES R. E., QUATTROCHIO F. and MOL J. V. N., 1994. In : The Flavonoid biosynthetic pathway in plants : Function and Evolution, Bioassays, **16** : 123-132.

KOŁODZIEJ H., 1985. The first 2,3-trans 3,4-cis procyanidin. Phytochem., **24** : 2460-2462.

KOŁODZIEJ H., 1986. Synthesis and characterization of procyanidin dimers as their peracetates and octamethyl diacetates. Phytochem., **25** : 1209-1215.

KREOFISKY T., SCHLAGER J.W., VUK-PAVLOVIĆ Z., ABRAHAM R.T. and ROHRBACH M.S., 1992. Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., **7** : 172-181.

- KROL W., CZUBA Z., SCHELLER S., PARADOWSKI Z., SHANI J., 1994. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. *J. Ethnopharmacol.*, **41** : 121-126.
- KUPPUSAMY U.R. and DAS N.P., 1992. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **44** : 1307-1315.
- LAMAISON J.L. et CARNAT A., 1990a. Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq. et de *Crataegus laevigata* (Poiret) D.C.. *Pharm. Acta Helv.*, **65** : 315-320
- LAMAISON J.L., PETITJEAN-FREYTET C. et CARNAT A., 1990b. Teneurs en acide rosmarinique en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées médicinales. *Ann. Pharm. Fr.*, **48** : 103-108.
- LAMAISON J.L. et CARNAT A., 1991. Teneurs en principaux Flavonoïdes des fleurs et des feuilles de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret) DC. en fonction de la végétation. *Pl. Med. Phytother.*, **XXV** : 12-16.
- LARSON A.R., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochem.*, **27** : 969-978.
- LEA A.G.H., BRIDLE P., TIMBERLAKE C.F. and SINGLETON V.L., 1979. The procyanidins of white grapes and wines. *Am. J. Enol.*, **30** : 289-300.
- LEA A.G.H., 1982. Reversed phase high performance liquid chromatography of procyanidins and other phenolics in fresh and oxidising apple juices using a pH shift technique. *J. Chromatogr.*, **238** : 253-257.
- LECLERC H., 1954. Précis de phytothérapie, Ed. Masson, Paris.
- LEUKEL A., FRICKE U. and HOLZL J., 1986. Studies on the activity of *Crataegus* compounds upon the isolated guinea pig heart. *Planta Med. Suppl.*, **52** : 545-546.
- LIU Q., MARKHAM. R., PARE P.W., DIXON R.A. and MABRY T.J., 1993. Flavonoids from elicitor-treated cell suspension cultures of *Cephalocereus senlis*. *Phytochem.*, **32** : 925-928.
- MABRY T.J. and ULUBELEN A., 1980. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food. Chem.*, **28** : 188-196.
- MAC CLURE J.W., 1968. Photocontrol of *Spirodela intermedia* flavonoids. *Plant Physiol.*, **43** : 193-200.

MACHEIX J.J. et BILLOT J., 1982. Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires : Centenaire de l'école Normale supérieure de Saint-Cloud. Extrait des actes du colloque de Biologie, 111-137.

MADYASTHA K.M., RIDGEWAY J.E., DWYER J.G. and COSCIA S.C., 1977. Subcellular localization of a cytochrome P-450 dependent monooxygenase in vesicles of the higher plant : *Catharanthus roseus*. J. Cell. Biol, **72** : 302-313.

MARGNA U., HALLOP P.L., MARGNA E. and TOHVER M., 1967. Chromatographic and spectrophotometric evidence from the occurrence of luteolin and apigenin C-glycosides in the cotyledons of Buckwheat seedlings. Biochem. Biophys. Acta, **136** : 396-399.

MARGNA U., 1971. Influence of light on the formation of anthocyanins and rutin in Buckwheat seedlings cotyledons. Eesti NSV Tead. Akad. Toim. Biol., **19** : 17-21.

MARGNA U., LAANEST L., MARGNA E., and VAINJARV T., 1973. Light stimulated accumulation of Leucoanthocyanidins and other flavonoids in Buckwheat seedlings. Eesti NSV Tead. Akad. Toim. Biol., **22** : 226-232.

MARKHAM K.R., 1982. Isolation and analytical techniques. In : Techniques of flavonoid identification, Ed. Academic press, 15-34.

MARKHAM K. R., 1989. Flavons, flavonols and their glycosides. In : Methods in Plant Biochemistry, Ed. Academic press, **1** : 197-235.

MASQUELIER J., DUMON M.C. et DUMAS J. , 1979. Stabilisation du collagène par les oligomères procyanidoliques. Acta Therapeutica, **7** : 101-104.

MATTICE W.L. and PORTER L.J., 1984. Molecular Weight averages and ¹³C NMR intensities provide evidence for branching in Proanthocyanidin polymers. Phytochem., **6** : 1309-1311.

METCHE M., 1980. Tanins, nature et propriétés. C.R. Groupe Polyphénols, **10** : 11-32.

MEUNIER M.T., DUROUX E., BASTIDE P., 1989. Activité antiradicalaire d'oligomères procyanidoliques et d'anthocyanosides vis-à-vis de l'anion superoxyde et vis-à-vis de la lipoperoxydation. Pl. Med. Phytoter., **XXIII** : 267-274.

MICHAUD J., MASQUELIER J. et DUMON M.L., 1978. Blocage de la rotation autour de l'axe C4-C8 des procyanidols de la série A et conséquences analytiques. Bull. Soc. Pharm. de Bordeaux, **117** : 30-38.

MIDDLETON E.M. and TERAMURA A.H., 1993. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiol.*, **103** : 741-752.

MIKSICEK R.J., 1993. Commonly occurring plant flavonoids have Estrogenic activity. *Mol. Pharmacol.*, **44** : 37-43.

MONTESINOS C., UBEDA A., FERRANDIZ M.L. and ALCARAL M.J., 1991. Superoxide scavenging properties of phenolic acids. *Planta Med. Suppl.*, **57**.

MOREL I., LESCOAT G., COGREL P., SERGENT O., PASDELOUP N., BRISSOT P., CILLARD P. and CILLARD J., 1993. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.*, **45** : 473-497.

MORI H., TANAKA T, SHIMA H., KUNYASU T. and TAKAHASHI M., 1986. Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of Hamsters. *Cancer Letters*, **30** : 49-54.

MORIMOTO S., NONAKA G.I. and NISHIOKA I., 1986. Tannins and related compounds. XXXIX. Procyanidin C-glucosides and an acylate flavan-3-ol glucoside from the bark of *Cinnamomum cassia* Blume and *C. obtusifolium* Nees.. *Chem. Pharm. Bull.*, **34** : 643-649.

MOUMOU Y., TROTIN F., PINKAS M., DUBOIS J. and VASSEUR J., 1987. Production de polyphénols par des colonies tissulaires de Sarrasin. *Ann. Pharm. Fr.*, **45** : 255-260.

MOUMOU Y., TROTIN F., VASSEUR J., VERMEERSCH G., GUYON R., DUBOIS J. and PINKAS M., 1992a. Procyanidin production by *Fagopyrum esculentum* callus cultures. *Planta Med.*, **58** : 516-519.

MOUMOU Y., TROTIN F., DUBOIS J., VASSEUR J. and EL-BOUSTANIE E., 1992b. Influence of culture conditions on polyphenol production by *Fagopyrum esculentum* tissue cultures. *J. Nat. Prod.*, **55** : 33-38.

MOUMOU Y., VASSEUR J. TROTIN F and DUBOIS J., 1992c. Catechin production by callus cultures of *Fagopyrum esculentum*. *Phytochem.*, **31** : 1239-1241.

MURASHIGE T. and SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15** : 473-497.

NAKAHARA K., KAWABATA S., ONU H., OGURA K., TANAKA T., OOSHIMA T. and HAMADA S., 1993. Inhibitory effect of Oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of *Mutans streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** : 968-973.

NEISH A.C., 1964. Major pathways of biosynthesis of phenols. In : Biochemistry of phenolic compounds, Ed. Harborne J.B., Academic Press, London, 295-359.

NIKOLOV N., SELIGMANN O., WAGNER H., HOROWITZ R.M. et GENTILI B., 1982. Neue Flavonoid-Glykoside aus *Crataegus monogyna* und *Crataegus pentagyna*. *Planta Med.*, **44** : 50-53.

NITSCH J.P. and NITSCH C., 1961. Synergistes naturels des auxines et des gibérellines. *Bull. Soc. Fr.*, **26** : 2237-2240.

NONAKA G., MIWA N. and NISHIOKA I., 1982. Stilbene glycoside gallates and proanthocyanidins from *Polygonum multiflorum*. *Phytochem.*, **21** : 429-432.

NONAKA G., EZAKI E., HAYASHI K. and NISHIOKA I., 1983a. Flavanol glucosides from Rhubarb and *Rhaphiolepis umbellata*. *Phytochem.*, **7** : 1659-1661.

NONAKA G.I., MORIMOTO S. and NISHIOKA I., 1983b. Tannins and related compounds Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric and pentameric proanthocyanidins from Cinnamon. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I* : 2139-2145.

NONAKA G.I., SAKAI R. and NISHIOKA I., 1984. Hydrolysable tannins and proanthocyanidins from green tea. *Phytochem.*, **23** : 1753-1755.

OCCHIUTO F., COSTA R., BRIGOGGIO F. et TOMMASINI A., 1986a. Etude comparée de l'activité cardiovasculaire des pousses des feuilles et des fleurs de *Crataegus oxycantha* L. II. Action de préparations extractives et de principes actifs purs isolés sur le coeur isolé de lapin. *Pl. Med. Phytother.*, **XX** : 52-69.

OCCHIUTO F., COSTA R., BRIGOGGIO F., TOMMASINI A. et DePASQUALE A., 1986b. Etude comparée de l'activité cardiovasculaire des pousses des feuilles et des fleurs de *Crataegus oxycantha* L. I. Activité électrique et tension artérielle chez le rat. *Pl. Med. Phytother.*, **XX** : 37-51.

OKADA F. and FURUYA K., 1971. Inhibitory effect of tea catechins on some plant virus diseases. *Chagyo Gijutsu Kenkyu*, **42** : 39-46.

OKAMURA H., MIMURA A., YAKOU Y., NIWANO M. and TAKAHARA Y., 1993. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochem.*, **33** : 557-561.

- OKUDA T., KIMURA Y., YOSHIDA T., HATANO T., OKUDA H. and ARICHI S., 1983. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsome of Liver. Chem. Pharm Bull., **31** : 1625-1631.
- OUTTRUP H., 1981. Structure of prodelphinidins in Barley. E.B.C Congress, 323-333.
- PARBERRY D.G., GARDNER W.K. and GOLEBIOWSKI T., 1984. Stimulation of isoflavonoid content in subterranean clover by infection with a fungus. J. Aust. Inst. Agric. Sci., **50** : 114-116.
- PARIS M.R., 1949. Le rutoside, sa préparation à partir de divers espèces et variétés de Sarrasin cultivées en France. Ann. Pharm. Fr., **7** : 21-26.
- PARIS R.R. et MOYSE H., 1981. Précis de matière médicale. 2ème édition, Ed. Masson, Paris.
- PAUPARDIN C., 1972. Contribution à l'étude du rôle des composés phénoliques dans les phénomènes de morphogenèse manifestés par quelques tissus végétaux. Ann. Bot., **2** : 141-210.
- PAYA M., HALLIWELL B. and HOULT J.R.S., 1992. Peroxyl radical scavenging by a series of coumarines. Free Rad. Res. Comms., **17** : 293-298.
- PECKET R.C. and SMALL C.J., 1980. Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. Phytochem., **19** : 2571-2576.
- PETRI G., KERY A., KRAWCZYK U., HERENYI B. and VADASZ A., 1988. Flavonoids and procyanidins in *Crataegus* species. C.R. du groupe polyphénol, **14** : 116-118.
- PICK E. and KEISARI Y., 1980. A simple method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. J. Immunol. Meth., **938** : 161-170.
- PIETTA P., MANERA E., and CEVA P., 1986. Isocratic liquid chromatographic method for the simultaneous determination of *Passiflora incarnata* L. and *Crataegus monogyna* flavonoids in drugs. J. Chromatogr., **357** : 233-258.
- PINCEMAIL J., DEBY C., LION Y., BRAQUET P., HANS P., DRIEU K. and GOUTIER R., 1985. Role of flavonoids in lipoperoxidation and radical reactions. In : Flavonoids and Bioflavonoids, Ed. L. Farkas, M. Gabor , F. Kallay, 423-436.
- PORTER L.J., FOO L.Y., FURNEAUX R.H., 1985. Isolation of three naturally occurring -O-β-glucopyranosides of procyanidin polymers. Phytochem., **24** : 567-569.

- PORTER L.J., HRSTICH L. N. and CHAN B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochem.*, **25** : 225-230.
- PORTER L.J., 1988. Flavans and proanthocyanidins. In : *The flavonoids. Advances in research since 1980*, Ed. Harborne J.B., Chapman and Hall, New-york, 21-58.
- PRE J., 1992. Radicaux libres et peroxydation lipidique. *Sem. Hôp. Paris*, **68** : 1430-1437.
- RATTY A.K. and DAS N.P., 1988. Effects of flavonoids on non-enzymatic lipid peroxidation: Structure activity relationship. *Med. Metab. Biol.*, **39** : 69-79.
- RAVN H., ANDARY C., KOVACS G. and MOLGAARD P., 1984. Caffeic acid esters as *in vitro* inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochem. Syst. Ecol.*, **17** : 175-184.
- REES S.B. and HARBORNE J.B., 1985. The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochem.*, **24** : 2225-2231.
- REHWALD A., MEIER B. and STICHER O., 1994. Qualitative and quantitative reversed-phase high performance liquid chromatography of flavonoids in *Crataegus* leaves and flowers. *J. Chromatogr.* , **677** : 25-35.
- RIBEREAU-GAYON P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Dunod, Paris.
- RICARDO da SILVA J.M., DARMON N., FERNANDEZ Y. and MITJAVILA S., 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Agric. Food Chem.*, **39** : 1549-1552.
- RIEMERSMA R. A., 1994. Epidemiology and the role of antioxidants in preventing coronary heart disease : a brief overview. *Proc. Nutr. Soc.*, **53** : 59-65.
- ROBAK J. and GRYGLEWSKI R.J., 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, **37** : 837-841.
- ROSENHEIM O., 1920. Observations of anthocyanins. I. The anthocyanins of the young leaves of the grape wine. *Biochem. J.*, **14** : 178-188.
- ROUX D. G. and FERREIRA D., 1974. α -Hydroxychalcones as intermediates in flavonoid biogenesis : The significance of recent analogies. *Phytochem.*, **13** : 2039-2048.
- RYAN T.P., STEENWYK R.C., PEARSON P.G. and PETRY T.W., 1993. Inhibition of *in vitro* lipid peroxydation by 21-aminosteroids. Evidence for differential mechanisms. *Biochem. Pharmacol.*, **46** : 877-884.

SAIJO R., 1983. Pathway of gallic acid biosynthesis and its esterification with catechins in young tea shoots. *Agric. Biol. Chem.*, **47** : 455-461.

SAMAJA M., MOTTERLINI R., SANTORO F., DELL'ANTONIO G. and CORNO A., 1994. Oxydative injury in reoxygenated and reperfused hearts. *Free Rad. Biol. Med.*, **16** : 255-262.

SAXENA A.M., SRIVASTAVA P., KALE K.K. and BAQUER N.Z., 1993, Impaired antioxydant status in diabetic rat liver, effect of vanadate. *Biochem. Pharmacol.*, **45** : 539-542.

SCHRALL R. and BECKER H., 1977, Produktion von Catechinen und Oligomeren Proanthocyanidinen in Callus- und Suspensionskulturen von *Crataegus monogyna*, *Crataegus oxyacantha* und *Ginkgo biloba*. *Planta Med.*, **32** : 297-307.

SESHADRI T. R., 1962. Isolation of flavonoid compounds from plant materials. In : *The chemistry of flavonoid compounds*, Ed. Geissman T. A., Pergamon Press, 6-33.

SETHI V.K., TANEJA S.C., DHAR K.L. and ATAL C.K., 1984. (-) Epiafzelechin 5-O- β -D-glucoside from *Crataeva religiosa*. *Phytochem.*, **23** : 2402-2403.

SHAH R. R. and MEHTA A. R., 1978. Influence of Phenolic acids on growth and production of Phenolic compounds in *Crotalaria* callus cultures. *Bangladesh J. Bot.*, **7**: 51-57.

SHIMOKORIYAMA M., 1962. Flavanones, chalcones and aurones. In : *The Chemistry of Flavonoid compounds*, Ed. Geissman T.A., Pergamon Press, 286-316.

SINGLETON V.L. and ROSS J.A. Jr., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **16** : 144-153.

STAFFORD H.A. and CHENG T.Y., 1980. The procyanidins of douglas fir seedlings, callus and cell suspension cultures derived from cotyledons. *Phytochem.*, **19** : 131-135.

STAFFORD H.A. and LESTER H.H., 1982a. Enzymic and non enzymic reduction of (+) Dihydroquercetin to its 3-4 diol. *Plant physiol.*, **70** : 695-698.

STAFFORD H.A., SHIMAMOTO M. and LESTER H.H., 1982b. Incorporation of (^{14}C) phenylalanine into flavan-3-ols and procyanidins in cell suspension cultures of Douglas Fir. *Plant physiol.*, **69** : 1055-1059.

STAFFORD H.A., 1983. Enzymic regulation of procyanidin biosynthesis, lack of a flav-3-en-3-ol intermediate. *Phytochem.*, **22** : 2643-2646.

STAFFORD H.A and LESTER H.H., 1984. Flavan-3-ol biosynthesis. The conversion of (+) - dihydroquercetin and flavan-3-4 cis diol (leucocyanidin) to (+)-catechin by reductases extracted from cell suspension cultures of Douglas fir. *Plant physiol.*, **76** : 184-186.

STAFFORD H.A., KREITLOW K.S., and LESTER H.H., 1986. Comparison of proanthocyanidins and related compounds in leaves and leaf-derived cell cultures of *Ginkgo biloba* L., *Pseudotsuga menziesii* F. and *Ribes sanguineum* P.. *Plant Physiol.*, **82** : 1132-1138.

STAVRIC B. and MATULA T.I., 1992. Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health. In : *Lipid soluble and antioxydants : Biochemistry and Clinical applications*, Ed. A.S.H. Ong, L.Packer ., Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, 274-294.

STRACK D., BUSCH E., WRAY V., GROTJAHN L. and KLEIN E., 1986. Cyanidin-3-oxalylglucoside in orchids. *Z. Naturforsch.*, **41c** : 707-711.

STRACK D. and WRAY V., 1989. Anthocyanins. In *Methods in Plant Biochemistry*, Ed. Academic Press, **1** : 325-356.

SUN D., Wong H. and FOO L.Y., 1987. Proanthocyanidin dimers and polymers from *Quercus dentata*. *Phytochem.*, **23** : 1753-1755.

SUN D., ZHAO Z., WONG H. and FOO L.Y., 1988. Tannins and other phenolics from *Myrica esculenta* bark. *Phytochem.*, **27** : 579-583.

SWAINT T. and HILLIS W.E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.*, **10** : 63-68.

SYRKIN-WURTELE E., THAYER S.S. and CONN E.E., 1982. Subcellular localization of a UDP-glucose : aldehyde cyanohydrin-glucosyl transferase in epidermal plastids of *Sorghum* leaf blades. *Plant Physiol.*, **70** : 1732-1737.

TAKEDA K., HARBORNE J.B. and SELF R., 1986. Identification and distribution of malonated anthocyanins in plants of the Compositae. *Phytochem.*, **25** : 1337-1342.

TAMURA H. and YAMAGAMI A., 1994. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A Grape. *J. Agric. Food Chem.*, **42** : 1612-1615.

TANAKA T., NONAKA G.I. and NISHIOKA I., 1983. 7-O galloyl-(+) catechin and 3-O galloyl procyanidin B3 from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochem.*, **22** : 2575-2578.

- TANIZAWA H., TODA S., SAZUKA Y., TANIYAMA T., HAYASHI T., ARICHI S., TAKINO Y., 1984. Natural antioxidants. I. Antioxidative components of Tea leaf (*Thea sinensis* L.). Chem. Pharm. Bull., **32** : 2011-2014.
- TAUCHERT M., PLOCH M. and HUBNER W.-D., 1994. Wirksamkeit des Weißdorn-Extraktes LI 132 im Vergleich mit Captotril. Multizentrische Doppelblindstudie bei 132 Patienten mit Herzinsuffizienz im Stadium II nach NYHA. Munch. Med. Wschr., **136** : 27-33.
- TERAMOTO S. and ISHIKURA N., 1985. The formation of catechin and procyanidins in cell suspension cultures of *Cryptomeria japonica*. Bot. Mag. Tokyo, **98** : 171-179.
- THAKUR M.L., 1977. Phenolic growth inhibitors isolated from dormant buds of sugar Maple (*Acer saccharum* Marsh.). J. Exp. Bot., **28** : 795-803.
- TSCHCHE R. und WULFF G., 1973. Chemie und Biologie der Saponine. Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, Ed. Springer Wien-New York, **30** : 460-606.
- THOMPSON R.S., JACQUES D., HASLAM E. and TANNER R.J.N., 1972. Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction : The isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. J. Chem.Soc., Perkin Trans I, 1387-1399.
- TITS M., ANGENOT L., DAMAS J., DIERCKXSENS Y. and POUKENS P., 1991. Anti-inflammatory prodelpinidins from Black currant (*Ribes nigrum*) leaves. Planta Med., suppl., **57**.
- TODA S., KUMURA M., OHNISHI M., 1991. Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. Planta Med., **57** : 8-9.
- TOHVER A., 1969. Effect of illumination conditions on Anthocyanin pigment formation in Buckwheat hypocotyls. Fiziol Rast, **16** : 187-195.
- TOREL J., CILLIARD J. and CILLIARD P., 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. Phytochem., **25** : 383-385.
- UCHIDA S., EDAMATSU R., HIRAMATSU M., MORI A., NONAKA G.I., NISHIOKA I., NIWA M. and OZAKI M., 1987. Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. Med. Sci. Res., **15** : 831-832.
- VAN DE CASTEELE K., GEIGER H., DE LOOSE R. and VAN SUMERE C.F., 1983. Separation of some anthocyanidins, anthocyanins, proanthocyanidins and related substances by reversed-phased high performance liquid chromatography. J. Chromatogr., **259** : 291-300.

- VAN SUMERE C.F., 1989. Phenols and phenolic acids. In : Methods in Plant Biochemistry, Ed. Academic Press, 29-68.
- WADE C. and VAN RIJ A., 1985. *In vivo* lipid peroxidation in man as measured by the respiration excretion of ethane and other low molecular weight hydrocarbon. Anal. Biochem., **150** : 1-7.
- WAGNER G.J., 1982. Compartmentation in plant cells : The role of the vacuole, Recent Advances. Phytochem., **16** : 1-46.
- WAGNER H. and GREVEL J., 1982. Herzwirksame Drogen IV : Kardiotone Amine aus *Crataegus oxyacantha*. Planta Med., **45** : 98-101.
- WAGNER G.J. and HRAZDINA G., 1984. Endoplasmic reticulum as a site of phenylpropanoid and flavonoid metabolism in *Hippeastrum*. Plant Physiol., **74** : 901-906.
- WATERMAN P.G. and MOLE S., 1994. In : Methods in Ecology. Analysis of Phenolic Plant Metabolites, Blackwell Scientific Publications, 44-65.
- WEIDENBORNER M. and JHA H.C., 1993. Antifungal activity of flavonoids and their mixtures against different fungi occurring on grain. Pestic. Sci., **38** : 347-351.
- WEINGES K. and FREUDENBERG K., 1965. Condensed proanthocyanidins from cranberries and cola nuts. Chem. Commun., **11** : 220-221.
- WEINGES K., GÖRITZ K. and NADER F., 1968a. Konfigurationsbestimmung von C₃₀ H₂₆ O₁₂-Proanthocyanidinen und Strukturaufklärung eines neuen Procyanidins. Liebigs Ann. Chem., **715** : 164-171.
- WEINGES K., KALTENHAUSER W., MARX H.D., NADER F., PERNER J. and SEILER D., 1968b. Procyanidine ans Früchten. Liebigs Ann. Chem., **711** : 184-204.
- WEISS S. J., 1989. Tissue destruction by neutrophils. N. Engl. J. Med., **320** : 365-376.
- WILQUIN J., 1984. *Crataegus oxyacantha* L., Données récentes. Thèse doctorat de Medecine présentée à l'Université de Lille II, 88p.
- WOLLENWEBER E. and DIETZ V., 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. Phytochem., **20** : 869-932.
- WOLLENWEBER E. and JAY M., 1988. Flavones and flavonols. In : The flavonoids. Advances in research Since 1980, Ed. J.B. Harborne. Chapman and Hall, New York, 233-296.

YAGI A., UEMURA T., OKAMURA N., HARAGUCHI H., IMOTO T. and HASHIMOTO K., 1994. Antioxidative sulphated flavonoids in leaves of *Polygonum hydropiper*. *Phytochem.*, 35 : 885-887.

YAMAMOTO H., WATANABE K. and TOMIMURI T., 1987. Effects of various growth inhibitors on the callus growth and flavonoid production of *Scutellaria baicalensis* callus cultures. *Shoyakugaku Zasshi*, 41 : 97-101.

YOUNES M. and SIEGERS C.P., 1981. Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion. *Planta Med.*, 43 : 240-244.

YUTING C., RONGLIANG Z., ZHONGJIAN J. and YONG J., 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, 9 : 19-21.

ANNEXES

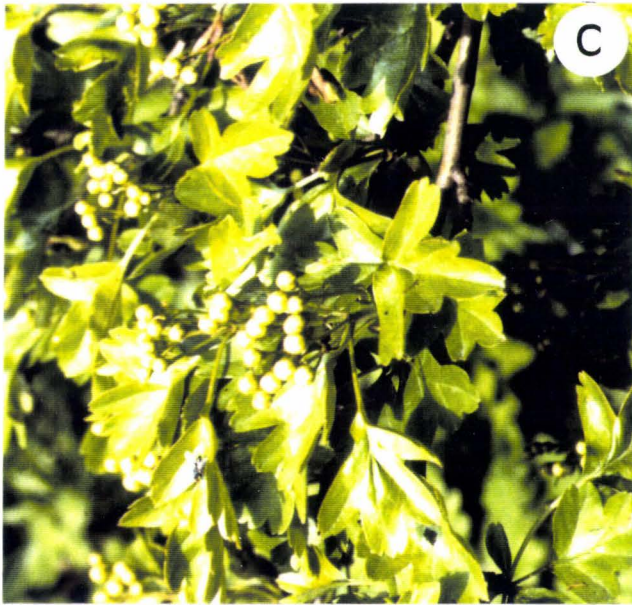


Planche 1 : Organes foliaires et reproducteurs de l'Aubépine *in vivo* récoltés à des différents stades de leur développement : A = bourgeon F1, B = jeune feuille F2, C = feuille F3 et bouton floral, D = feuille F4 et fleur épanouie, E = feuille F5 et fruit vert, F = feuille F6 et fruit rouge.

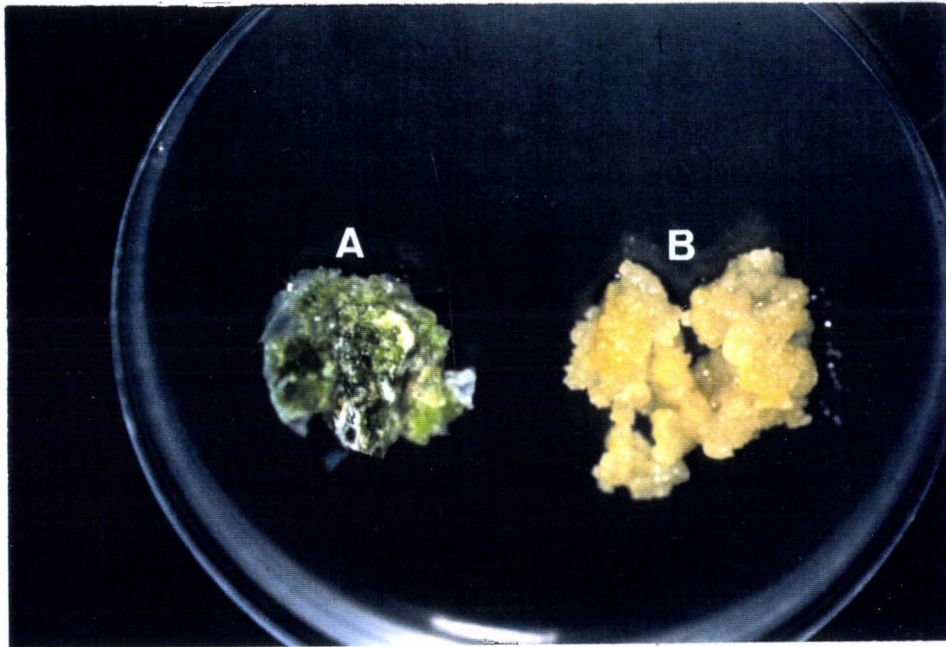


Planche 2 : Colonies tissulaires de pétioles cultivées sur un milieu B₅ de Gamborg contenant soit de l'ANA (2 mg l⁻¹)/Kinétine (0,5 mg l⁻¹) (A), soit du 2,4-D (2 mg l⁻¹)/Kinétine (0,5 mg l⁻¹) (B), sous un éclairage 16h lumière/8h obscurité.

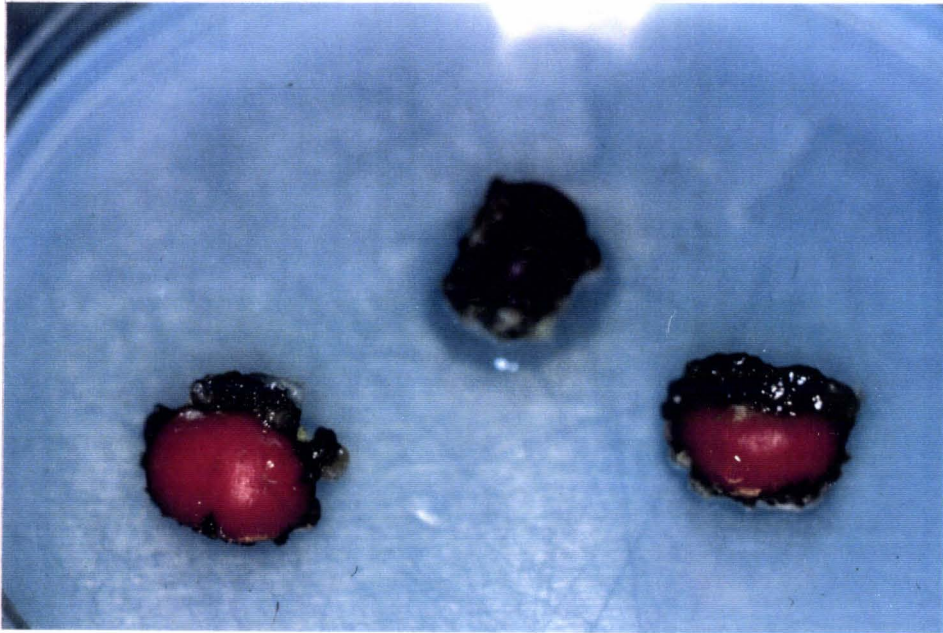


Planche 3 : Formation de “faux fruit” ou “pseudo fruit” à partir d’explants d’ovaires cultivés sur un milieu B₅ de Gamborg contenant de l’ANA (2 mg l⁻¹)/Kinétine (0,5 mg l⁻¹) sous un éclairage 16h lumière/8h obscurité.

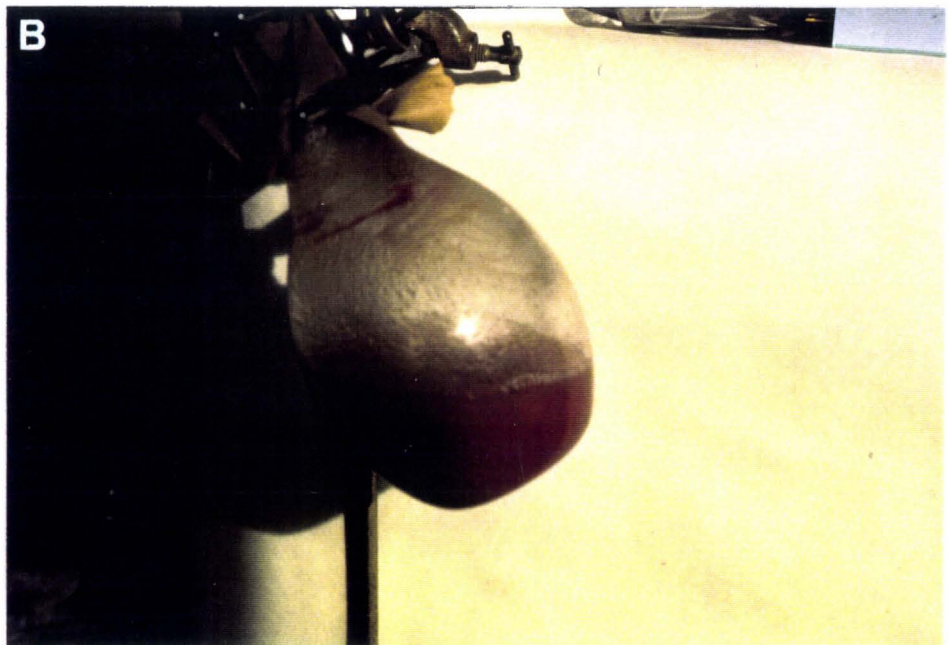
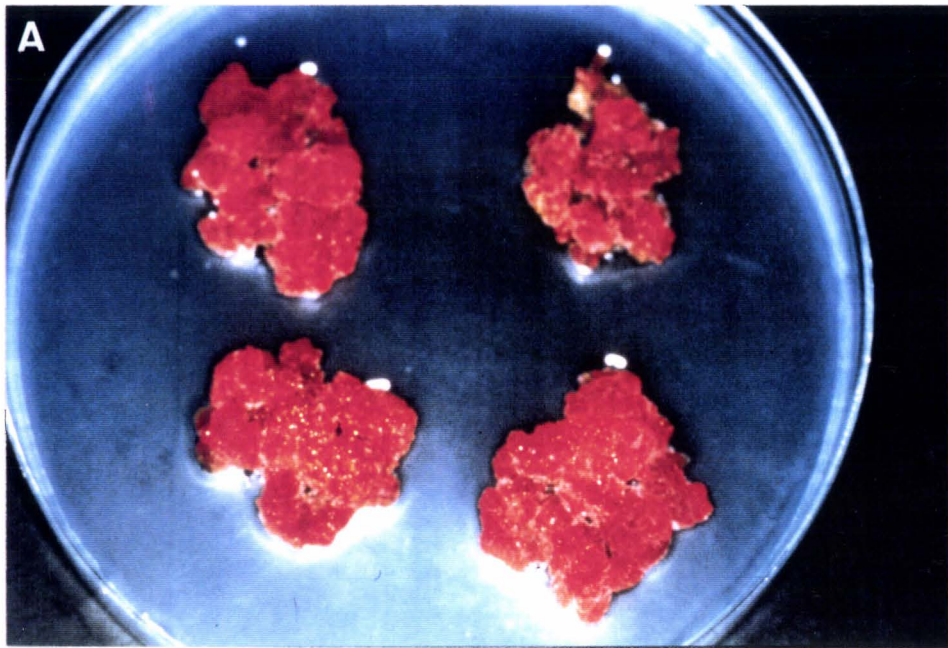


Planche 4 : Colonies tissulaires (A) initiées à partir d'explantats d'ovaires cultivées sur un milieu B₅ de Gamborg contenant du 2,4-D (2 mg l⁻¹)/Kinétine (0,5 mg l⁻¹) en lumière continue et suspensions cellulaires (B) mises en place à partir des colonies tissulaires sur un milieu liquide de même composition en lumière continue.