



Université des Antilles et de la Guyane

École doctorale pluridisciplinaire :
Santé, Environnement et Sociétés dans les Amériques

Thèse pour le doctorat en Phytochimie

Aïra REZAIRE

*Activité anti-oxydante, et caractérisation
phénolique du fruit de palmier amazonien
Oenocarpus bataua (patawa)*

Sous la direction de Bernard Fils-Lycaon

Soutenu le 19 décembre 2012 à Cayenne

Jury :

José Carlos TAVARES, Professeur et recteur de l'Université Fédérale d'Amapa, Brésil,
Rapporteur

Émile GAYDOU, Professeur Émérite des Universités, grade classe exceptionnelle 2^{ème}
échelon, Aix- Marseille, France, **Rapporteur**

Véronique CHEYNIER, Directrice de Recherche à l'INRA, UMR 1083 : Science pour
l'œnologie, France, **Examineur**

Bernard FILS-LYCAON, Chargé de Recherche/HDR INRA, DRRT de la Guadeloupe,
France, **Directeur de thèse**

Didier BEREAU, Maître de Conférences à l'Université des Antilles et de la Guyane, UMR
QualiTrop, France, **Encadrant**

Jean-Charles ROBINSON, Maître de Conférences à l'Université des Antilles et de la
Guyane, UMR QualiTrop, France, France, **Encadrant**



Table des matières

<i>Remerciements</i>	2
<i>Résumé / Abstract</i>	6
<i>Liste des figures</i>	10
<i>Liste des tableaux</i>	15
<i>Chapitre 1 : État de l'art</i>	17
I. Présentation des palmiers amazoniens	18
I.1 Aspect écologique	18
I.1.1 Une origine géographique commune : l'Amazonie	18
I.1.2 Les atouts du bassin amazonien.....	19
I.2 Répartition des palmiers en Amazonie et en Guyane française	21
I.2.1 Introduction	21
I.2.2 Généralités	21
I.2.3 Importance numérique dans le bassin Amazonien.....	22
I.3 Les palmiers d'intérêt économique	22
I.4 Aspect botanique général d'un palmier	24
I.4.1 Le stipe	25
I.4.2 Les feuilles.....	26
I.4.3 Les inflorescences et les fleurs	26
I.4.4 Les fruits et les graines	26
I.4.5 Périodes de fructification observée.....	27
I.5 Utilisation des palmiers	28
I.5.1 Usages traditionnels, et importance des palmiers d'Amazonie	28
I.5.2 Applications industrielles dérivées des fruits de palmiers	31

I.6 Critères de sélection des fruits de palmiers amazoniens	31
I.6.1 Critères économiques	32
I.6.2 Critères scientifiques	32
II Synthèse bibliographique sur les espèces retenues	33
II.1 Présentation de l'espèce référente : <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	33
II.1.1 Description botanique	33
II.1.2 Utilisations traditionnelles	34
II.1.3 Propriétés biologiques d'extrait de fruit d' <i>Euterpe oleracea</i> , et composition phytochimique associée	34
II.2 Présentation de l'espèce étudiée : l'<i>Oenocarpus bataua</i> Mart.	42
II.2.1 Description botanique	42
II.2.2 Utilisations traditionnelles	43
II.2.3 Propriétés biologiques d'extrait de fruit d' <i>Oenocarpus bataua</i> et composition phytochimique associée	45
III Radicaux libres et stress oxydatif.....	46
III.1 Les radicaux libres.....	46
III.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène(ERO).....	47
III.1.2 Les espèces réactives azotées (ERN).....	48
III.2 La production de radicaux libres	49
III.2.1 La production intracellulaire.....	49
III.2.2 La production extracellulaire	51
III.3 Mécanismes d'action des espèces réactives oxygénées et le stress oxydant ou oxydatif	52
III.3.1 Rôle des radicaux libres chez l'homme	52
III.3.2 Rôle des radicaux libres chez les plantes	53
IV Le pouvoir antioxydant	54
IV.1 Protections cellulaires.....	54
IV.1.1 Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes	54
IV.1.2 Systèmes antioxydants non-enzymatiques.....	55

IV.2 Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire	59
V Les composés phénoliques	63
V.1 Généralités, structures et classification.....	63
V.1.1 Les acides phénoliques	65
V.1.2 Les stilbènes	65
V.1.3 Les flavonoïdes.....	65
V.1.4 Les lignanes.....	69
V.2 Propriétés chimiques, et mécanismes d'action contre les radicaux libres.....	69
V.2.1 Propriétés chimiques majeures des polyphénols.....	69
V.2.2 Mécanismes d'action contre les radicaux libres	69
V.3 Propriétés biologiques d'intérêt des composés phénoliques	70
V.4 Applications industrielles des polyphénols	72
VI Objectifs généraux de la thèse	72
Chapitre 2 : Partie expérimentale.....	75
I Échantillonnages.....	76
II Étude des polyphénols.....	77
II.1 Choix de la méthode d'extraction.....	77
II.2 Choix des solvants.....	77
II.3 Étape d'extraction des polyphénols.....	77
Étape d'extraction dite « classique »	77
II.4 Dosage des composés phénoliques	79
II.4.1 Dosage des polyphénols totaux	79
II.4.2 Dosage des flavonoïdes totaux	81
II.4.3 Dosage des proanthocyanidines totaux ou test au DMACA.....	82
II.4.4 Dosage des anthocyanes monomères totaux : méthode des pH différentiels.....	83

II.5 Purification des extraits bruts sur gel Sephadex LH20.....	85
II.6 HPLC et UPLC/ MS des polyphénols	86
II.7 HPLC des anthocyanes.....	88
II.7.1 Analyse qualitative	88
II.7.2 Analyse quantitative	89
II.8 Analyse UPLC des proanthocyanidines par dépolymérisation au phloroglucinol	89
II.8.1 Préparation de l'échantillon.....	92
II.8.2 Analyse qualitative	92
III Étude des vitamines.....	93
III.1.1 Protocole d'extraction de la vitamine E.....	93
III.1.2 Protocole d'extraction de la vitamine C	93
III.1.3 HPLC des vitamines	93
IV Évaluation chimique de l'AO, in vitro.....	95
IV.1 Test DPPH	95
IV.2 Test TEAC ou ABTS⁺	98
IV.3 Test FRAP	98
IV.4 Test ORAC_{Fl}.....	100
V Évaluation biologique de l'AO, in vitro par le test KRL.....	103
Chapitre 3 : Résultats et Discussions.....	107
I Étude menée sur l'épicarpe de l'Oenocarpus bataua	108
I.1 Optimisation du procédé d'extraction par suivi de l'AO (Test DPPH).....	108
I.2 Sélection des conditions optimales d'extractions	114
I.3 Autres évaluations du pouvoir antioxydant des extraits sélectionnés pour l'épicarpe d'Oenocarpus bataua Mart.	115
I.3.1 Étude comparée de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> par tests chimiques	115
I.3.2 Évaluation de l'activité antioxydante par un test biologique	117

I.4 Dosages des polyphénols dans l'épicarpe d'<i>Oenocarpus bataua</i>.....	118
I.5 Investigations chromatographiques par HPLC de l'extrait bruthydroacétonique de l'épicarpe	119
I.5.1 Analyses qualitatives de l'extrait acétonique de l'épicarpe	119
I.6 Conclusion	124
II Étude menée sur le mésocarpe de l'<i>Oenocarpus bataua</i>	126
II.1 Optimisation du procédé d'extraction par suivi de l'AO (Test DPPH).....	126
II.2 Sélection des extraits d'intérêt dans l'étude du mésocarpe.....	131
II.3 Évaluation du pouvoir antioxydant pour les extraits d'intérêt du mésocarpe de l'<i>Oenocarpus bataua</i> Mart.....	131
II.3.1 Étude comparée de l'activité antioxydante <i>in vitro</i> chimique.....	131
II.3.2 Évaluation de l'activité antioxydante par un test biologique	133
II.4 Dosages des polyphénols totaux et sous-familles des extraits de l'épicarpe de l'<i>Oenocarpus bataua</i>.....	134
II.5 Bioguidage et élucidation structurale des composés présents dans l'extrait acétonique du mésocarpe.....	135
II.5.1 Premières analyses qualitatives de l'extrait brut acétone/eau du mésocarpe par HPLC et spectroscopie UV	135
II.5.2 Fractionnement et analyse chromatographique de l'extrait d'intérêt du mésocarpe	138
II.5.3 Activité antioxydante <i>in vitro</i> biologique des fractions purifiées de l'extrait d'intérêt du mésocarpe	141
II.6 Conclusion	142
III Étude menée sur le Mélange Epicarpe Mésocarpe (MEM) de l'<i>Oenocarpus bataua</i> Mart.et comparaison avec l'espèce <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	143
III.1 Choix des conditions d'extraction	143
III.2 Évaluation du pouvoir antioxydant <i>in vitro</i> chimique des extraits du MEM du patawa et du mésocarpe d'açai	144
III.2.1 Étude comparée de l'AO sur les extraits du MEM	144
III.2.2 Étude comparée de l'AO des extraits conservés du MEM et d'autres plantes.....	147
III.3 Évaluation du pouvoir antioxydant <i>in vitro</i> biologique du MEM et d'autres plantes	150

III.4 Dosages des polyphénols totaux et quelques sous-familles des extraits de MEM et comparaison avec l'açaï	151
III.4.1 Analyses qualitatives et quantitatives des anthocyanes majoritaires du MEM et de l'açaï par méthode chromatographique	153
III.4.2 Analyses qualitatives et quantitatives des proanthocyanidines du MEM par phloroglucinolyse	155
III.5 Dosages des vitamines E et C du MEM et de l'açaï	166
III.6 Bioguidage et élucidation structurale relatifs à l'extrait acétonique du MEM	168
III.6.1 Premières analyses qualitatives de l'extrait brut acétone/eau du MEM par HPLC et spectroscopie UV ...	168
III.6.2 Comparaison chromatographique de l'épicarpe, du mésocarpe et du MEM	170
III.6.3 Fractionnement et analyse chromatographique de l'extrait brut de MEM étudié	172
III.6.4 Activité antioxydante <i>in vitro</i> biologique des fractions purifiées de l'extrait d'intérêt du MEM	174
III.6.5 Détermination massique de quelques molécules de l'extrait brut étudié du MEM	175
III.7 Conclusion	180
<i>Conclusion générale & perspectives</i>	<i>182</i>
<i>Annexes</i>	<i>187</i>
<i>Références bibliographiques</i>	<i>193</i>

Remerciements

Cette thèse de doctorat est l'aboutissement d'un travail effectué à l'UMR (Université des Antilles et de la Guyane (UAG) – INRA Antilles-Guyane) QualiTrop (Qualité des fruits et végétaux Tropicaux) dirigée par Madame Sylvie Bercion. J'exprime ma profonde reconnaissance aux financeurs de ce projet : le Fond Social Européen (FSE) géré par la Région Guyane, et l'UAG.

Je tiens à exprimer mes plus chers et vifs remerciements à Monsieur Bernard Fils-Lycaon, directeur de thèse (HDR), actuellement DRRT de Guadeloupe, qui m'a toujours apporté son soutien tout au long de ces quatre années. Merci pour cette confiance sans faille, pour les encouragements dans les moments difficiles comme dans les bons, et d'avoir toujours cru en moi. Nul doute que ce soutien a été très précieux. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Un grand merci à Messieurs Jean-Charles Robinson et Didier Béreau, respectivement Maitres de conférences en biochimie et chimie à l'UAG, tant pour m'avoir donné la chance de travailler sur ce sujet de thèse en m'accueillant dans leur laboratoire, que pour m'avoir guidée dans mon travail durant ces années.

Mes remerciements vont également à Monsieur Jean-Jacques de Granville, spécialiste des palmiers d'Amazonie et ancien Directeur de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) en Guyane, pour sa disponibilité, sa réactivité et son aide scientifique sur l'aspect botanique des palmiers étudiés.

Je souhaite remercier chaleureusement Monsieur Michel Prost, Directeur de la société Kirial, qui a accepté de m'accueillir au sein de son entreprise, à Dijon, afin de me former sur un test d'activité biologique breveté (le test KRL), ainsi que pour à ma disposition de tous les moyens humains et techniques afin de mener à bien les tâches qui m'incombaient. Je le remercie profondément de m'avoir offert de faire jouer son réseau pour des perspectives après la thèse. Au cours de cette formation, j'ai eu la chance de rencontrer Emmanuelle Prost que je tiens à remercier très sincèrement pour sa collaboration et son aide en chimie analytique, Philippe Durant pour m'avoir directement formé sur le test KRL et surtout Marc Haumont pour ses conseils avisés, et son soutien inconditionnel.

Que Monsieur Emile Gaydou, Professeur à l'Université d'Aix- Marseille et Monsieur Carvalho Tavares Professeur à l'université d'Amapa (Brésil) reçoivent mes sincères remerciements pour avoir accepté de rapporter et de juger ce travail de thèse. Merci à vous d'avoir consacré du temps à la lecture de ce travail ainsi que d'y avoir apporté des remarques et des commentaires lors de ma soutenance. J'adresse également ma profonde gratitude à Madame Véronique Cheynier, directrice de recherche à l'INRA, UMR 1083, Science pour l'Œnologie, qui a accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur de ces travaux de recherche.

Mes remerciements vont également à Mesdames Ghislaine Prévot, Maître de conférences en biochimie à l'UAG, et à Karine Martial, technicienne du laboratoire pour votre soutien, vos encouragements et votre disponibilité. Il en est né une véritable amitié.

Je ne saurais oublier mes collègues doctorants, post-doctorants, ATER ou stagiaires : Nono, Muhammad, Manu, Kty, Michel, Wein et Max que j'ai eu la chance de rencontrer durant ces années. Merci pour ces échanges, ces discussions animées, et cette bonne humeur lors de votre passage au laboratoire, sans oublier nos ateliers culinaires (sushis, makis, crumble...), nos barbecues un peu arrosés et surtout nos pauses café très caloriques. Les moments partagés avec vous font partis des meilleurs souvenirs de cette période doctorale...Aux doctorantes du laboratoire Ecofog (Rapha, Milcard, Paule...). Merci les filles de vous être souciées de moi !

Un merci très sincère et affectueux à mon amie de toujours, Dominique. Les appels fréquents m'ont souvent permis de repartir du bon pied lorsque je me sentais découragée. Merci copine ! Merci à Corinne et Audrey pour leur amitié, leur écoute et leur soutien.

A ma sœur adorée Avéline, (mon neveu « Choupoulou ») et à ma maman chérie Anne-Marie. Merci pour leur soutien, leur foi en moi et surtout leur patience. Je vous aime profondément. Sans vous, je n'y serais pas arrivée. A ma Grand-mère, qui malgré son état de santé a toujours cru en moi, et m'a toujours soutenue, tout comme mes tantes (Eugénie, Constance, Nounoune et Christiane), mes oncles (René-Claude, Ernest, Raoul...) et mes cousins, cousines (Koulani, Jean-Lou, Aiéva, Sarda, Annick...). Leur aide et leur soutien ont été un véritable moteur pour moi.

Enfin, à Fred pour son amour, sa patience, son investissement, son aide et ses sacrifices. Pour tout cela, je ne le remercierai jamais assez. Et à toi Kensai, mon fils, qui m'a permis de trouver la force et le courage d'avancer. Je t'aime.

Abréviations

AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride
Ac	Acétone
AG	Acide Gallique
AMT	Anthocyanes Monomères Totales
AO	Antioxydante
C ou Cat	Catéchine
DMACA	p -DiMéthylAminoCinnamAldéhyde
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EAG	Équivalent Acide Gallique
ECy3G	Équivalent Cyanidine 3- <i>O</i> -glucoside
ET	Équivalent Trolox
ES	Extrait Sec
Fl_{Na}	Fluorescéine di-sodique
FT	Flavonoïdestotaux
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
g	gramme
KRL	Kit Radicaux Libres
MeOH	Méthanol
mg	milligramme
MS	Matière Sèche
MF	Matière Fraîche
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PT	Polyphénols Totaux
PAT	Proanthocyanidines Totaux
Rdt	Rendement
α-T	α-tocophérol
TEAC	Trolox Equivalent Antioxydant Capacity
TFA	Acide TrifluoroAcétique
Trolox	Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroma-2-carboxylique
Vit	Vitamine

Résumé / Abstract

En raison de sa richesse en ressources génétiques, et des utilisations traditionnelles locales qui en sont faites, la biodiversité végétale issue du bassin amazonien constitue une véritable source de principes actifs à valoriser. L'espèce *Euterpe oleracea* Mart., vernaculairement appelée baie d'açaï, qui connaît un intérêt scientifique important, est le parfait exemple de ressources naturelles bioactives valorisées issues de cette zone géographique. Les études scientifiques lui confèrent de très nombreuses propriétés biologiques, mais, la plus connue et la plus médiatisée est sa capacité antioxydante liée majoritairement à sa composition polyphénolique. En Guyane française, on peut parler de « diversité » au sein de la famille des Palmiers puisque plus de 75 espèces y ont été recensées. Parmi lesquelles, on peut citer une espèce très commune ayant des propriétés surtout alimentaires, et dont la connaissance phytochimique reste, à l'heure actuelle, très limitée : l'*Oenocarpus bataua* Mart dit patawa. Ce sujet de thèse de doctorat s'articule autour de la mesure de l'activité antioxydante du fruit mûr de ce palmier, et de la détermination des polyphénols responsables de cette dernière.

La singularité de ce travail réside dans l'étude des différentes composantes tissulaires du fruit : mésocarpe, épicarpe et mélange épicarpe/mésocarpe (MEM). Dans un premier temps, les conditions les plus favorables d'extraction de biomolécules (notamment de l'épicarpe et du mésocarpe) ont été définies à l'aide du test DPPH. Les tests préliminaires effectués sur les tissus pris séparément, ont conduit à sélectionner un mélange acétone/eau (70/30, v/v) pour révéler, au mieux, la capacité antioxydante de chaque partie du fruit. Une étape de délipidation initiale s'est avérée nécessaire dans le cas de l'étude du mésocarpe. La confirmation de l'activité antioxydante a été réalisée au moyen d'autres tests d'activité chimique (TEAC, FRAP, ORAC), et a été complétée par l'utilisation d'un test d'activité biologique (KRL) en raison de ses mécanismes réactionnels plus complets. Il en ressort que le tissu végétal le plus antioxydant est le mésocarpe qui contient des proanthocyanidines, famille de composés phénoliques connue pour ses nombreuses activités biologiques.

Le même travail a été effectué sur les tissus regroupés (fruit global ou MEM). Ainsi, a été retenue l'utilisation du solvant mixte acétone/eau sans étape de délipidation initiale. La capacité antioxydante du fruit étudié a été comparée à celle de l'açaï, espèce choisie comme référence. Il s'avère que les extraits d'açaï ont une activité antioxydante très supérieure à celle

du patawa lorsqu'ils sont testés vis-à-vis de l'ORAC et du KRL. Le tissu mésocarpe a, lui, démontré une capacité antioxydante supérieure à celle de l'açaï. Ces résultats sont à associer avec la composition phytochimique propre à chaque fruit. La composition polyphénolique du fruit de patawa, déterminée par UPLC/MSⁿ, supposerait la présence d'anthocyanes, de tanins condensés, de stilbènes et d'acides phénoliques. Ces travaux, qui méritent d'être approfondis, en particulier pour le mésocarpe, ouvrent de nouvelles perspectives d'utilisation du fruit patawa, en particulier l'incorporation de composés phénoliques issus du mésocarpe dans des formulations galéniques ayant attrait aux domaines de la Nutrition, de la Cosmétique et de la Pharmaceutique.

Mots-clés : Activité antioxydante, polyphénols, fruits de palmier amazonien, extraction, HLPC, UPLC/MSⁿ

Due to its wealth in genetic resources, and to traditional uses, plant biodiversity issued from the Amazonian Basin is a real source of active process to valorize. The specie *Euterpeoleracea* Mart., usually called acai berry, which is experiencing a huge scientific interest, is the perfect example of valued natural bioactive resources from the geographic area. Scientific studies give it many biological properties, but the most known is its antioxidant property mainly due to its polyphenolic composition. In French Guiana, we can use the term “diversity” within the palm family with more than 75 species identified. Among them is a common species, *Oenocarpus bataua* Mart., called “Patawa”, mainly with alimentary properties but for which knowledge of phytochemical properties is until now very poor. The present research deals with determining the antioxidant activity of this palm fruit and with the identification of the polyphenols responsible for it.

The uniqueness of this work lays in the study of the different tissue components of this fruit namely the mesocarp, the epicarp and mixing epicarp / mesocarp (MEM). In a first time, the most favorable extraction conditions of biomolecules (particularly of the epicarp and mesocarp) were defined using the DPPH test. The preliminary tests performed on those tissues taken separately, have led to select an acetone / water (70/30, v / v) to reveal, at best, the antioxidant capacity of each part of the fruit. An initial defatting step was necessary in the case of the study of the mesocarp. The confirmation of the antioxidant activity was carried out

by other tests of chemical activity (TEAC, FRAP, ORAC), and was supplemented by the use of a bioassay (KRL) due to its more complete reaction mechanisms. Results point out that the most antioxidant tissue is the mesocarp that contains proanthocyanidins, phenolics of a chemical family known for its numerous biological activities.

The same work was performed on tissues combined (overall result). The mixed solvent acetone / water, without initial defatting step, has been selected. The antioxidant capacity of fruit was compared to that of the Acai specie chosen as a reference. It turns out that acai extracts have antioxidant activity much greater than that of Patawa when tested vis-à-vis of ORAC and KRL. In contrary, mesocarp tissue has a greater antioxidant capacity than that of Acai. These results can be associated with the phytochemical composition of each fruit. The polyphenolic composition of the fruit of Patawa determined by UPLC / MSⁿ, reflects the presence of anthocyanins, condensed tannins, stilbene and phenolic acids. This work, which deserves to be deepened, especially for the mesocarp tissue, opens new prospects for the use of Patawa fruit, especially the incorporation of phenolic compounds from the mesocarp in pharmaceutical formulations linked to the fields of Nutrition, of Cosmetics and Pharmaceuticals.

Keywords: Antioxidant activity, polyphenols, Amazonian palm fruits, extraction, HPLC, UPLC/MSⁿ

Liste des figures

Figure 1 : Zone géographique du bassin amazonien [Béreau, 2001].....	18
Figure 2 : Principaux éléments constitutifs d'un palmier [présentation de de Granville]	24
Figure 3 : Les différents stipes des palmiers amazoniens [présentation de de Granville]	25
Figure 4 : Schématisation d'un fruit entier de palmier et de sa coupe longitudinale [présentation de de granville]	27
Figure 5 : Illustration du palmier <i>Euterpe oleracea</i> et illustration en coupe de ses fruits[Béreau, 2001]	35
Figure 6 : Structure chimique de la cyanidine-3-O-glucoside et de la cyanidine-3-O-rutinoside.....	36
Figure 7 : Structures des flavonoïdes isolés de la pulpe d' <i>Euterpe oleracea</i> et testés en ORAC	36
Figure 8 : Composés issus de l' <i>Euterpe oleracea</i> réactifs dans le test DPPH•	37
Figure 9 : Acides phénoliques présents dans l'huile de pulpe de l' <i>Euterpe oleracea</i>	40
Figure 10 : Phytostérols et tocols majoritaires présents dans l' <i>Euterpe oleracea</i>	41
Figure 11: Principaux acides gras présents dans l'huile d' <i>Euterpe oleracea</i>	41
Figure 12 : Illustration du palmier <i>Oenocarpus bataua</i> et illustration en coupe de ses fruits [Béreau, 2001]....	44
Figure 13 : Tocophérols détectés dans l'huile de pulpe d' <i>Oenocarpus bataua</i>	45
Figure 14 : Phytostérols détectés dans l'huile de pulpe d' <i>Oenocarpus bataua</i>	45
Figure 15 : Schématisation de la molécule biradical libre de dioxygène	46
Figure 16 : Réactions de base intervenant lors de la synthèse et de la dégradation des EOR et des EAR adapté de [Smirnoff, 2005]	47
Figure 17 : Sites de production intracellulaire des ERO (adapté de LJ Machlinet al., 1987).....	50
Figure 18 : Rôle central des ERO dans la signalisation [Smirnoff, 2005]	53
Figure 19: Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires (adapté de LJ Machlinet al, 1987).....	55

<i>Figure 20 : Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 21: Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 22 : Mécanismes d'action antioxydante de la vitamine E sur les radicaux LOO•.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 23 : Exemples de carotène et xanthophylle.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 24 : Mécanismes traduisant l'activité antioxydante des caroténoïdes, cas des ROO•.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 25 : Structure chimique de la 2- phénylbenzopyrane.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 26 : Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques[Leopoldini et al., 2011].....</i>	<i>59</i>
<i>Figure 27 : Structure chimique du Trolox.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 28 : Structure chimique de l'ion phenoxyde.....</i>	<i>69</i>
<i>Figure 29: Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction des polyphénols.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure 30 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique dans le dosage de Folin-Ciocalteu.....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 31 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux.....</i>	<i>82</i>
<i>Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des proanthocyanidines totaux.....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 33 : Dispositif mis au point pour le fractionnement des parties du fruit de l'Oenocarpus bataua.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 34 : Structure chimique de la molécule phloroglucinol.....</i>	<i>90</i>
<i>Figure 35 : Réaction supposée de clivage par catalyse acide des proanthocyanidines [Kennedy et Jones, 2001].....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 36 : Gamme étalon de Trolox® établie avec le test DPPH, et droite du pourcentage d'AO du Trolox®.</i>	<i>97</i>
<i>Figure 37 : Courbes d'absorbance et de pourcentage d'AO obtenues pour un extrait dans le test DPPH.....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 38 : Droite d'étalonnage du sulfate de fer (II) dans le test FRAP.....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 39 : Formation de complexes d'inclusion de cyclodextrines (α ($n = 6$), β ($n = 7$), γ ($n = 8$)) avec une molécule invitée.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 40: Courbes de déclin de fluorescence, et droite d'étalonnage du Trolox® dans le test ORAC.....</i>	<i>103</i>

<i>Figure 41 : Différentes étapes avant la mise en place du test KRL</i>	<i>104</i>
<i>Figure 42 : Courbes d'hémolyse du sang témoin en présence de Trolox® et droite d'étalonnage correspondante</i>	<i>105</i>
<i>Figure 43 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PT d'extraits d'épicarpe en milieu neutre et avec une DI.....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 44 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PT d'extraits d'épicarpe en milieu acide et avec une DI</i>	<i>111</i>
<i>Figure 45 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PT d'extraits d'épicarpe en milieu acide et sans une DI</i>	<i>111</i>
<i>Figure 46 : Effet de l'acidification du milieu lors de l'étape d'extraction des PT d'extraits d'épicarpe.....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 47 : Effet de la délipidation lors de l'étape d'extraction des PT d'extrait d'épicarpe.....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 48 : Étude comparée de l'activité antioxydante des extraits d'intérêt issus de l'épicarpe de l'Oenocarpus bataua</i>	<i>115</i>
<i>Figure 49 : Comparaison de l'activité antioxydante et des PT des extraits d'intérêt de l'épicarpe avec le test KRL</i>	<i>118</i>
<i>Figure 50 : Étude comparée des teneurs polyphénoliques d'extraits de l'épicarpe</i>	<i>119</i>
<i>Figure 51 : Chromatogrammes de l'extrait hydroacétonique de l'épicarpe à différentes longueurs d'onde.....</i>	<i>121</i>
<i>Figure 52 : Superpositions des chromatogrammes de l'extrait brut d'épicarpe et des mélanges qualitatifs à 280nm.....</i>	<i>123</i>
<i>Figure 53 : Structures chimiques de l'acide chlorogénique et de la quercétine 3-O-glucoside.....</i>	<i>124</i>
<i>Figure 54 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PP d'extraits du mésocarpe en milieu neutre et avec une DI.....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 55 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PP d'extraits du mésocarpe en milieu acide et avec une DI.....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 56 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PP d'extraits du mésocarpe en milieu acide et sans une DI.....</i>	<i>129</i>
<i>Figure 57 : Effet de l'acidification du milieu lors de l'étape d'extraction des PP d'extraits de mésocarpe</i>	<i>130</i>

<i>Figure 58 : Effet de la délipidation lors de l'étape d'extraction des PP d'extrait de mésocarpe</i>	<i>131</i>
<i>Figure 59 : Étude comparée de l'activité antioxydante des extraits d'intérêt issus du mésocarpe de l'Oenocarpus bataua</i>	<i>132</i>
<i>Figure 60 : Comparaison de l'activité antioxydante et des PT des extraits d'intérêt du mésocarpe avec le test KRL</i>	<i>134</i>
<i>Figure 61 : Étude comparée des teneurs polyphénoliques d'extraits du mésocarpe.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 62 : Chromatogrammes de l'extrait hydroacétonique du mésocarpe à différentes longueurs d'onde....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 63 : Superposition des chromatogrammes de l'extrait du mésocarpe et des mélanges qualitatifs à 280 nm</i>	<i>137</i>
<i>Figure 64 : Fractions obtenues à partir de la purification sur résine Séphadex LH-20 de l'extrait de mésocarpe</i>	<i>139</i>
<i>Figure 65: Chromatogrammes de la fraction F12 de l'extrait d'intérêt du mésocarpe à différentes longueurs d'onde</i>	<i>140</i>
<i>Figure 66 : Chromatogrammes de la fraction F21 de l'extrait d'intérêt du mésocarpe à différentes longueurs d'onde</i>	<i>140</i>
<i>Figure 67 : Chromatogrammes de la fraction F31 de l'extrait d'intérêt du mésocarpe à différentes longueurs d'onde</i>	<i>140</i>
<i>Figure 68 : Étude comparée de l'AO in vitro chimique des extraits du MEM.....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 69 : Étude comparée de l'AO in vitro chimique d'extraits du MEM et d'autres plantes.....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 70 : Étude comparée de l'AO in vitro biologique d'extrait du MEM et d'autres plantes</i>	<i>150</i>
<i>Figure 71 : Pouvoir antioxydant de différents plantes par le test KRL (tirée d'une présentation de la société Kirial).....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 72 : Étude comparée des teneurs polyphénoliques d'extraits du MEM.....</i>	<i>153</i>
<i>Figure 73 : Chromatogrammes relatifs aux anthocyanes majoritaires dans les extraits de MEM et d'açaï à 515 nm.....</i>	<i>154</i>
<i>Figure 74 : Chromatogrammes de l'extrait brut de patawa MEM avant et après phloroglucinolyse</i>	<i>156</i>
<i>Figure 75 : Spectre de masse du pic à 9mn</i>	<i>158</i>

<i>Figure 76 : Extraction d'ions à la masse 291</i>	158
<i>Figure 77 : extraction d'ions à la masse 431</i>	159
<i>Figure 78 : Extraction d'ion à la masse 415</i>	160
<i>Figure 79 : Fragmentation du pic à 7 minutes</i>	161
<i>Figure 80 : Spectre du pic à 10 minutes</i>	161
<i>Figure 81 : Extraction d'ions à la masse 567</i>	162
<i>Figure 82 : Extraction d'ions à la masse 443</i>	163
<i>Figure 83 : Extraction d'ions à la masse 307</i>	163
<i>Figure 84: Comportement des deux fruits lors de l'étape d'extraction de la vitamine E</i>	166
<i>Figure 85 : Chromatogrammes de l'extrait hydroacétonique du mésocarpe à différentes longueurs d'onde</i>	168
<i>Figure 86 : Superpositions des chromatogrammes de l'extrait brut acétonique du MEM et des mélanges qualitatifs</i>	169
<i>Figure 87 : Superpositions des chromatogrammes de l'épicarpe, du mésocarpe et du MEM à 280 nm</i>	170
<i>Figure 88 : Comparaison des chromatogrammes du MEM, de l'épicarpe et du mésocarpe à 320 nm</i>	171
<i>Figure 89 : Comparaison des chromatogrammes du MEM, de l'épicarpe et du mésocarpe à 360 nm</i>	171
<i>Figure 90 : Comparaison des chromatogrammes du MEM, de l'épicarpe et du mésocarpe à 520 nm</i>	171
<i>Figure 91 : Fractions obtenues à partir de la purification sur résine Séphadex LH-20 de l'extrait du MEM</i> ...	172
<i>Figure 92 : Chromatogrammes de la fraction F12 de l'extrait d'intérêt du MEM</i>	173
<i>Figure 93 : Chromatogrammes de la fraction F13 de l'extrait d'intérêt du MEM</i>	173
<i>Figure 94 : Chromatogrammes de la fraction F22 de l'extrait d'intérêt du MEM</i>	173
<i>Figure 95 : Spectre UV de l'extrait hydroacétonique du MEM à 280 nm</i>	176

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des palmiers dans le monde [De Granville, 1988]	19
Tableau 2 : La famille des ARECACEAE en Guyane française [De Granville, 1988]	23
Tableau 3 : Exemples d'utilisations des palmiers amazoniens	30
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des usages traditionnels de l'espèce de palmier <i>Euterpe oleracea</i>	35
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des usages traditionnels de l'espèce de palmier <i>Oenocarpus bataua</i>	44
Tableau 6 : description de quelques tests antioxydants <i>in vitro</i> chimiques	61
Tableau 7 : Description de quelques tests <i>in vitro</i> biologiques	62
Tableau 8 : Principales classes des composés phénoliques	64
Tableau 9 : Différentes classes des flavonoïdes[Sartori-Thiel, 2003; Hallgas et al., 2004]	68
Tableau 10 : Récapitulatif des conditions de récoltes.....	76
Tableau 11 : Conditions chromatographiques HPLC de l'analyse des polyphénols.....	87
Tableau 12 : Gradient d'éluion HPLC pour l'analyse des polyphénols	87
Tableau 13 : Conditions chromatographiques UPLC d'analyses des polyphénols	87
Tableau 14 : Gradient d'éluion UPLC pour l'analyse des polyphénols.....	88
Tableau 15 : Conditions chromatographiques de l'analyse des anthocyanes	89
Tableau 16 : Gradient d'éluion pour l'analyse des polyphénols	89
Tableau 17 : Gradient d'éluion pour l'analyse des proanthocyanidines.....	92
Tableau 18 : Conditions chromatographiques de l'analyse de la vitamine E.....	94
Tableau 19 : Conditions chromatographique de l'analyse de la vitamine C	94
Tableau 20 : Optimisation du procédé d'extraction sur les extraits d'épicarpe d' <i>Oenocarpus bataua</i> Mart	109
Tableau 21 : Longueurs d'onde utilisées dans l'étude des composés phénoliques.....	120

<i>Tableau 22 : Étude comparative des temps de rétention et des spectres UV-visibles entre l'extrait brut d'épicarpe et les mélanges qualitatifs</i>	123
<i>Tableau 23 : Optimisation du procédé d'extraction sur les extraits de mésocarpe d'OenocarpusbatauaMart .</i>	126
<i>Tableau 24 : Étude comparative des temps de rétention et des spectres UV-visibles entre l'extrait brut de mésocarpe et les mélanges qualitatifs</i>	137
<i>Tableau 25 : Conditions d'extraction des polyphénols du MEM de l'Oenocarpus bataua Mart.</i>	143
<i>Tableau 26 : Rendement d'extraction des polyphénols du MEM</i>	144
<i>Tableau 27 : Comparaison des valeurs d'AO calculées et expérimentales des extraits de MEM</i>	146
<i>Tableau 28 : Comparaison de l'AO d'extrait méthanolique aqueux de mésocarpe du patawa et de différents fruits</i>	149
<i>Tableau 29 : Comparaison de l'AO in vitro chimique entre le patawa et le comou, deux espèces du même genre</i>	149
<i>Tableau 30 : Comparaison des teneurs polyphénoliques calculées et expérimentales des extraits de MEM</i>	153
<i>Tableau 31 : Quantification des anthocyanes majoritaires dans les extraits de MEM et d'acai</i>	154
<i>Tableau 32 : Composés formés à partir de la réaction de phloroglucinolyse</i>	157
<i>Tableau 33 : Temps d'élution des composés déterminés lors du dosage par phloroglucinolyse</i>	164
<i>Tableau 34 : Degré de polymérisation moyen et teneurs en proanthocyanidines du MEM</i>	165
<i>Tableau 35 : Quantités vitaminiques (E et C) d'extrait de MEM et d'acai</i>	167
<i>Tableau 36 : Étude comparative des temps de rétention et des spectres UV-visibles entre l'extrait brut de MEM et les mélanges qualitatifs</i>	169

Chapitre 1 : État de l'art

I. Présentation des palmiers amazoniens

Dans un souci de bien-être et de santé, la recherche et l'innovation industrielle s'orientent aujourd'hui vers l'utilisation de substances naturelles, aussi bien dans le domaine de la Nutrition que dans ceux de la Cosmétique ou de la Pharmacie. Éléments indissociables de la biodiversité de la forêt amazonienne, les palmiers constituent une bioressource encore trop peu exploitée, et dont les potentialités ont été encore peu recherchées.

I.1 Aspect écologique

I.1.1 Une origine géographique commune : l'Amazonie

L'Amazonie constitue la plus vaste forêt tropicale du monde puisqu'elle occupe le vingtième de la superficie terrestre, les 4/10^e de l'Amérique du Sud, les 3/5^e du Brésil, et représente le tiers des réserves mondiales de forêts tropicales. Bien que la véritable extension géographique du bassin ne soit pas encore définie avec exactitude, le chiffre maintenant admis est de 6,74 millions de km² (Figure 1). Neuf pays se partagent ce bassin hydrographique ; le Brésil, la Bolivie, le Pérou, l'Équateur, la Colombie, le Venezuela, le Guyana, le Surinam et la Guyane française [Droulers, 2004].



Figure 1 : Zone géographique du bassin amazonien [Béreau, 2001]

I.1.2 Les atouts du bassin amazonien

I.1.2.1 Définition de la biodiversité

Le terme 'biodiversité' — contraction de « biologie » et « diversité » apparue en 1986 — renvoie à une catégorie très large et assez vague. Elle intègre la diversité des espèces animales et végétales, la diversité des situations écologiques (habitats, niches écologiques) et la diversité génétique des populations. Autrement dit, la diversité biologique est la variété et la variabilité de tous les organismes vivants. Bien qu'elle ne représente que 7% de la surface terrestre, on estime que la forêt tropicale héberge 70% des espèces peuplant notre planète.

Parmi elles, environ 40 000 espèces de plantes ont été répertoriées, et, régulièrement, de nouvelles espèces sont découvertes [Da Silva *et al.*, 2005]. Cette biodiversité se traduit par un nombre impressionnant d'échantillons de plus de 700 espèces d'arbres et plus de 1500 plantes à fleurs différentes par hectare. Par comparaison, les forêts d'Europe ne comptent pas plus d'une dizaine d'espèces d'arbres et d'arbustes à l'hectare [Roulier, 2005].

Le Brésil, qui est le pays le plus riche en termes de biodiversité [Da Silva *et al.*, 2005], disposeraient de 14 à 20 % du total des espèces de la terre. Il disposerait également de la flore la plus diversifiée avec 55 000 espèces, ce qui représente 20 à 22 % des espèces connues de plantes. La richesse de cette biodiversité tropicale amazonienne est bien illustrée par l'exemple du palmier. La famille *Palmae* ne comprend pas moins de 1150 espèces distinctes, pour la seule Amérique, sur les 2800 espèces mondiales recensées (Tableau 1) [Moore, 1973].

Situation géographique		Genres	Espèces
<i>Amérique</i>	Nord	48	339
	Sud	64	837
	dont la Guyane	18	71
	Sous-Total	81	1150
<i>Afrique + Europe</i>		16	117
<i>Madagascar + Seychelles + Mascareignes</i>		29	132
<i>Asie tropicale + Australie</i>		97	1385
Total		212	2782

Tableau 1 : Répartition des palmiers dans le monde [De Granville, 1988]

I.1.2.2 *Des ressources à préserver et à valoriser*

La préservation des ressources végétales issues de la biodiversité amazonienne peut revêtir plusieurs formes :

- une protection d'un patrimoine génétique donné, la préservation d'espèces particulières menacées, ou non, (laquelle n'est pas forcément incompatible avec leur utilisation économique, notamment en écotourisme) et la protection de milieux naturels entiers (biotopes), menacés de destruction ou de surexploitation alors qu'ils abritent une biodiversité endémique très riche
- une valorisation économique des ressources naturelles, qui constitue un axe majeur de la politique de développement économique des Régions Ultrapériphériques (RUP)

Ont ainsi été reconnus les rôles économiques joués par la biodiversité à plusieurs titres [**Heal, 2003**]:

- « La biodiversité accroît le *rendement* des exploitations agricoles et forestières par le croisement d'espèces
- elle favorise la *résistance des habitats* aux épidémies (par la diversité génétique plus ou moins résistante aux agents infectieux)
- elle permet *la découverte de nouveaux remèdes*, comme en témoignent par exemple l'aspirine et la quinine qui sont des produits dérivés des écorces du saule blanc et du quinquina
- elle augmente *la quantité et la qualité des services rendus par les écosystèmes* : réduction des risques naturels (érosion, inondation, incendies), dépollution, autoépuration, écotourisme, etc.... »

Malheureusement, collatéralement à cette emphase portée à la biodiversité amazonienne, existe, aussi, le côté plus négatif de la déforestation due aux cultures de soja ; plus du cinquième de la forêt amazonienne ayant déjà été détruit [**CIFOR, 2004**].

I.2 Répartition des palmiers en Amazonie et en Guyane française

I.2.1 Introduction

Comme tous les êtres vivants, les palmiers font l'objet d'une classification (selon le modèle établi initialement par Carl von Linné en 1753 dans son ouvrage « *Species Plantarum* ») dont quelques notions vont être présentées ici, afin d'appréhender au mieux une nomenclature qui peut parfois sembler complexe.

Les palmiers constituent la famille *Palmae*. Le nom *Arecaceae* est aussi utilisé, et est souvent mentionné dans la littérature spécialisée. La famille regroupe des sous-familles, lesquelles regroupent des genres qui, enfin, regroupent des espèces, elles-mêmes divisées en sous-espèces et variétés.

Pour des raisons pratiques, et afin de mettre en évidence les affinités de certains genres dans les sous-familles, le systématicien est amené à faire des groupes intermédiaires entre la sous-famille et le genre, appelés tribus et sous-tribus.

I.2.2 Généralités

Les palmiers sont principalement pantropicaux¹ et occupent des habitats tels que les forêts humides de basse altitude, les déserts, les mangroves, ou encore, les forêts de haute montagne. Ils sont grégaires (formant parfois de denses peuplements) ou solitaires.

Les données relatives quant à la distribution géographique et au nombre d'espèces de palmiers ne sont pas récentes. En effet, Moore publie, en 1973, qu'à l'échelle mondiale, il existait environ près de 2800 espèces de palmiers, lesquelles sont réparties en 212 genres. Toutefois, de nouvelles espèces ont, depuis, été découvertes et décrites ; les proportions restent sensiblement les mêmes, et peuvent donner une idée générale correcte sur la richesse en palmiers des différentes parties du monde.

Cette répartition géographique à travers le monde est plus ou moins disparate (Tableau 1).

¹ Pantropical : relatif à l'ensemble de la zone tropical

I.2.3 Importance numérique dans le bassin Amazonien

Sur l'ensemble du bassin amazonien et des Guyanes, on dénombre environ 180 espèces de palmiers réparties en 34 genres, ce qui classe les palmiers à la première place des plantes les plus abondantes dans cette partie du globe [Manzi et Coomes, 2009]. Cette région s'étend du Venezuela jusqu'au centre du Brésil et couvre une superficie de près de 6,5 millions de km² ; comptant à elle seule 20 % des 212 genres déjà recensés (Annexe 1).

La distribution de ces espèces dans la zone amazonienne n'est pas homogène puisque c'est dans l'ouest, au pied des Andes, que les populations sont les plus concentrées ; les régions les moins riches étant situées vers l'est. Selon Moore, il faudrait rechercher cette pauvreté dans les effets des fluctuations climatiques du globe, qui ont été ressenties différemment sur chaque continent.

Le nombre d'espèces de palmiers recensées en Guyane française augmente, passant de 68 en 1992 [Kahn et De Granville, 1992], à 71 en 2007 [De Granville, 2007]. Malgré ces découvertes, les proportions restent inchangées en ne représentant qu'à peine 6 % de tous les palmiers américains et 2,4 % des espèces existant dans le monde entier, ce qui n'a rien de très étonnant étant donné la faible superficie de la Guyane (1,5 %) par rapport à l'ensemble de l'Amérique tropicale (Tableau 2). Dans l'état actuel des connaissances, il existe 9 espèces tout à fait endémiques à la Guyane Française, qui font l'objet de collections ponctuelles (Annexe 2). Ce sont, pour la plupart, des espèces rares, récemment décrites ou nouvelles.

Il est, bien sûr, possible qu'on les retrouve un jour de l'autre côté des frontières guyanaises.

I.3 Les palmiers d'intérêt économique

Tous les palmiers n'ont pas la même importance pour l'Homme. Plusieurs espèces ont un potentiel économique, et jouent un rôle décisif dans la mise en valeur des forêts. D'autres constituent des sources de gènes pour améliorer les précédentes espèces. D'autres, enfin, sont d'utilité mineure. Un palmier possèdera un véritable potentiel économique s'il présente les critères suivants [Kahn, 1997]:

- le produit dérivé du palmier doit être manufacturable (conserverie de cœurs de palmier, huile, fibres, cosmétiques, produits alimentaires...)
- la production doit être importante en quantité et qualité
- il doit offrir la possibilité d'amélioration génétique de l'espèce par le croisement des plantes les mieux dotées.
- il ne doit pas menacer la biodiversité de la région, en particulier les espèces endémiques

Ce potentiel sera accru si le palmier forme des peuplements spontanés dans des milieux impropres à l'agriculture.

Tribus	Sous-tribus	Genres	Nombre d'espèces par genre
LEPIDOCARYEAE		Mauritia	1
		Mauritiella	1
HYOPHORBEAE		Chamaedorea	1
IRIARTEEAE	Iriarteinae	Socratea	1
ARECEAE	Manicariinae	Manicaria	1
	Euterpeinae	Euterpe	1
		Hyospathe	1
		Oenocarpus	3
COCOEAE	Butiinae	Syagrus	2
	Attaleinae	Attalae	7
	Elaeidinae	Elaeis	1
	Bactridinae	Acrocomia	1
		Astrocaryum	8
		Bactris	23
		Desmoncus	4
GEONOMEAE		Asterogyne	1
		Geonoma	14
		Total	71

Tableau 2 : La famille des ARECACEAE en Guyane française [De Granville, 1988]

Plusieurs espèces ont été exploitées de longue date par l'homme, et sont d'importance économique: *Euterpe precatória*, *Oenocarpus bataua*, *Acrocomia aculeta*, *Astrocaryum aculeatum*...Le Brésil est un exemple probant de pays capable d'une exploitation intelligente

de palmiers avec l'*Euterpe oleracea* (également nommé **açaï**) dont les fruits et produits dérivés connaissent un succès important dans des pays tels que les États Unis, le Japon, l'Australie et désormais l'Europe. [Heinrich *et al.*, 2011].

I.4 Aspect botanique général d'un palmier

Les Palmiers sont des Monocotylédones, au même titre que les Graminées. Cela signifie qu'ils sont dépourvus de cambium, tissu indifférencié assurant la production des organes nouveaux. Par conséquent, il n'y a ni accroissement des palmiers en épaisseur, ni augmentation du diamètre du tronc. Ils ne peuvent être donc pas qualifiés d'arbres, mais s'apparentent plutôt à des "herbes géantes" dont le « tronc » est appelé stipe.

Les principaux éléments constitutifs d'un palmier sont (Figure 2) [Kahn, 1997]:

- le stipe dont l'extrémité est constitué d'un bourgeon apical
- les feuilles disposées en forme de couronne
- les inflorescences et les fleurs
- les fruits et les graines

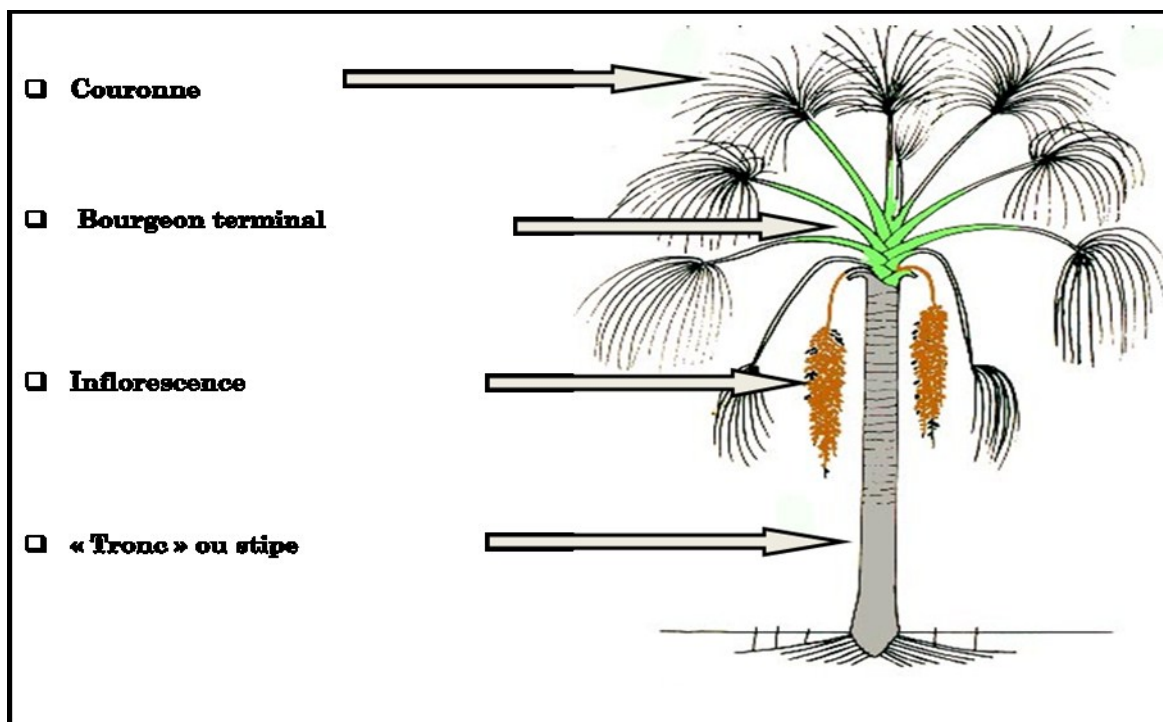


Figure 2 : Principaux éléments constitutifs d'un palmier [présentation de de Granville]

I.4.1 Le stipe

Le stipe se développe au-dessus du sol ou reste sous terre. Sorti du sol, il est massif, en forme de colonne, cylindrique ou renflé, trapu, élancé ou grêle, érigé ou rampant, clair ou sombre, lisse ou sculpté par des cicatrices foliaires, nu ou recouvert par les gaines des feuilles mortes qui persistent sur toute sa longueur ou seulement à sa partie supérieure.

Il est inerme² ou armé d'épines. Souterrain, il peut atteindre 70 cm de long et 15 cm de diamètre. Il s'enfonce au cours de sa croissance, et ne voit jamais la lumière du jour.

Ainsi, la plupart des palmiers sont-ils monocaules, ne produisant qu'un seul stipe. De très rares espèces sont, par contre, multicaules, alors que d'autres n'élaborent pas de stipe (elles sont acaules) ou sont devenues des lianes (Figure 3).

Le stipe est terminé par un bourgeon apical qui est l'organe vital des palmiers. C'est ce bourgeon qui est responsable du développement du palmier.

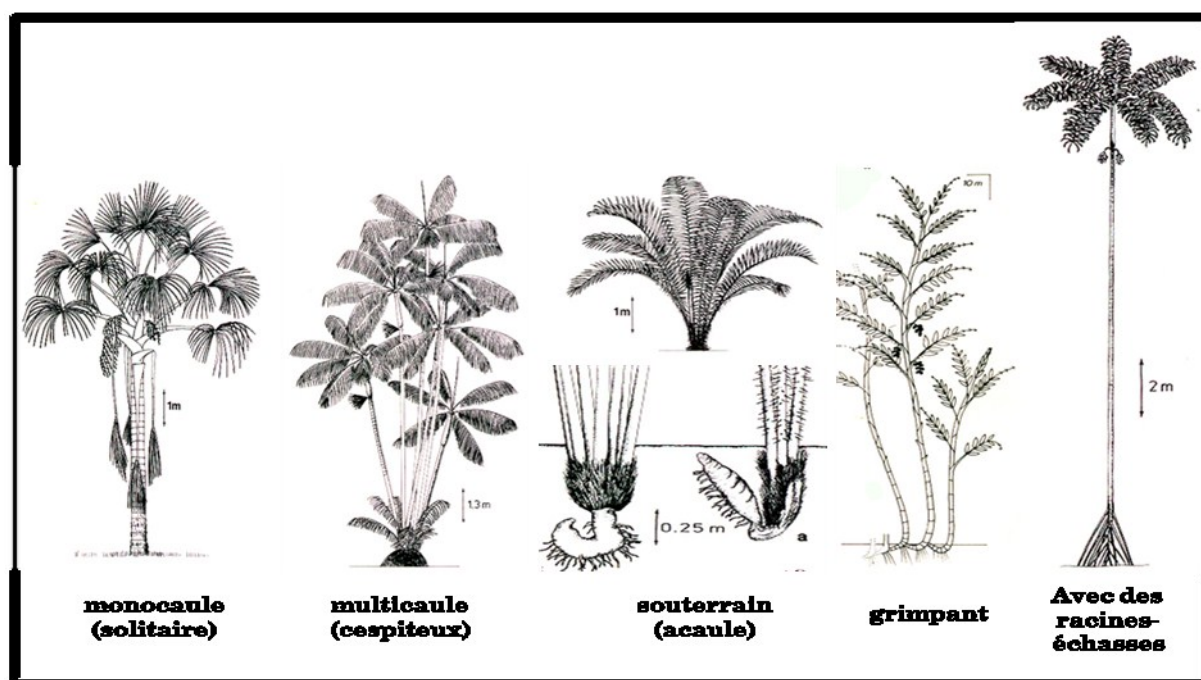


Figure 3 : Les différents stipes des palmiers amazoniens [présentation de de Granville]

² Inerme : Qui n'a ni aiguillon, ni épine

I.4.2 Les feuilles

L'étude morphologique et ontogénique³ permet de définir 4 types principaux de feuilles ou palmes (Annexe 3):

Elles sont de **type palmé** lorsque les parties du limbe⁴ (ou foliole⁵) rayonnent à partir de l'extrémité du pétiole⁶, tel un éventail.

Elles sont **costapalmées** lorsque les folioles ne partent pas exactement d'un point ; elles sont alors densément insérées sur un très court rachis⁷.

Elles sont **pennées** lorsque les folioles sont irrégulièrement insérées sur un rachis presque aussi long que le limbe de la feuille, telle une plume. Chez les petites espèces, les feuilles pennées peuvent ne porter que deux ou trois paires de folioles.

Elles sont **bipennées** lorsque le limbe n'est pas divisé en folioles.

La couronne est donc l'ensemble des feuilles à l'extrémité du stipe. Celles-ci peuvent être disposées en spirales plus ou moins denses, remplir une sphère, ou être concentrées dans les trois-quarts ou la moitié supérieure de la sphère.

I.4.3 Les inflorescences et les fleurs

Selon les groupes taxinomiques, les plantes portent les deux sexes, sur un même pied (espèces **monoïques**), ou alors chaque plante a son propre sexe (espèces **dioïques**). Les palmiers n'échappent pas non plus à cette règle.

I.4.4 Les fruits et les graines

Les fruits sont très variés en forme, couleur et consistance. Ils sont sphériques, ellipsoïdes, ovoïdes, réniformes⁸, petits à très gros, de moins de 1 cm jusqu'à plus de 10 cm dans leur plus grande dimension.

³Ontogénique : qualifie ce qui est relatif au développement de l'individu (organisme) depuis la fécondation de l'œuf jusqu'à l'état adulte

⁴Limbe : partie aplatie et verte de la feuille

⁵Foliole : chez les feuilles, le limbe est fractionné en folioles, cas de la feuille composée

⁶Pétiole : partie de la feuille entre la tige et le limbe

⁷Rachis : axe secondaire présent sur les feuilles composées

L'**épicarpe** revêt plusieurs aspects : lisse, sillonné, écailleux ou verruqueux⁹, glabre, velu ou épineux, verdâtre, jaune, orange, rouge, violet ou bleu noir.

Le **mésocarpe** revêt aussi plusieurs aspects : sec, charnu, juteux, farineux ou fibreux, blanchâtre, jaune, orange ou bleuté.

L'**endocarpe** est de membraneux à très dur, clair à noir. Il y a une ou plusieurs graines par fruit.

A l'intérieur de la graine, l'**albumen** est blanc ou jaunâtre ; liquide ou gélatineux lorsque le fruit est encore vert, il devient solide et très dur à maturité.

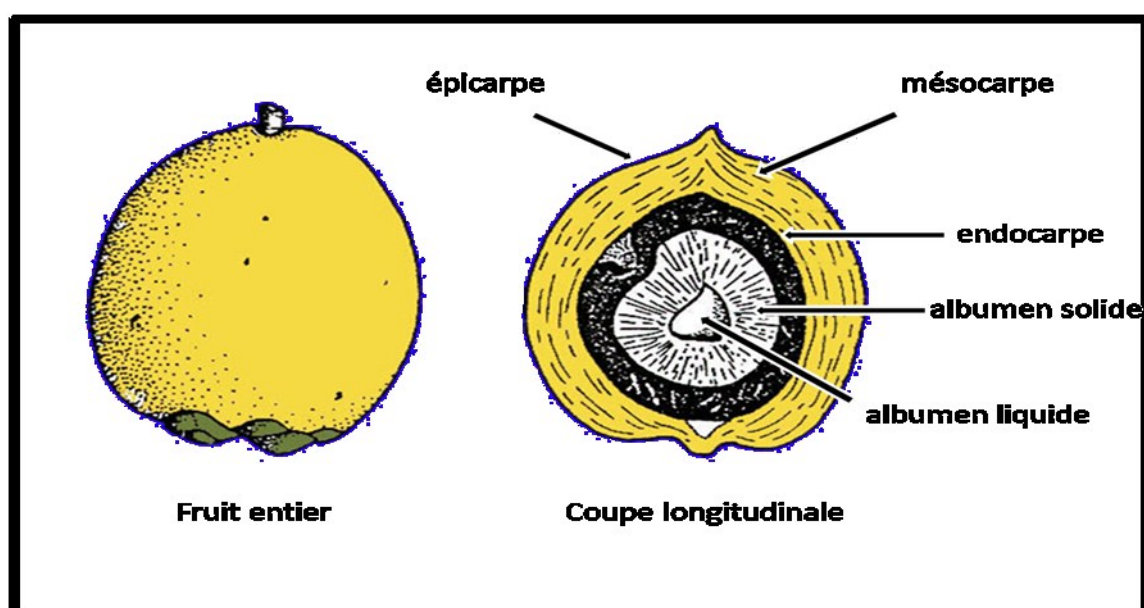


Figure 4 : Schématisation d'un fruit entier de palmier et de sa coupe longitudinale [présentation de de granville]

I.4.5 Périodes de fructification observée

Les saisons de fructification des principaux palmiers amazoniens dépendent des climats locaux, et sont différentes suivant que l'on se trouve à l'Est ou à l'Ouest du bassin amazonien. Cependant, en général, la fructification se déroule en périodes des pluies pour la plupart des espèces [Béreau, 2001].

⁸ Réniforme : en forme de rein

⁹ Verruqueux : relatif aux verrues

I.5 Utilisation des palmiers

I.5.1 Usages traditionnels, et importance des palmiers d'Amazonie

Les utilisations traditionnelles des palmiers, qu'elles soient culinaires, médicinales et artisanales, font partie intégrante de la culture des populations amazoniennes ; jusqu'alors ces applications n'étaient transmises que de façon orale de génération en génération. Aujourd'hui, ces usages sont reconnus scientifiquement, et de plus en plus d'études et de documents traitant des usages des palmiers sont disponibles, ce qui permet de se rendre compte de l'importance de ces plantes pour les populations locales [Campos et Ehringhaus, 2003; Araujo et Lopes, 2012].

I.5.1.1 Utilisations culinaires

Des palmiers marquant le paysage amazonien, sur la centaine d'espèces connues et présentes en Amazonie, quelques-unes sont très appréciées dans l'alimentation. Une des principales qualités du palmier réside dans l'utilisation culinaire de chaque partie de la plante.

La sève tirée du **stipe**, après fermentation, permet d'obtenir un vin de palme alcoolisé. Cette pratique, encore très courante en Afrique, s'est perdue en Amérique du Sud [Kahn, 1997].

Le **bourgeon terminal** de tous les palmiers, qui n'est autre que la feuille dernière-née encore repliée sur elle-même, est comestible ; il a un goût très fin, et sert à faire de salades. La partie la plus tendre est coupée en tronçons d'une dizaine de centimètres de longueur, et est mise en conserve. Elle est connue commercialement sous le nom de cœur de palmier [Kahn, 1997].

Certains **fruits** peuvent être consommés crus, ou entrer dans la confection de plats traditionnels (*Astrocarym vulgare*, *Bactris gasipaes*), ou encore être utilisés pour la réalisation d'une boisson, sorte de lait ou de jus avec lequel on peut réaliser un sorbet. Le « lait » qui peut être consommé nature, salé ou sucré s'obtient par trempage des fruits dans l'eau à 40 – 50°C pendant 10 à 30 minutes. Dès que les fruits sont broyés, le jus est recueilli, filtré et ensuite dégusté (*Euterpe*, *Oenocarpus*, *Mautitia flexuosa*) [CNAC, 1999].

Chez la plupart des palmiers, l'**albumen** est liquide dans le fruit immature. Lors de marches en forêt, les Amazoniens cassent les noyaux pour boire cette eau rafraîchissante (l'eau de coco) [Kahn, 1997].

L'**huile** issue des palmiers, également très appréciée, est obtenue en travaillant la pulpe et la graine écrasées dans l'eau chaude afin de faire fondre les graisses, et de les récolter dans le surnageant [Carli *et al.*, 2008].

Le **noyau** de certains fruits contient une amande d'où l'on peut extraire une graisse alimentaire [Kahn, 1997].

I.5.1.2 *Utilisations médicinales*

Les palmiers sont assez peu représentés dans la pharmacopée traditionnelle. On peut tout de même citer quelques exemples d'applications aux vertus reconnues.

Les racines de plusieurs espèces (*Euterpe precatoria*, *Oenocarpus bataua*) sont préconisées en décoction pour soigner les fièvres, les maux de têtes, les diarrhées, et éliminer les parasites intestinaux [Schultes et Raffauf, 1990].

Dans la pharmacopée traditionnelle en Guyane, seules neuf espèces de palmiers sont signalées, dont le cocotier. On retiendra que l'huile extraite de l'amande de l'espèce *Astrocarym vulgare* a la propriété de soigner les furonculoses [Grenand *et al.*, 1987].

I.5.1.3 *Utilisations artisanales*

Tout comme l'aspect culinaire, plusieurs parties du palmier trouvent leurs intérêts et leurs applications dans le domaine artisanal (Tableau 3) [De Granville, 1988; Kahn, 1997].

De nombreux objets décoratifs ou fonctionnels sont fabriqués à partir des feuilles, des graines, des amandes et du stipe.

Les différentes parties du palmier font aussi office de parfaits substituts en matière de construction, en particulier pour les populations locales au revenu modeste.

Partie exploitée du palmier		Feuilles		Pétiole de la feuille		Graines et amandes		Bractées de l'inflorescence		Stipe	
Genre ou espèce	Confection	<i>Astrocaryum</i>	Paniers	<i>Mauritia flexuosa</i>	Bouchons	<i>Astrocaryum, Euterpe, Socratea</i>	Colliers	<i>Manicaria</i>	Chapeaux	<i>Iriartella, Mauritia, Oenocarpus</i>	Pointes de flèches et d'arcs, sarbacanes
			Chapeaux		Jouets		Bracelets		Sacs à main		Fibres, amidon
			Filets de pêche		Voitures miniatures		Bagues		Porte-monnaie		Portes de maisons villageoises
			Hamacs				Pendentifs		poupées		Volets et planchers
			Toiture de maisons								

Tableau 3 : Exemples d'utilisations des palmiers amazoniens

I.5.2 Applications industrielles dérivées des fruits de palmiers

Bien que la recherche d'activité biologique issue des fruits de palmier en soit à ses prémices, certains fruits ont déjà fait l'objet de véritables études, en raison de leur forte domestication.

En voici quelques exemples :

- La mise en évidence d'activité anti-inflammatoire et anti-raideur rhumatismale, concrétisée par le dépôt de 3 brevets, dont un à l'échelle internationale (un en 2004 et deux en 2005) pour l'espèce *Astrocaryum vulgare* [PNR, 2006],
- La création de produits dérivés dans le domaine des cosmétiques, grâce notamment aux propriétés émoulliente et hydratante dues aux fortes teneurs en vitamine A et caroténoïdes de l'huile extraite des fruits du palmier *Mauritia flexuosa* [Zanatta et al., 2010],
- L'apport et la confirmation de connaissances sur le liquide et la chair présents dans la noix de l'espèce *Cocos nucifera* L. (espèce introduite en Amazonie) connus initialement pour leurs bienfaits nutritionnels, et qui sont utilisés, aujourd'hui, pour leurs propriétés biologiques antiparasitaires, antioxydantes, immunostimulantes et hypoglycémiques [DebMandal et Mandal, 2011],
- L'étude phytochimique approfondie des fruits de l'*Euterpe Oleracea*, en raison des propriétés thérapeutiques que lui attribuait la médecine traditionnelle, notamment au Brésil, et la valorisation de ces activités par la commercialisation de nutraceutiques et de dermocosmétiques grâce, en partie, à la présence de composés polyphénoliques [Lichtenthäler et al., 2005].

Il n'est donc pas impossible que d'autres fruits de palmiers amazoniens renferment des propriétés biologiques équivalentes ou, peut-on l'espérer, plus intéressantes que celles précédemment décrites.

I.6 Critères de sélection des fruits de palmiers amazoniens

Du chapitre précédent, il ressort que la connaissance chimique et biochimique des fruits de palmiers peut être synonyme de débouchés économiques, et de découvertes scientifiques majeures.

I.6.1 Critères économiques

La démarche de ces travaux de thèse s'inscrit dans une tendance globale qui associe biomolécules et bien-être. Le marché des substances naturelles connaît, depuis quelques années, une très forte croissance, tant dans le domaine alimentaire que dans les domaines cosmétique et pharmaceutique.

Le développement de produits innovants à partir des bio-ressources issues de l'Amazonie et aussi de la Guyane aurait des répercussions réelles et positives sur une économie locale émergente en permettant, à terme, de développer de véritables filières pour les secteurs agroalimentaires et cosmétiques, à l'instar du modèle brésilien. On peut citer les exemples du camu-camu qui, avec sa grande richesse en vitamine C, rentre dans la fabrication de produits diététiques [Rodrigues *et al.*, 2001], du guarana qui, avec sa composition en alcaloïdes et en polyphénols, sert d'additifs et de compléments alimentaires [Carlson et Thompson, 1998] et de l'acérola dont les qualités nutritionnelles sont largement exploitées pour la fabrication de produits alimentaires et pharmaceutiques [Assis *et al.*, 2008].

I.6.2 Critères scientifiques

Le choix particulier de l'espèce *Oenocarpus Bataua* Mart. réside, d'une part, dans son utilisation traditionnelle par les communautés locales, et, d'autre part, dans sa disponibilité et son accessibilité géographique en Guyane. De plus, peu d'informations relatives aux données phytochimiques de ce palmier sont accessibles actuellement mis à part les études mettant en jeu ses fractions lipidiques.

L'hypothèse selon laquelle cette espèce de palmier renfermerait des biomolécules aux propriétés biologiques intéressantes ayant notamment des capacités antioxydantes, repose sur la similitude des caractères organoleptiques de ce fruit avec celui de l'espèce *Euterpe oleracea*, caractérisé par ses anthocyanes (molécules appartenant à la famille des polyphénols) [Lichtenthaler *et al.*, 2005], espèce référente dans cette étude.

La justification de la recherche scientifique de l'activité antioxydante issue de ressources végétales, n'est plus à démontrer, en raison, d'une part, de l'apport positif de ces molécules naturelles sur la conservation des denrées alimentaires, et, d'autre part, de leurs rôles protecteurs vis-à-vis du stress oxydatif dû à l'excès de radicaux libres, et associé notamment à de nombreuses pathologies [Rice-Evans *et al.*, 1996; Bravo, 1998].

II Synthèse bibliographique sur les espèces retenues

II.1 Présentation de l'espèce référente : *Euterpe oleracea* Mart.

II.1.1 Description botanique

Ce palmier est très commun en Amérique du Sud, et est exclusivement inféodé à la forêt marécageuse où il forme parfois de très grandes populations.

Il appartient à la famille des Arecaceae, et peut s'élever de 3 à 20 m de hauteur et plus, dont la couronne dépasse souvent la frondaison¹⁰ de la forêt. C'est un palmier à port cespiteux ; chaque touffe peut porter jusqu'à une dizaine de stipes grêles, élevés, de couleur clair et de diamètres pouvant mesurer de 7 à 18 cm (Figure 5) [Henderson, 1995a].

Les feuilles sont pennées, disposées en couronne, de couleur vert clair. Les longues et étroites folioles pendantes confèrent à cet élégant palmier d'indéniables qualités ornementales.

Les fleurs sont à ramifications multiples, hermaphrodites, et sont disposées en groupe de 3 ; les fleurs mâles sont latérales, et les fleurs femelles médianes. Chaque pied produit de 6 à 8 grappes à partir de 4 ans, soit à l'âge adulte [Carli *et al.*, 2008].

Le fruit est une drupe obliquement globuleuse de 1 à 2 cm de diamètre, de couleur noir violacé à presque noire, avec une mince peau entourant une faible couche de pulpe aqueuse de même couleur. La pulpe très mince, de couleur violacée, entoure un noyau globuleux et fibreux à albumen profondément ruminé (Figure 5).

Il se reproduit toute l'année, et est fréquent sur la bande côtière, en forêt humide inondée, où il vit en groupe (pinotière), le long des rivières et des criques (Annexe 4). Cette espèce mésophile¹¹ se développe bien dans des sols dont le pH varie de 4,5 à 6,5, pauvres en calcaire, comme les sols de terre ferme, mi-sablonneux, argileux et bien irrigués, et surtout dans les plaines se trouvant le long des fleuves [Carli *et al.*, 2008].

¹⁰ Frondaison : feuillage des arbres

¹¹ Mésophile : Se dit d'un organisme qui ne peut vivre que dans des milieux où les facteurs écologiques ne prennent pas de valeurs extrêmes

II.1.2 Utilisations traditionnelles

Les usages de ce palmier sont multiples. Ils sont regroupés dans le Tableau 4 [Plotkin et Balick, 1984; Favacho *et al.*, 2011].

II.1.3 Propriétés biologiques d'extrait de fruit d'*Euterpe oleracea*, et composition phytochimique associée

Depuis la parution récente des premiers travaux sur l'*Euterpe oleracea*, la Recherche portant sur l'évaluation du potentiel biologique, et associée à la composition phytochimique de chaque partie de cette baie, ne tarit pas.

Au travers de ce chapitre, nous avons tenté de mettre en lumière ces deux notions indissociables qui finalement permettent de justifier autant d'usages traditionnels de ce fruit. Une constatation importante qui ressort de ces études montre leur prédominance concernant les activités *in vitro* d'extrait de pulpe et de graine du fruit.

II.1.3.1 Activité de l'extrait non lipidique de la pulpe du fruit

Activité antioxydante *in vitro* chimique

Un rapide coup d'œil sur les bases de données bibliographiques permet de se rendre compte que la première activité de l'*Euterpe oleracea* mise en évidence est sa capacité antioxydante.

En effet, en 2005, Lichtenthäler *et al.* ont publié que la pulpe de ce fruit présente un fort pouvoir antioxydant lorsque celle-ci est mise en contact avec des radicaux libres, avec une action particulièrement efficace contre les radicaux peroxydes (RO_2^{\cdot}) et peroxy-nitrites ($ONOO^-$). Cette étude a ensuite révélé que cette capacité est liée à la présence de métabolites secondaires issus de la famille des polyphénols. La contribution de deux anthocyanidines glycosylées majoritaires qui sont la cyanidine-3-glucoside et la cyanidine-3-rutinoside (Figure 6) dans cette activité, est évaluée à 10 % [Gallori *et al.*, 2004; Lichtenthäler *et al.*, 2005].



Figure 5 : Illustration du palmier *Euterpe oleracea* et illustration en coupe de ses fruits[Béreau, 2001]

Nom scientifique	Noms vernaculaires	Propriétés culinaires	Propriétés médicinales	Propriétés artisanales
<i>EUTERPE OLERACEA</i> Mart.	<ul style="list-style-type: none"> *<i>Palmier et fruits</i> : Wassaye, Pinot (créole) *<i>Fruits</i> : Açai (portugais) *<i>Palmier</i> : Açazeiro (portugais) 	<ul style="list-style-type: none"> *<i>Fruits</i>: crus, en boisson nature, sucré ou salé ou en sorbet *<i>Bourgeon terminal</i> : cœur de palmier 	<ul style="list-style-type: none"> *<i>Sève</i> : propriétés hémostatiques *<i>Huile des fruits</i> : propriétés anti-diarrhéiques *<i>Racines</i>: propriétés anti-malariques 	<ul style="list-style-type: none"> *<i>Feuilles</i> : fibres *<i>Graines</i> : confection de bijoux

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des usages traditionnels de l'espèce de palmier *Euterpe oleracea*

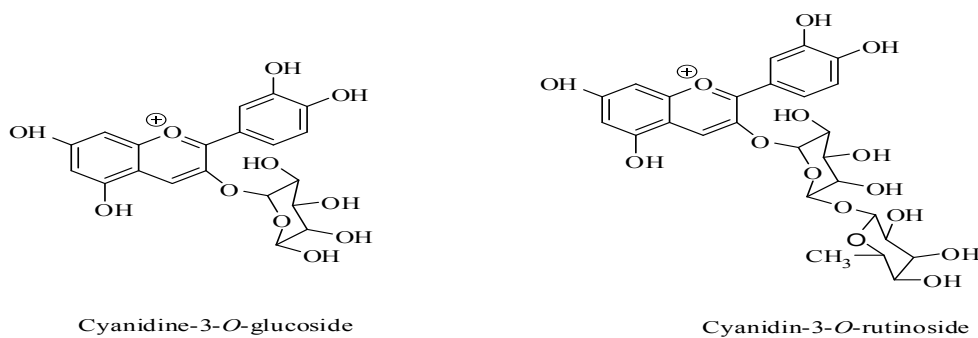


Figure 6 : Structure chimique de la cyanidine-3-*O*-glucoside et de la cyanidine-3-*O*-rutinoside

Par la suite, **Schauss *et al.* (2006)** ont confirmé ce caractère antioxydant à partir d'un extrait aqueux acétonique réalisé à partir du mésocarpe lyophilisé du fruit. Il en ressort que jamais un piégeage des radicaux $O_2^{\cdot -}$ n'avait été observé de façon si efficace pour une ressource végétale par un test antioxydant (ORAC, qui sera présenté dans un paragraphe ultérieur). Cette recherche a ensuite été affinée en contribuant à l'étude phytochimique liée au pouvoir antioxydant de la pulpe de fruit (toujours au travers du test ORAC), en identifiant et en isolant pour la première fois sept flavonoïdes. Trois d'entre eux, testés individuellement, ont présenté des valeurs remarquables, en particulier pour les formes aglycones, la vitexine, le dihydrokaempférol et la quercétine (Figure 7) [**Kang *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011**].

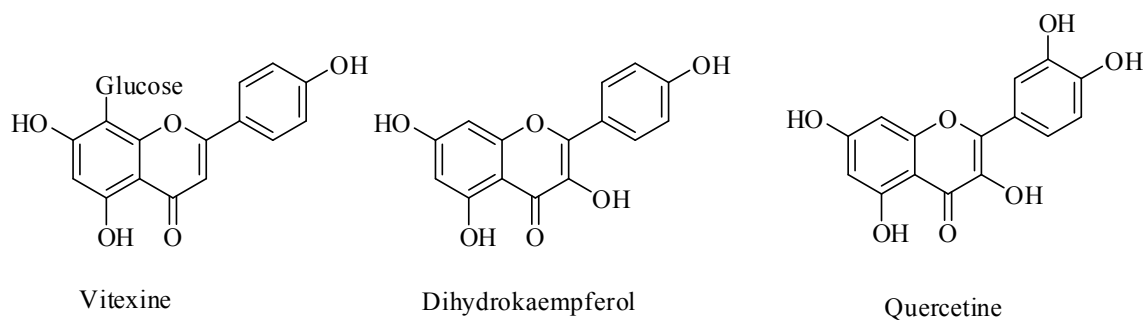


Figure 7 : Structures des flavonoïdes isolés de la pulpe d'*Euterpe oleracea* et testés en ORAC

Ces résultats sont alors plus nuancés lorsque l'extrait de pulpe est testé vis-à-vis d'un autre radical, le DPPH $^{\cdot}$. La valeur déterminée d'activité antioxydante le classe parmi les derniers, comparé à une dizaine d'autres fruits amazoniens étudiés [**Kuskoski *et al.*, 2006**].

Sur les sept composés isolés et réactifs vis-à-vis du DPPH $^{\cdot}$, quatre appartiennent aux lignanes, et deux autres sont des acides phénoliques (Figure 8) [**Chin *et al.*, 2008**].

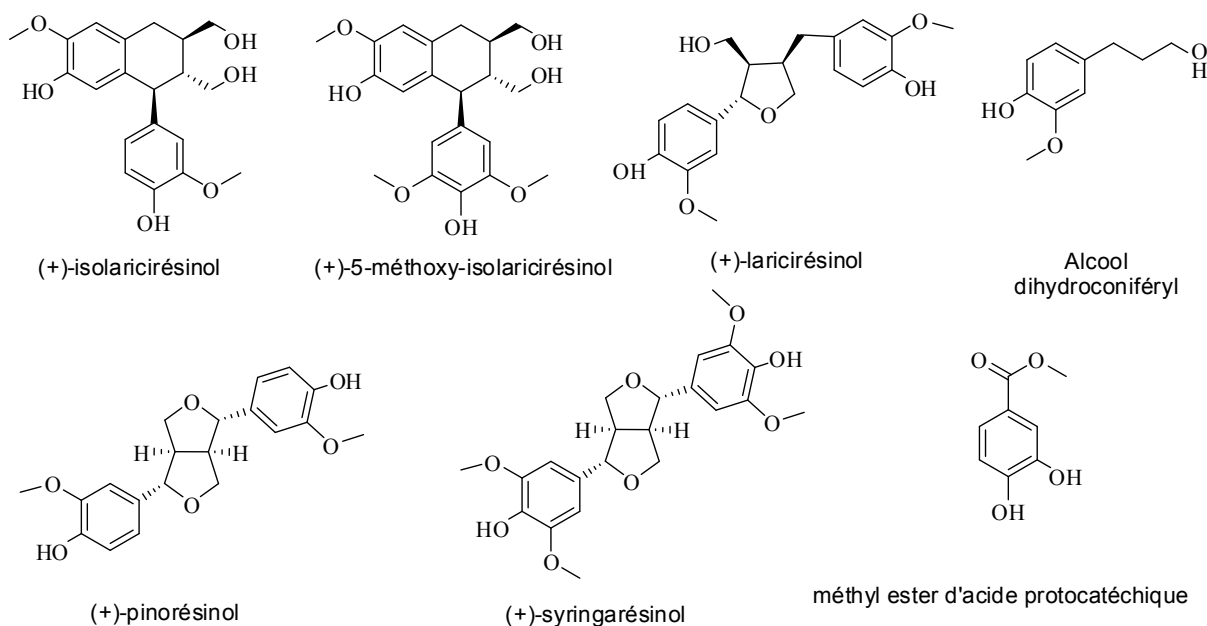


Figure 8 : Composés issus de l'*Euterpe oleracea* réactifs dans le test DPPH•

A contrario, en fonction du traitement appliqué sur la pulpe, les résultats peuvent alors être sublimes. C'est ce qui a été mis en évidence par Hogan *et al.*, sur la poudre d'açaï séchée sous hotte, avec des capacités antioxydantes obtenues avec le test ORAC plus importantes [Hogan *et al.*, 2010].

De plus, l'activité antioxydante mesurée sur le plasma a été rapportée comme étant supérieure pour un échantillon de pulpe comparée à échantillon de jus de fruit [Mertens-Talcott *et al.*, 2008].

L'étape de délipidation, a pour but d'éviter les possibles interférences dues aux composés apolaires tels que les lipides. D'autres auteurs ont récemment cherché à apprécier son impact sur le pouvoir antioxydant de la pulpe d'une espèce génétiquement modifiée. Les résultats les plus probants ont été obtenus avec le test TEAC, vis-à-vis du radical cation ABTS⁺ [Rufino *et al.*, 2011].

Enfin, le pouvoir antioxydant de trois boissons commercialisées aux USA a été comparé à la capacité antioxydante d'autres boissons plus connues, comme le jus d'orange, le thé glacé vert, noir, blanc, le jus de pomme et le jus de grenade. Les valeurs moyennes, obtenues à partir de quatre tests antioxydants, montrent que les jus de fruit à base d'*Euterpe oleracea* peuvent être classés parmi les jus de fruit les plus antioxydants [Seeram *et al.*, 2008].

Activité antioxydante in vitro biologique

L'aptitude des composés d'un extrait à pénétrer et, ainsi, à protéger les cellules sanguines vivantes ou les hématies contre leur lyse, lorsque celles-ci sont soumises à un stress, peut aujourd'hui être mesurée par le biais de nombreux tests biologiques, parmi lesquels le test biologique appelé CAP-e. Dans le cas d'un extrait de pulpe d'*Euterpe oleracea*, seuls les trois flavonoïdes répondant favorablement au test ORAC, précédemment cités, ont également démontré un rôle significatif en présence d'érythrocytes : la lutéoline, la quercétine et la dihydrokaempférol [Kang *et al.*, 2010].

Jensen *et al* (2008) ont relaté qu'un mélange de jus de fruit, constitué majoritairement d'*Euterpe oleracea* pouvait pénétrer et protéger les cellules sanguines contre le stress oxydatif suivant le protocole du test CAP-e. Cet état de stress pouvait être alors enrayé à 50% avec une dose de 0,016 g/l et 100% avec une concentration de 10g/l [Jensen *et al.*, 2008].

Activité antioxydante in vivo

Dans la même étude pilote, **Jensen *et al* (2008)** ont cherché à mesurer l'activité antioxydante *in vivo*, sur 12 volontaires ayant consommé la dose de jus journalière recommandée, en prélevant leur sang au bout d'1h puis de 2h. L'impact sur la peroxydation lipidique, mesurée par le test TBARS de mesure des malondialdéhydes (MDA) plasmatiques, n'a été observé de façon significative qu'à la deuxième heure. Une amélioration du sérum a été également remarquée avec le test CAP-e, comparé au sérum des volontaires ayant consommés des placébos.

Autres activités biologiques

➤ Propriété anti-tumorale

A concentration équimolaire équivalente, des fractions méthanoliques acidifiées issues de la pulpe d'*Euterpe oleracea* Mart., riches en composés anthocyaniques, ont démontré des effets significatifs antiprolifératifs et pro-apoptotiques¹², *in vitro*, sur les cellules cancéreuses LH-60¹³ par rapport aux fractions élaborées à partir d'acétate d'éthyle [Del Pozo-Insfran *et al.*, 2006].

¹² Apoptose : mort cellulaire programmée en réponse à un signal

¹³ Cellules LH-60 : cellules leucémiques promyélocytiques

Sur la poudre séchée et délipidée de la pulpe, des tests antiprolifératifs ont été engagés sur des gliomes¹⁴ cérébraux C-6 chez le rat, et ont confirmé le potentiel anti-tumoral *in vitro* de ce fruit [Hogan *et al.*, 2010].

➤ *Effet anti-inflammatoire*

Contrairement aux cyclo-oxygénases¹⁵ 2 (COX-2), une potentielle inhibition des cyclo-oxygénases 1 (COX-1) a été observée sur un échantillon recueilli, congelé et lyophilisé issu des fruits) [Schauss *et al.*, 2006].

En réduisant considérablement l'expression des enzymes de type synthase de monoxyde d'azote inductible, des fractions élaborées à partir des fruits ont permis d'inhiber la production *in vitro* de radicaux azotés, connus pour leur effet vasodilatateur et leur grande cytotoxicité [Matheus *et al.*, 2006].

Jensen *et al* (2008) ont, ensuite, observé une réduction des espèces oxygénées réactives au niveau des cellules polymorphonucléaires en présence du mélange de jus de fruit précédemment cité, synonyme de propriétés anti-inflammatoires.

Il n'est pas rare que certains composés révélant des propriétés antioxydantes intéressantes, prennent grandement part à d'autres activités biologiques telle que l'activité anti-inflammatoire ; action traduite par l'inhibition de la formation d'espèces oxygénées réactives issues des cellules humaines polymorphonucléaires. C'est le cas de la quercétine et de la dihydrokaempférol [Kang *et al.*, 2010].

L'effet protecteur *in vivo* de la pulpe, administrée à des jeunes souris, contre les dommages de l'ADN causés par la doxorubicine¹⁶ a été observé sur les cellules hépatiques et rénales [Ribeiro *et al.*, 2010].

➤ *Effet cytoprotecteur*

Cinq composés isolés de la pulpe, dont l'alcool dihydroconiféryl, le (+)- laricirésinol, le (+)- pinorésinolle (+)- syringarésinolet le méthyl ester d'acide protocatéchine (Figure 8), ont

¹⁴ Gliome : variété de tumeur issue du système nerveux

¹⁵ Cyclo-oxygénase : enzyme permettant la formation de prostaglandines, responsables de l'inflammation

¹⁶ Doxorubicine : principe actif utilisé en chimiothérapie

démonstré des effets cytoprotecteurs sur des cellules MCF-7 stressées par du peroxyde d'hydrogène [Chin *et al.*, 2008].

II.1.3.2 Activité de l'extrait lipidique issu de la pulpe du fruit

Activité antioxydante in vitro chimique

L'activité antioxydante de l'huile extraite de la pulpe du fruit a été mesurée par le test ORAC en jouant sur les conditions de températures de stockage de l'extrait lipidique. Il en ressort que la plus forte activité antioxydante de cette huile est obtenue pour des températures de stockage comprises entre 20 et 40°C. Cette activité est aussi corrélée à la quantité de composés phénoliques présents. Cette étude révèle que ces composés appartiennent majoritairement aux acides phénoliques (Figure 9), avec également une influence significative des procyanidines [Pacheco-Palencia *et al.*, 2008].

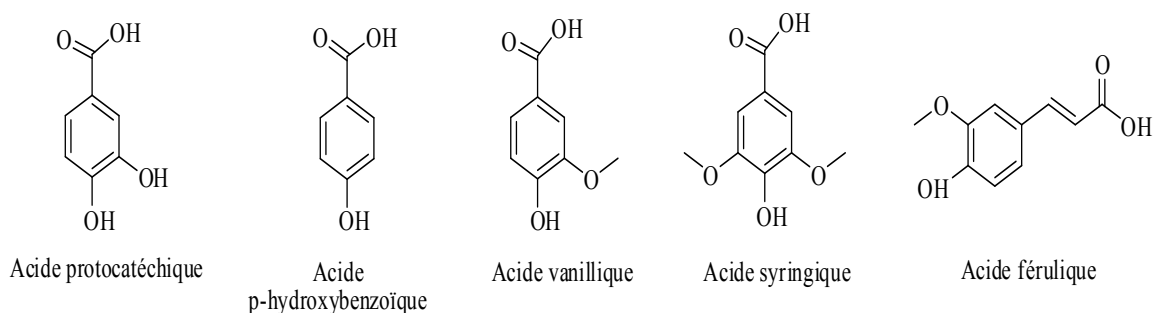


Figure 9 : Acides phénoliques présents dans l'huile de pulpe de l'*Euterpe oleracea*

Récemment, la capacité antioxydante de l'huile d'*Euterpe oleracea* a été comparée à celle de l'huile d'olive. Les valeurs d'activité antioxydante sur le radical DPPH se sont avérées plus importantes pour le palmier, même si la cinétique de réaction dans le cas de l'huile du fruit amazonien requiert un temps environ cinq fois plus long [Rufino *et al.*, 2011].

Autres activités biologiques

➤ Effet antiprolifératif

Des tests pharmacologiques ont été menés sur l'huile issue de la pulpe afin d'en déterminer les effets antiprolifératifs sur des cellules cancéreuses de type HT-29. Les résultats ont mis en évidence le fait que la composition phénolique de l'huile— notamment par une présence plus

importante d'acides phénoliques– permettait une meilleure inhibition de la croissance des cellules HT-29 que l'activité de la pulpe seule [Pacheco-Palencia *et al.*, 2008].

➤ *Effet anti-inflammatoire et anti-tumoral*

Des composés bioactifs d'importance, autres que les polyphénols, ont été évalués dans l'*Euterpe oleracea*, notamment pour leur action médicale contre les risques de maladies cardiovasculaires, et leur rôle contre certains cancers, tels que les tocots¹⁷[Schwartz *et al.*, 2008; Darnet *et al.*, 2011]. Il s'avère que l'huile de pulpe renferme une quantité non négligeable de phytostérols totaux parmi lesquels les β - sitostérol et sitostanol (majoritaires) et l' α - tocophérol, le seul tocol détecté (Figure 10) [Costa *et al.*, 2010].

De plus, avec plus de 60%, l'acide oléique est l'acide gras essentiel le plus abondant dans cette huile, en lui conférant des propriétés anti-inflammatoires, suivi de l'acide palmitique (22%), de l'acide linoléique (12%), de l'acide palmitoléique (6%), de l'acide stéarique (2%), de l'acide arachidonique (2,5%) et (Figure 11) [Favacho *et al.*, 2011].

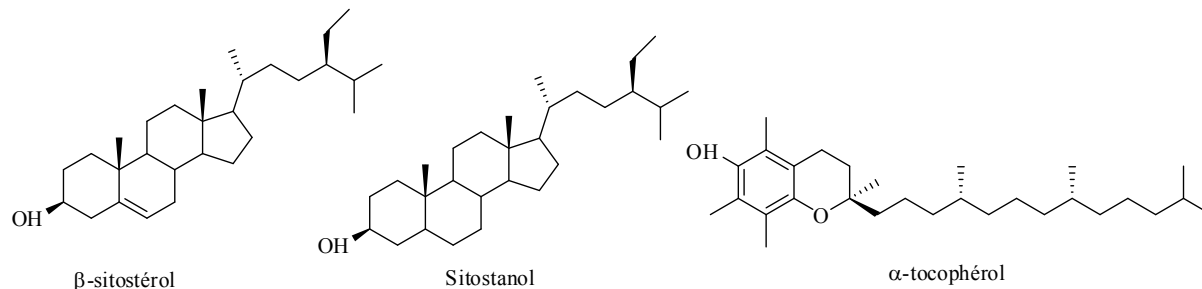


Figure 10 : Phytostérols et tocots majoritaires présents dans l'*Euterpe oleracea*

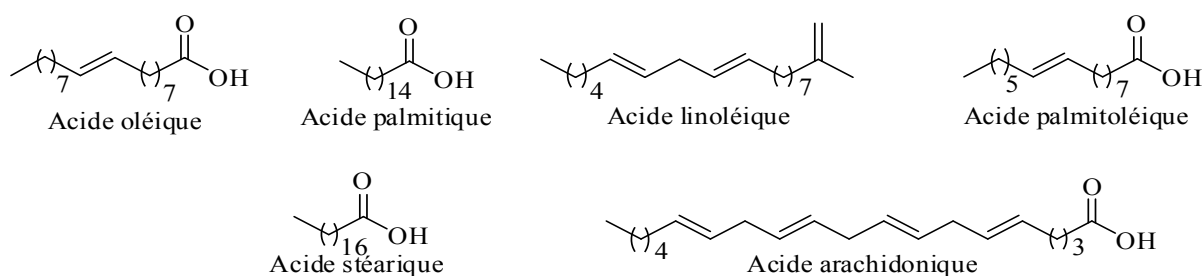


Figure 11: Principaux acides gras présents dans l'huile d'*Euterpe oleracea*

¹⁷Tocol : constitue la structure de base des tocophérols

II.1.3.3 *Activité d'extrait organiques des graines du fruit*

Activité antioxydante chimique in vitro

Des extraits alcooliques de graines de fruit ont montré la même aptitude à piéger les radicaux peroxydes que les mêmes extraits de la pulpe, mais se sont avérés plus efficaces vis-à-vis des radicaux peroxy-nitrite et hydroxydes. Les dimères, trimères, tétramères et pentamères procyanidines étant majoritairement responsables de cette activité antioxydante [Rodrigues *et al.*, 2006].

Autres activités biologiques

➤ *Effet vasodilatateur*

Des effets soutenus et durables de vasodilatation ont été ressentis avec un extrait hydro-alcoolique de graine d'*Euterpe oleracea* sur des ganglions mésentériques supérieurs prélevés chez le rat, préalablement contractés avec une quantité fixe de norépinephrine, utilisée comme contrôle [Rocha *et al.*, 2007].

II.2 Présentation de l'espèce étudiée : l'*Oenocarps bataua* Mart.

II.2.1 Description botanique

Initialement connu sous le nom de *Jessenia Bataua* Mart, l'*Oenocarpus bataua* Mart., de la famille des Arécacées, est un palmier solitaire, droit, inerme de 4 à 26 m de hauteur, au stipe de 15 à 45 cm de diamètre, avec quelque fois des racines adventives aériennes (Figure 12). Les différences significatives entre ces deux appellations résident principalement sur l'aspect des graines, le nombre des fleurs et l'orientation de l'extrémité du stipe [Henderson, 1995b].

Les feuilles (de neuf à vingt) de couleur vert sombre, sont pennées et disposées en couronne et ses folioles sont larges et blanchâtres en dessous.

Les fleurs sont à ramification simple, en groupe de trois (deux fleurs mâles latérales, et une fleur femelle centrale), entourées de 2 spathes¹⁸ [Béreau, 2001].

Le fruit est une drupe ovoïde arrondie de 2,5 à 4,5 cm de long et de 2,2 à 2,5 cm de diamètre, portant les restes du stigmate de couleur noir violacé (Figure 12).

La pulpe, plus ou moins fibreuse, mince, entoure un noyau oblong de 2,5 à 3 cm, aigu aux extrémités et garni de fibres.

Cette espèce trouve refuge dans des zones inondées, le long des cours d'eau en basse forêt, mais peut être aussi localisée occasionnellement sur la terre ferme voire sur des crêtes abruptes à 1400 m d'altitude (Annexe 5) [Henderson, 1995b].

II.2.2 Utilisations traditionnelles

Avec une domestication tout aussi importante, l'espèce *Oenocarpus bataua* fait l'objet de nombreuses utilisations traditionnelles (Tableau 5) [Balick et Gershoff, 1981; Plotkin et Balick, 1984; Macia *et al.*, 2011].

¹⁸ Spathe : grande bractée membraneuse ou foliacée enveloppant plus ou moins une inflorescence, et ouverte latéralement par une fente



Figure 12 : Illustration du palmier *Oenocarpus bataua* et illustration en coupe de ses fruits [Béreau, 2001]

Nom scientifique	Noms vernaculaires	Propriétés culinaires	Propriétés médicinales	Propriétés artisanales
<i>OENOCARPUS (JESSENIA) BATAUA</i> Mart.	<p>*<i>Palmier et fruits</i> : Patawa (créole)</p> <p>*<i>Palmier et fruits</i> : Pataua (portugais)</p>	<p>*<i>Fruits</i> : crus, en boisson nature, sucré ou salé ou en sorbet</p> <p>*<i>Bourgeon terminal</i> : cœur de palmier</p> <p>*<i>Huile des fruits</i> : en salade</p>	<p>*<i>Huile des fruits</i> : propriétés anti-tuberculoniques, anti-inflammatoires, traitement des toux chroniques et bronchites, lotion capillaire</p> <p>*<i>Racines</i> : propriétés anti-diarrhéiques, contre les douleurs gastriques et les maux de tête</p>	<p>*<i>Feuilles</i> : fibres, toits des chaumes</p> <p>*<i>Stipe</i> : construction de bâtisses</p>

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des usages traditionnels de l'espèce de palmier *Oenocarpus bataua*

II.2.3 Propriétés biologiques d'extrait de fruit d'*Oenocarpusbataua* et composition phytochimique associée

A ce jour, le genre *Oenocarpus* a été très peu étudié. De la bibliographie, il en ressort que seuls des travaux concernant l'activité antioxydante et la composition phytochimique de l'huile issue de la pulpe des fruits ont été évalués.

II.2.3.1 Activité de l'extrait lipidique issu de la pulpe de fruit

Activité antioxydante in vitro chimique

L'activité antioxydante d'huiles fabriquées de façon artisanale et provenant de diverses communautés du Venezuela, a été mesurée à l'aide du test DPPH. Hernandez *et al* relatent qu'aucune huile testée n'a atteint la capacité réductrice de l'huile d'olive dont le pouvoir antioxydant réside principalement dans sa forte composition en phénols et tocophérols [Hernandez *et al.*, 2009]. En effet, elle contient majoritairement de l' α -tocophérol, des β et γ -tocophérols et du δ -tocophérol (Figure 13). Trois phytostérols ont également été détectés en grande quantité : le β -sitostérol, le Δ^5 -avénostérol et le stigmastérol (Figure 14) [Hernandez *et al.*, 2009; Da Cruz Rodrigues *et al.*, 2010].

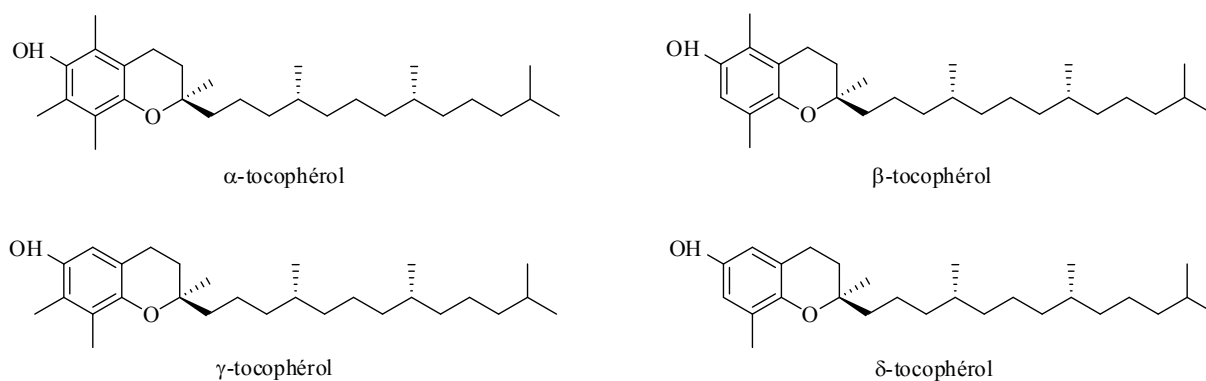


Figure 13 : Tocophérols détectés dans l'huile de pulpe d'*Oenocarpus bataua*

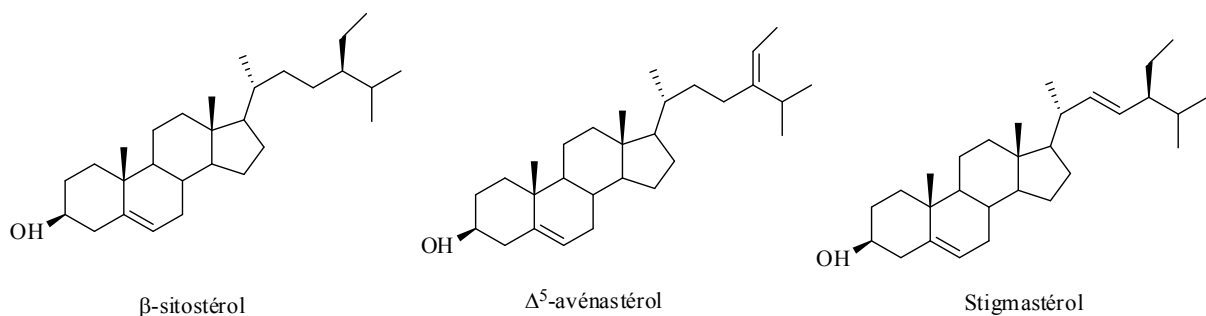


Figure 14 : Phytostérols détectés dans l'huile de pulpe d'*Oenocarpus bataua*

Autres activités biologiques

➤ *Activité anti-inflammatoire*

En inhibant l'activation cellulaire endothéliale et réduisant l'expression des molécules de nature inflammatoires, la grande proportion d'acide oléique (75 à 80%) présent confère à cette huile de pulpe des qualités anti-inflammatoires [Hernandez *et al.*, 2009; Favacho *et al.*, 2011].

III Radicaux libres et stress oxydatif

La recherche sur la capacité antioxydante représente un enjeu scientifique important ; notion largement relatée dans l'étude des propriétés biologiques de l'açaï. Au travers du chapitre suivant, nous allons présenter les molécules responsables de l'oxydation et celles qui permettent de la combattre.

III.1 Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. La molécule d'oxygène (ou dioxygène, O₂) présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre (Figure 15), en raison de ses deux électrons célibataires situés sur les deux orbitales de plus grande énergie.



Figure 15 : Schématisation de la molécule biradical libre de dioxygène

Ne possédant qu'un seul électron sur ses orbitales, l'oxyde d'azote (NO) est un radical peu réactif, synthétisé à partir d'un atome d'azote et d'une molécule d'oxygène.

Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (EOR ou ROS) ou de l'azote (EAR ou RNS) (Figure 16).

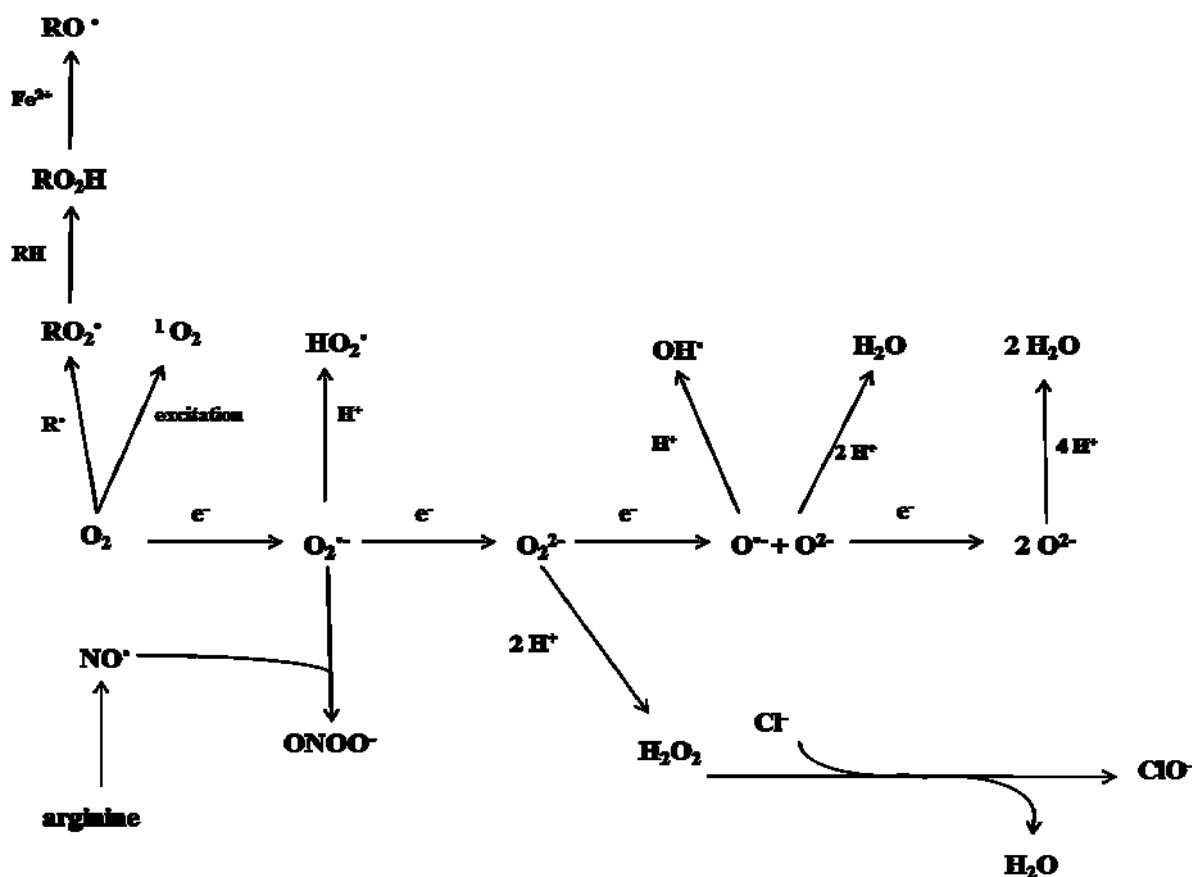


Figure 16 : Réactions de base intervenant lors de la synthèse et de la dégradation des EOR et des EAR adapté de [Smirnov, 2005]

III.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

On distingue alors deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant: les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires. La réactivité d'un radical libre varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent. Leurs constantes de vitesse réactionnelle sont très élevées (10^5 à $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) [Delattre *et al.*, 2005a].

Les espèces oxygénées réactives radicalaires

L'anion radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c (Fe^{3+}), l'ascorbate et surtout le superoxyde dismutase.

Plus réactif que le précédent, le radical perhydroxyle HO_2^{\bullet} est obtenu après protonation de ce dernier à pH inférieur à 4,8 ($pK_a (HO_2^{\bullet} / O_2^{\bullet -}) = 4,8$).

La réduction monoélectronique du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 donne naissance au **radical hydroxyle HO^\bullet** et à l'anion basique non radicalaire OH^- en présence d'un catalyseur (réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^\bullet + Fe^{3+} + OH^-$). Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique [Hennebelle, 2006].

Le **radical peroxy RO_2^\bullet** est un radical secondaire issu de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le radical R^\bullet . Sa réactivité se situe entre l'anion radical superoxyde et le radical hydroxyle.

Le **radical secondaire alkoxy RO^\bullet** est produit suite à la décomposition de l'hydroperoxyde RO_2H , issu de l'oxydation de substrat RH , par des cations métalliques.

Les espèces oxygénées non radicalaires

L'**oxygène singulet 1O_2** , qui est la forme diamagnétique¹⁹ de l'oxygène, est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge [Choe et Min, 2005; Hennebelle, 2006].

Sous sa forme moléculaire, le **peroxyde d'hydrogène H_2O_2** est également toxique, en particulier à cause de sa transformation en radical hydroxyle en présence de cations métalliques Fe^{2+} et Cu^+ , lors de réactions de type « Fenton » [Wardman et Candeias, 1996].

La myéloperoxydase²⁰ convertit le peroxyde d'hydrogène en **acide hypochlorique (HOCl)** à des concentrations physiologiques. Ce dernier peut réagir avec les fonctions aminées des protéines pour former des chloramines [Sumaya Martinez, 2004].

III.1.2 Les espèces réactives azotées (ERN)

Espèces radicalaires azotées

¹⁹ Diamagnétique : se dit des corps qui, soumis à un champ magnétique, prennent une aimantation proportionnelle au champ, mais plus faible et dirigée en sens inverse

²⁰ Myéloperoxydase : enzyme hémique présentant une activité de chloration

Apparu au cours de la dernière décennie, le **monoxyde d'azote (NO[•])** a pris une place considérable en biologie. Malgré son rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation et ses effets anti-inflammatoires, il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives.

Espèces non radicalaires azotées

Caractérisé par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en **dioxyde d'azote (NO₂)** ($2 \cdot\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2$), lequel peut donner du **trioxyde d'azote (N₂O₃)** ($\cdot\text{NO} + \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$) pour enfin aboutir à un **ion nitrate stable (NO₂⁻)** ($\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+$). De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le **peroxynitrite (ONOO⁻)** ($\cdot\text{NO} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{ONOO}^-$), moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques).

III.2 La production de radicaux libres

III.2.1 La production intracellulaire

La production des EOR dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles (Figure 17) mais est essentiellement d'origine enzymatique.

Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire.

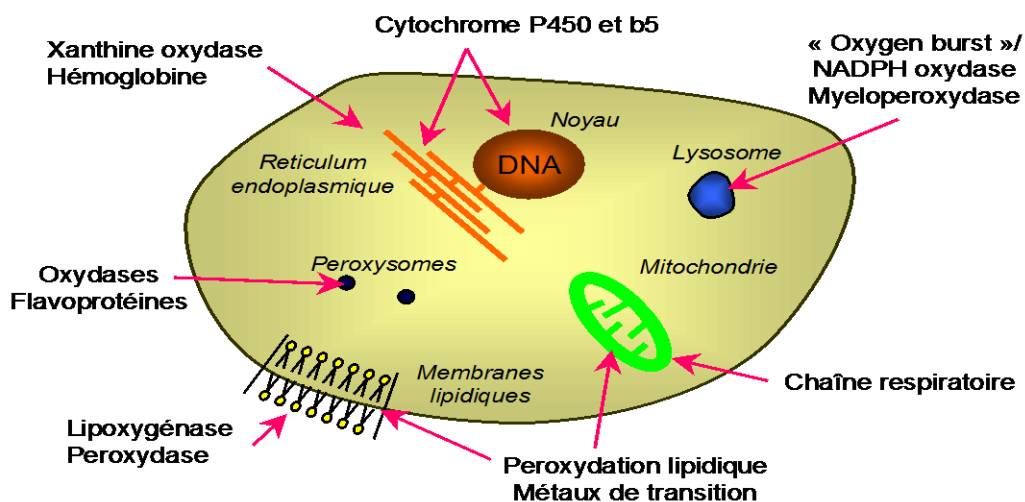


Figure 17 : Sites de production intracellulaire des ERO (adapté de LJ Machlinet al., 1987)

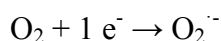
La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène selon :



Les cytochromes P₄₅₀, accepteurs terminaux d'électrons du complexe (IV) de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale, catalysent la réaction :



Cette chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons, environ 2 %, qui vont réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation du radical superoxyde :



Compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, cette fuite d'électrons semble devancer les activités de la NAD(P)H. De plus, dans les mitochondries, l'oxydation de coenzymes, telles que les flavoprotéines réduites, s'accompagne d'une perte de protons et d'électrons qui, par l'intermédiaire de la chaîne de transport, sont ensuite transférés à l'O₂. La chaîne de transport des électrons est composée de nombreuses espèces moléculaires et ioniques (les flavoprotéines, plusieurs cythochromes etc...) [Delattre *et al.*, 2005d].

D'autres sources peuvent également jouer un rôle dans la production de radicaux comme la xanthine oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en ion superoxyde, les peroxysomes qui

possèdent plusieurs enzymes sources de peroxyde d'hydrogène et les lipo-oxygénases, enzymes de la voie de l'acide arachidonique qui permettent notamment la synthèse des prostaglandines, oxydent les acides gras pour donner des hydroperoxydes d'acide gras insaturés [Delattre *et al.*, 2005d].

Par ailleurs, au cours de la défense antibactérienne, les cellules phagocytaires activées par une réaction inflammatoire vont produire un grand nombre d'ERO. De plus, il y a production massive d'anion superoxyde par le mécanisme leucocytaire. C'est la flambée respiratoire. Les NO synthases, à l'origine du radical NO[•] peuvent, sous certaines conditions, produire également des anions superoxydes [Delattre *et al.*, 2005b; Valko *et al.*, 2006].

III.2.2 La production extracellulaire

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

Ces facteurs environnementaux incluant des agents cancérogènes non-génotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes...). Les rayonnements UV induisent la synthèse de O₂^{•-}, OH[•], ¹O₂ et d'H₂O₂ l'intermédiaire d'agents photosensibilisants [Sumaya Martinez, 2004].

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) présents dans notre mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels...), ainsi qu'une alimentation « chimiquée » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres [Mena *et al.*, 2009].

III.3 Mécanismes d'action des espèces réactives oxygénées et le stress oxydant ou oxydatif

Les EOR et ERN sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants [Valko *et al.*, 2004] :

- Bénéfiques, lorsqu'ils sont impliqués dans des rôles physiologiques au niveau des réponses cellulaires telles que la lutte contre des agents infectieux et leur fonction dans les systèmes de signalisation cellulaire,
- Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO et ERN et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives) : **c'est le stress oxydatif** [Evans et Halliwell, 1999].

Quelles que soient leurs fonctions, ces molécules jouent donc un rôle indispensable chez tous les êtres vivants. Les notions les plus essentielles vont être développées ci-après.

III.3.1 Rôle des radicaux libres chez l'homme

De nombreux ligands extracellulaires sont capables d'induire la production cellulaire d'ERO, après interaction avec leur récepteur spécifique. Ces ERO contribuent donc à la transduction²¹ du signal, mais assurent également l'amplification de ce signal. Par exemple, cela va se traduire par l'activation de la NAD(P)H oxydase qui formera l'anion superoxyde, et contribuera à l'activation de phosphorylases, dont les cibles sont des protéines.

En résumé, les mécanismes d'action principaux des ERO sont alors de déclencher ou d'amplifier un signal intracellulaire par deux mécanismes principaux (par modification de l'équilibre rédox intracellulaire et par modification oxydative des protéines). Les ERO sont également à l'origine de l'action bactéricide par les leucocytes [Delattre *et al.*, 2005c].

²¹ Transduction : action d'une cellule qui convertit un signal en un autre

III.3.2 Rôle des radicaux libres chez les plantes

Les ERO sont continuellement produites chez les plantes selon le métabolisme aérobie. En fonction de leur nature, certaines, très toxiques, sont rapidement détoxifiées par divers mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques (Figure 18).

Alors que les végétaux génèrent pléthore de processus pour combattre la croissance des ERO produites dans les conditions de stress abiotique (chocs thermiques, irradiation excessive, couche d'ozone, sécheresse, salinité...), dans d'autres circonstances, ils peuvent tout aussi engendrer délibérément des ERO au titre de molécules signal afin de contrôler de nombreux phénomènes comme la défense contre des pathogènes (stress biotique), la mort cellulaire programmée (apoptose) et le comportement stomatique²² [Apel et Hirt, 2004; Smirnov, 2005].

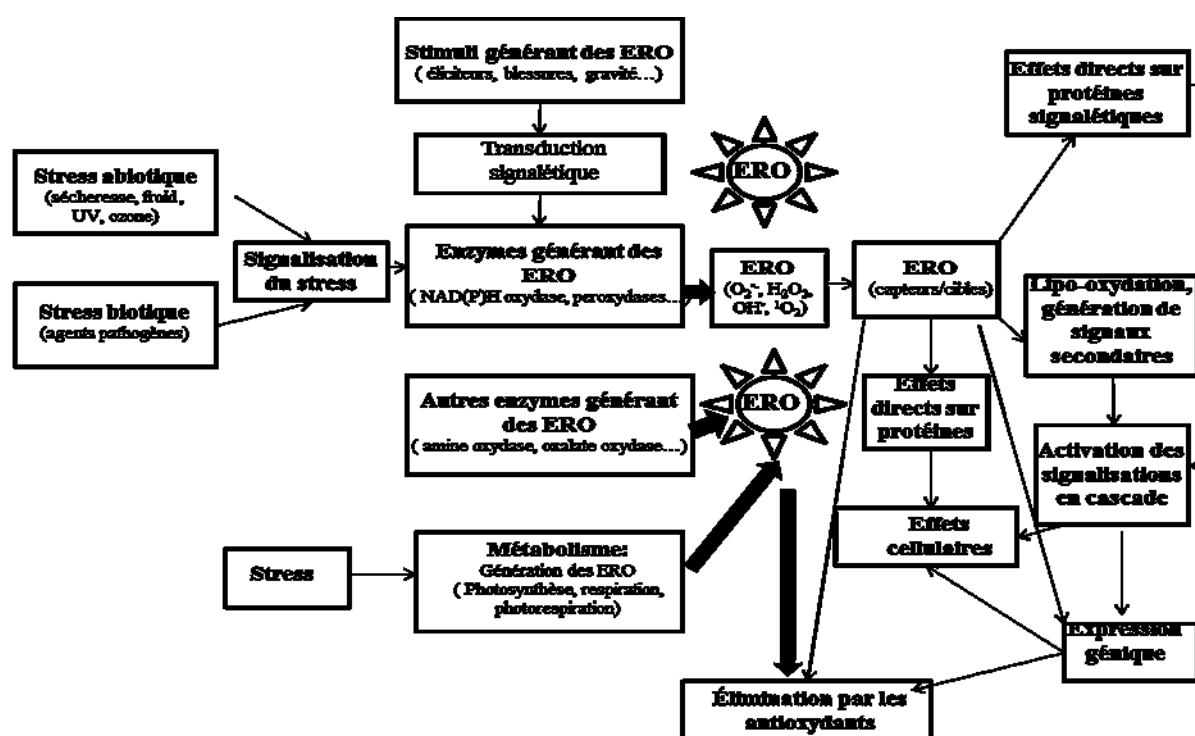


Figure 18 : Rôle central des ERO dans la signalisation [Smirnov, 2005]

²² Stomate : structure anatomique permettant les sorties d'eau sous forme de vapeur

IV Le pouvoir antioxydant

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'organisme est capable, dans une certaine mesure, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques et chimiques développés au cours de l'Évolution [Hennebelle, 2006].

IV.1 Protections cellulaires

Les molécules ou microconstituants capables d'interférer avec les radicaux libres sont appelés **antioxydants**. Un bon antioxydant se devra de respecter quelques critères [Valko *et al.*, 2006] :

- Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres
- Chélaterdes ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{+}) d'importance biologique capables de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton
- Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer
- Avoir un effet positif sur l'expression génique
- Être rapidement absorbé
- Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques
- Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire

IV.1.1 Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Figure 19) les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase [Mates *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2012].

Le rôle majeur du **superoxyde dismutase** ou **SOD** est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire.

La **catalase**, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

L'activité du **glutathion peroxydase**, ou GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur [Delattre *et al.*, 2005d].

D'autres enzymes jouent un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante, l'ensemble formant un système complexe : glutathion réductase, thioredoxine reductase, glutathion transferase...

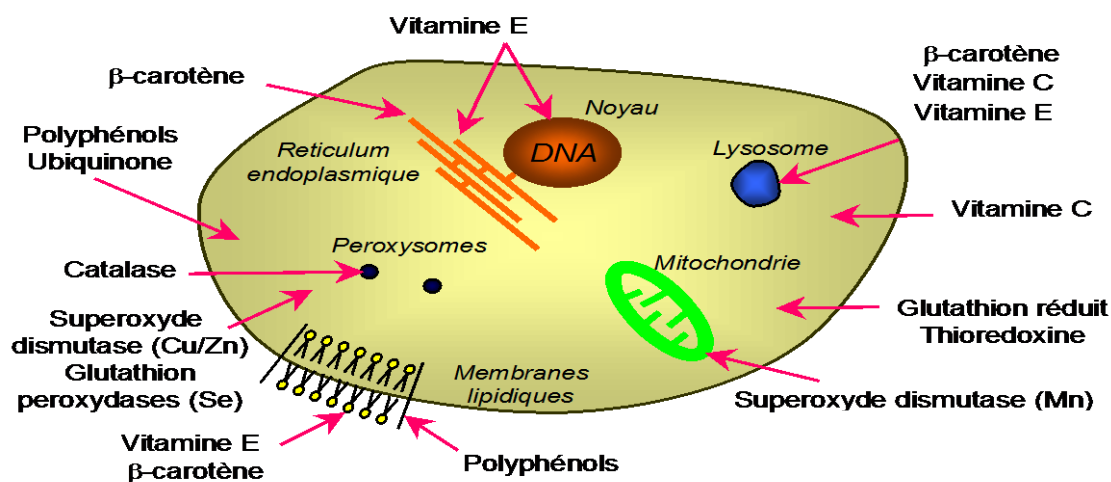


Figure 19: Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires (adapté de LJ Machlin *et al.*, 1987)

IV.1.2 Systèmes antioxydants non-enzymatiques

Systèmes antioxydants endogènes

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le **glutathion**, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux HO^\bullet , RO_2^\bullet , RO^\bullet , $^1\text{O}_2$, ONOO^- , des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl .

Le glutathion est aussi capable de participer à l'activité enzymatique qui, elle, détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes [McCall et Frei, 1999; Masella *et al.*, 2005; Delattre *et al.*, 2005d].

Les deux formes, oxydée et réduite, de l'**acide lipoïque** (non présentée sur le schéma), autre composé appartenant aux thiols, présentent des propriétés antioxydantes *in vitro* en piégeant les HO^\bullet , RO_2^\bullet , l' HOCl et l' $^1\text{O}_2$. En se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de

les désactiver d'un point de vue catalytique, et a la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes [Packer *et al.*, 2001; Panfili *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004].

L'acide urique, présent sous forme urate à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes *in vitro* contre les HO[•] et RO₂[•], tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine [Delattre *et al.*, 2005d].

Systemes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes (Figure 19), eux, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques [McCall et Frei, 1999].

La **vitamine C** ou **acide ascorbique** est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire [Retsky *et al.*, 1999]. Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH⁻) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AscH[•]), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée (Asc^{•-}) (Figure 20) [Valko *et al.*, 2006].

Paradoxalement, les études *in vivo* de la supplémentation en vitamine C montrent, pour la plupart, une réduction de l'oxydation de l'ADN, des protéines et de la lipoperoxydation, alors que certains auteurs relatent l'effet pro-oxydant *in vitro* de cette molécule dans des milieux tamponnés contenant du fer en accélérant la réaction de Fenton [Kang *et al.*, 1998; Seon Hwa *et al.*, 2001; Valko *et al.*, 2006].

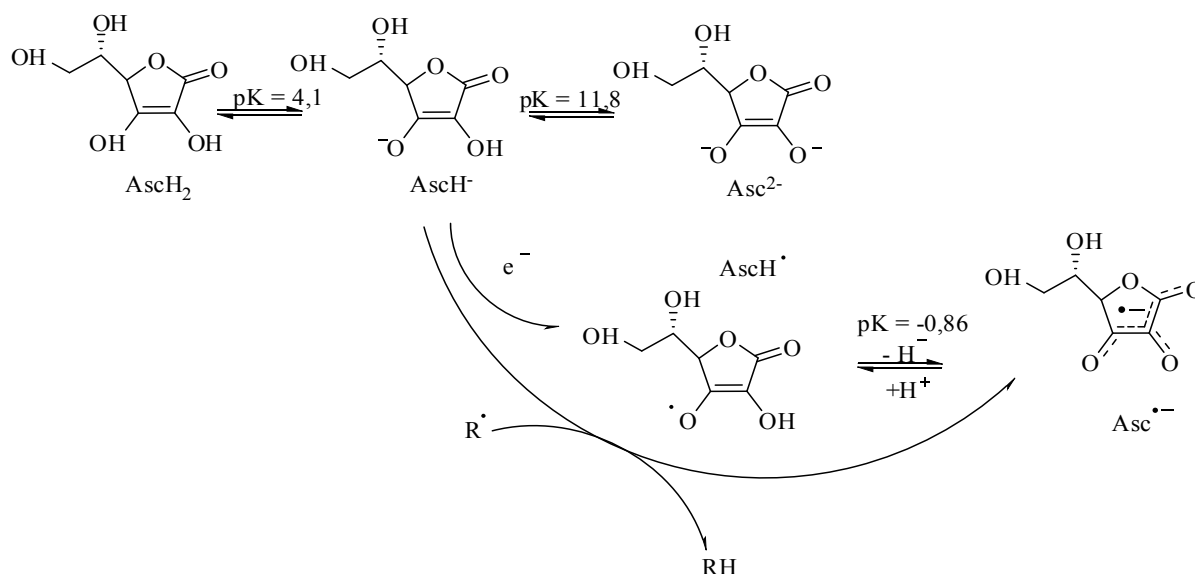


Figure 20 : Différentes structures chimiques de la vitamine C et réaction avec les radicaux

La **vitamine E** est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (ensemble de 8 molécules dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols, (Figure 21)). Ce sont de bons antioxydants alimentaires, mais surtout leur rôle physiologique chez l'Homme, comme protecteurs des structures membranaires et des lipoprotéines ou pour lutter contre le stress oxydant, est très important. Elle prévient l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO[•] (Figure 22) [Kaiser *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1993].

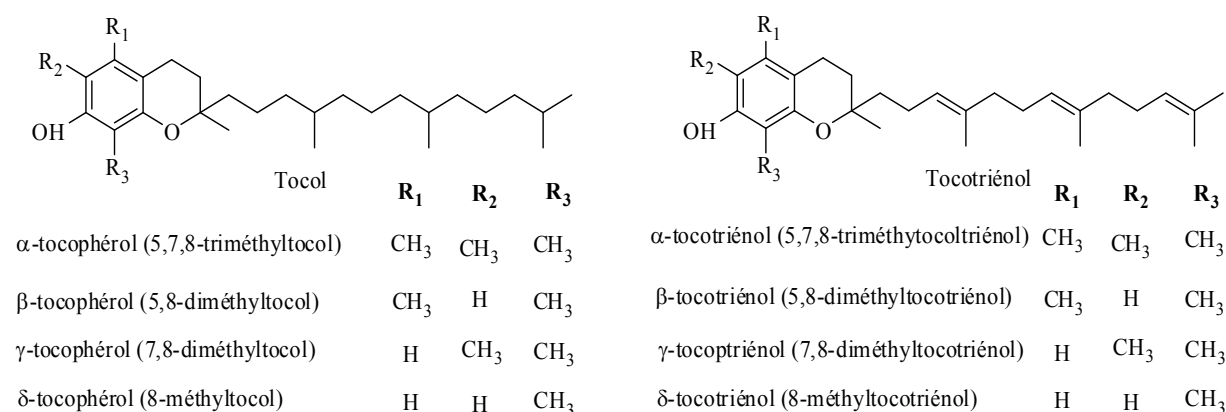


Figure 21: Structures chimiques des tocophérols et des tocotriénols

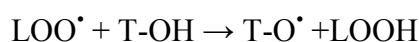


Figure 22 : Mécanismes d'action antioxydante de la vitamine E sur les radicaux LOO[•]

De plus, il faut noter que la vitamine C associée à la vitamine E régénère la forme réduite de l' α -tocophérol par une réaction de transfert d'hydrogène [Dreher et Junod, 1996].

Les **caroténoïdes (Car)** sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles (Figure 23). On en dénombre environ 600 présents dans la nature. L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux $\text{ROO}\cdot$, $\text{HO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{R}\cdot$ par simple addition électrophile et transfert d'électron (Figure 24). Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singlet [Valko *et al.*, 2006].

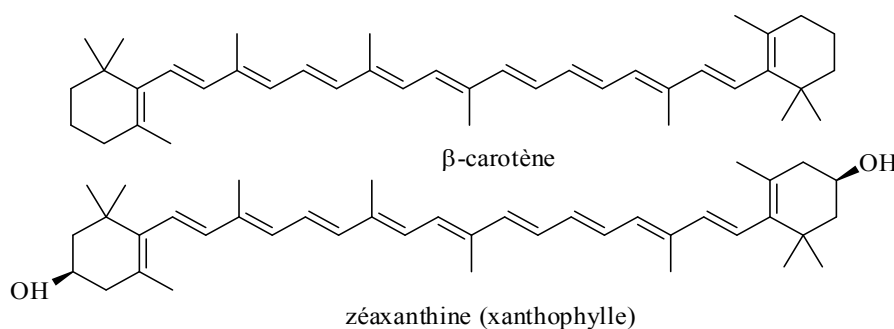


Figure 23 : Exemples de carotène et xanthophylle

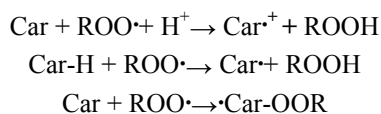


Figure 24 : Mécanismes traduisant l'activité antioxydante des caroténoïdes, cas des $\text{ROO}\cdot$

Les **composés phénoliques (Ph)**, et en particulier les **flavonoïdes**, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane (Figure 25). Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Figure 26) [Schroeter *et al.*, 2002; Leopoldini *et al.*, 2011].

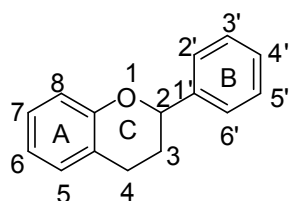
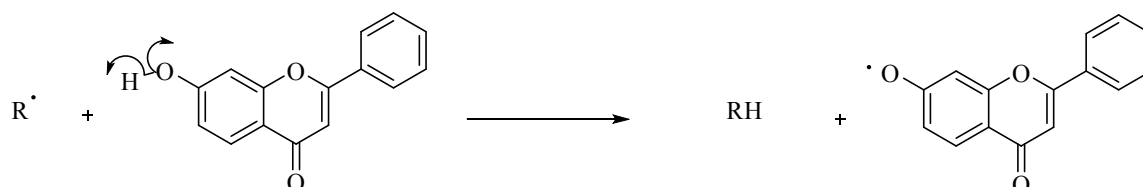


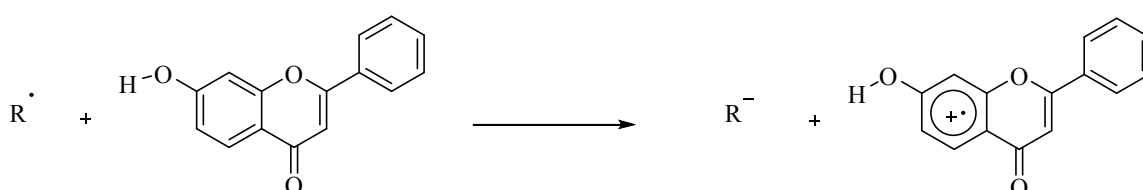
Figure 25 : Structure chimique de la 2- phénylbenzopyrane

De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, en particulier du nombre de groupements hydroxyles [Schroeter *et al.*, 2002].

Transfert de proton (HAT)



Transfert d'électron (SET)



Chélation des ions métaux de transition

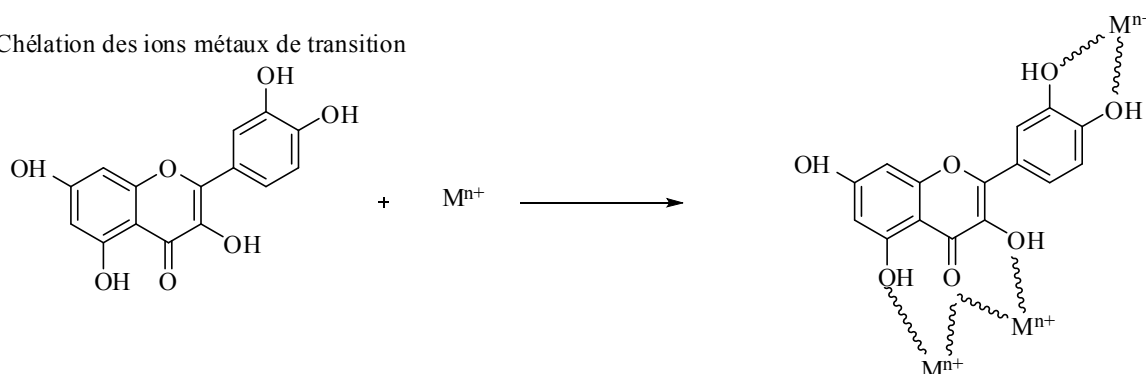


Figure 26 : Mécanismes d'action antioxydante des composés phénoliques [Leopoldini *et al.*, 2011]

IV.2 Méthodes de dosage de l'activité antioxydante et antiradicalaire

Diverses méthodes de dosage de l'activité antioxydante *in vitro* induisent la mesure de l'inhibition de l'oxydation des lipides et des lipoprotéines. Celles-ci ne seront pas abordées, ni celles mesurant le pouvoir antioxydant *in vivo* sur le modèle animal ou chez l'Homme. Cette étude se focalisera sur les méthodes témoignant de l'aptitude d'une molécule ou d'un extrait naturel à piéger des radicaux libres – par transfert d'électron et/ou de proton -issus de phénomènes d'oxydations [Prior *et al.*, 2005]. On parlera alors d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante.

Seules les méthodes les plus utilisées, en particulier pour les tests *in vitro* chimiques, seront représentées ici, en mettant en avant les mécanismes réactionnels, les avantages et inconvénients de la méthode (Tableau 6).

Les tests antioxydants *in vitro* biologiques sont difficilement accessibles en raison de leur caractère commercial (brevets). Néanmoins, la littérature mentionne quelques tests qui sont présentés dans le Tableau 7.

Les résultats d'activité AO sont généralement exprimés en fonction d'une molécule de référence possédant de forte propriété antioxydante connue sous le nom de Trolox[®] qui est un analogue hydrosoluble de la vitamine E (Figure 27) :

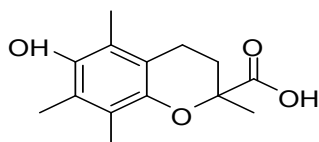


Figure 27 : Structure chimique du Trolox

QUELQUES TESTS <i>IN VITRO</i> CHIMIQUES				
Tests	DPPH	ABTS ou TEAC	FRAP	ORAC
Mécanismes réactionnels	• transfert d'électron majoritaire	• transfert d'électron et de proton	•transfert d'électron	• transfert de proton
Nature des molécules testées	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles	•hydrophiles	•hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	• CI ₅₀ et/ou en mg ou µmol équivalent Trolox [®]	• CI ₅₀ et/ou en mg ou µmol équivalent Trolox [®]	•en mg ou µmol équivalent Fe ²⁺	• CI ₅₀ et/ou en mg ou µmol équivalent Trolox [®]
Avantages	•très facile à mettre en œuvre • peu couteux	• très facile à mettre en œuvre • cinétique de réaction très rapide • peu couteux	• très facile à mettre en œuvre •peu couteux	•facile à mettre en œuvre •couteux (nécessité d'un fluorimètre) • Utilisation d'un générateur de radicaux (ROO')
Inconvénients	• encombrement stérique de molécules à hauts poids moléculaires •interférences possibles à 515 nm •forte dépendance au pH et au solvant • radical inexistant <i>in vivo</i>	• produits de dégradation antioxydants radical inexistant <i>in vivo</i>	•pH utilisé non physiologique •interférences possibles à 595 nm •interférences avec composés possédant E° < 0,77 V	• mécanismes de génération des ROO' non physiologique • interférences possibles des protéines
Références	[Brand-Williams <i>et al.</i> , 1995; Pinelo <i>et al.</i> , 2004]	[Awika <i>et al.</i> , 2003; Arts <i>et al.</i> , 2004; Osman <i>et al.</i> , 2006]	[Benzie et Strain, 1996; Ou <i>et al.</i> , 2002]	[Ou <i>et al.</i> , 2001; Lopez <i>et al.</i> , 2003]
	[Prior <i>et al.</i> , 2005]			

Tableau 6 : description de quelques tests antioxydants *in vitro* chimiques

TESTS <i>IN VITRO</i> BIOLOGIQUES			
Tests	KRL	CAP-e	ROS-PMN
Substrat ou réactif utilisé	• érythrocytes • sang total	• érythrocytes	• leucocytes
Mécanismes réactionnels	• mécanismes enzymatiques et chimiques	• aptitude des AO à pénétrer et piéger les radicaux	• aptitude des AO à pénétrer et piéger les radicaux • Inhiber la formation des EOR par les leucocytes polynucléaires (mécanisme anti-inflammatoire) • effet pro-inflammatoire
Nature des molécules testées	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles	• hydrophiles et lipophiles
Expression des résultats	• % du temps de demi-hémolyse • en mg ou μmol équivalent Trolox [®] , acide gallique	• en mg ou μmol équivalent Trolox [®] , acide gallique	• concentration en extrait
Avantages	• limitation des solvants • Utilisation d'un générateur de radicaux • attaque radicalaire continue et progressive	• limitation des solvants • utilisation d'un générateur de radicaux	• très similaire au test CAP-e avec en plus des effets anti-inflammatoires
Inconvénients	• accès difficile au brevet • couteux	• attaque radicalaire uniquement initiale • accès difficile au brevet • étude uniquement qualitative	• utilisation de H_2O_2 • accès difficile au brevet • 3 mécanismes d'action
Références	[Prost, 1989; Blache et Prost, 1992]	[Honzel <i>et al.</i> , 2008; Kang <i>et al.</i> , 2010]	

Tableau 7 : Description de quelques tests *in vitro* biologiques

V Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont, pour la plupart, dotés de pouvoir antioxydant. Ainsi, l'un des objectifs principaux de la thèse est-il la caractérisation chimique et biologique des biomolécules issues des deux espèces de palmiers précédemment citées, reconnues pour leur aptitude à piéger les radicaux libres. Notre attention se focalisera sur les composés AO appartenant à cette famille.

V.1 Généralités, structures et classification

Les composés phénoliques, ou polyphénols, constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. On les retrouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits, et ils font donc partie intégrante de notre alimentation. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes pour interagir avec les autres végétaux et les animaux. Ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction.

Le terme phénolique est utilisé pour définir des substances qui possèdent au moins un groupement hydroxyle (OH) substitué sur un cycle aromatique. Ce nom provient du composé parent le plus simple : le phénol.

Les polyphénols naturels peuvent donc être des molécules simples comme les acides phénoliques, mais aussi des composés hautement polymérisés comme les tanins. Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à ce jour dans le règne végétal. On compte, à l'heure actuelle, pas loin de 8000 composés. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Tableau 8) [Bravo, 1998].

La large variété de polyphénols peut être divisée en une dizaine de classes dont la structure chimique peut être répartie en deux grands groupes, les flavonoïdes et les autres. Les flavonoïdes, qui représentent la classe la plus abondante et la plus étudiée de cette classification, comptent plus de 4000 composés découverts à ce jour (Tableau 9). Les composés de chaque sous-classe des flavonoïdes se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles ou autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et en position 3 sur l'hétérocycle central (Figure 25). C'est d'abord la structure de ce dernier et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes.

Les autres possèdent une structure chimique plus simple comme les acides phénoliques et les stilbènes dont les dérivés sont parfois complexes, comme les oligomères de stilbènes, les gallotanins, et les ellagitannins [El Gharras, 2009].

Les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins et les lignanes sont majoritairement présents dans les feuilles, les fleurs et l'écorce de bois. Ces molécules jouent un rôle majeur au niveau de la croissance des végétaux et dans la lutte contre des agents pathogènes et des infections. La couleur des fruits, des fleurs et des feuilles est une des caractéristiques d'une sous-classe des flavonoïdes [El Gharras, 2009].

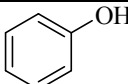
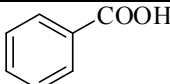
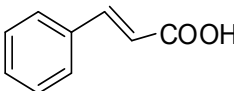
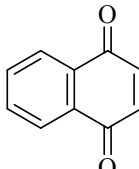
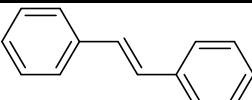
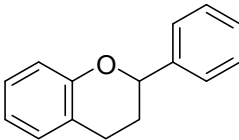
Squelette carboné	Classe	Structures de base
C ₆	Phénols simples	
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamique coumarines	
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	

Tableau 8 : Principales classes des composés phénoliques

V.1.1 Les acides phénoliques

On distingue deux classes appartenant à cette sous-famille. Les dérivés d'acide benzoïque et les dérivés d'acide cinnamique. Les acides hydroxybenzoïques sont à la base de structures complexes comme les tanins hydrolysables présents dans les mangues, et les fruits rouges comme les fraises, les framboises ou encore les mûres [Manach *et al.*, 2004]. Les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont principalement composés d'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Annexe 6). L'acide caféique se combine avec l'acide quinine pour former l'acide chlorogénique, que l'on retrouve dans de très nombreux fruits et à forte concentration dans le café [El Gharras, 2009].

V.1.2 Les stilbènes

Ces composés sont en très petite quantité dans notre alimentation. Le plus connu d'entre eux est le resvératrol (Annexe 6) qui a été largement étudié pour ses propriétés anticancéreuses mises en évidence lors de l'étude des activités biologiques de plantes médicinales. [El Gharras, 2009].

V.1.3 Les flavonoïdes

➤ Les flavonols

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le kaempferol et la quercétine (Annexe 6). Cette dernière est connue pour posséder un très fort pouvoir antioxydant en raison de sa structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres. A des concentrations de l'ordre de 15 à 30 mg/kg de matière fraîche, on les rencontre dans l'oignon, les brocolis, les poireaux et les myrtilles. La glycosylation avec un glucose ou un rhamnose est très fréquente [Manach *et al.*, 2004].

➤ Les flavones

De tous les flavonoïdes, cette sous-classe est la moins abondante dans les fruits et légumes. Ils sont essentiellement constitués de lutéoline et apigénine glycosylés (Annexe 6). Les seules denrées comestibles connues à ce jour qui en possèdent sont le persil et le céleri [Manach *et al.*, 2004].

➤ Les flavanones

Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents des quantités importantes dans le citron. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron. La position 7 est le siège de la glycosylation [El Gharras, 2009].

➤ Les isoflavones

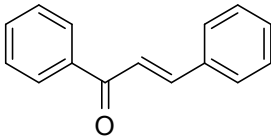
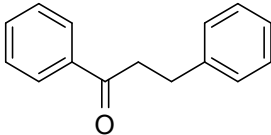
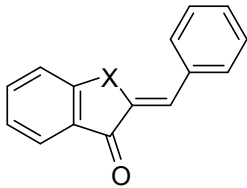
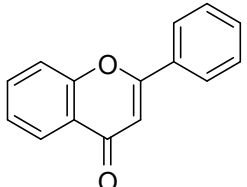
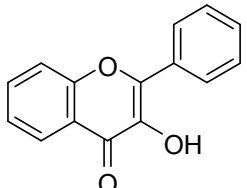
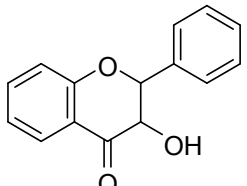
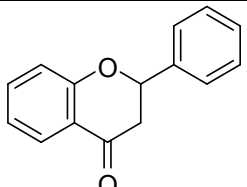
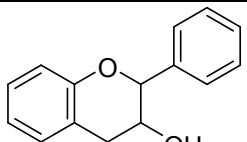
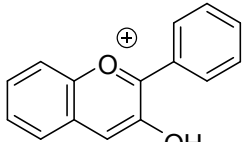
Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, qui peuvent être glycosylées ou non. On les rencontre aussi dans les légumineuses.

➤ Les flavanols

Les flavanols existent sous forme de monomères, dont l'unité la plus simple est la catéchine, et sous forme polymérique appelés les proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme, mais le chocolat et le thé sont les principales sources de ce composé [El Gharras, 2009].

➤ Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels colorés que l'on retrouve dans les plantes vasculaires. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Une caractéristique importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante, et de nombreuses études sur leurs activités biologiques peuvent en témoigner [Castaneda-Ovando *et al.*, 2009].

Flavonoïdes	Structure de base
Chalcones	
Dihydrochalcones	
Aurones	 <p data-bbox="794 775 1038 808">X = O, S, SO₂ ou NH</p>
Flavones	
Flavonols	
Dihydroflavonols	
Flavanones	
Flavanols	
Anthocyanidines	

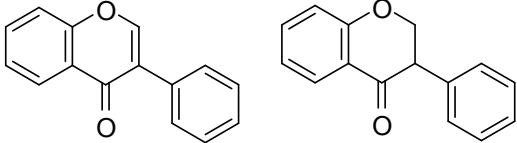
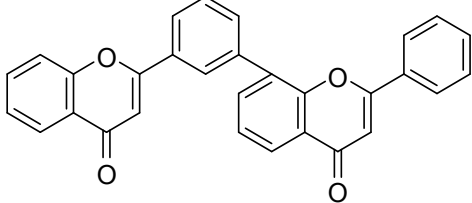
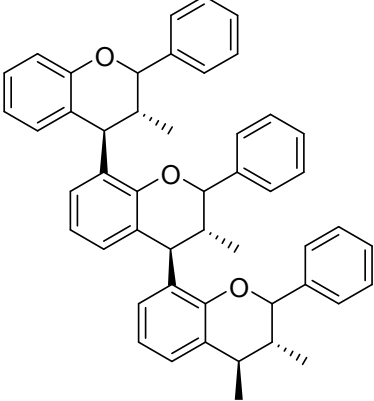
Flavonoïdes	Structure de base
Isoflavonoïdes	
Biflavonoïdes	
Proanthocyanidines ou tanins condensés	

Tableau 9 : Différentes classes des flavonoïdes[Sartori-Thiel, 2003; Hallgas et al., 2004]

➤ Les proanthocyanidines

Connus sous le nom de tanins condensés, ils peuvent être des dimères, des oligomères et polymères de catéchine qui sont liés entre eux en position C4, C8 ou encore C6 [Tarascou *et al.*, 2011]. Ils entrent en grande partie dans la composition des raisins où ils sont localisés dans les graines et la peau. Le degré de polymérisation de ces composés varie en fonction de l'organe végétal : entre 1 et 20 pour la graine et en moyenne 30 pour la peau. L'aptitude de ces composés à s'associer avec les protéines salivaires leur confère la propriété d'astringence que l'on retrouve chez certains fruits (raisin, pomme, poire) et certaines boissons (thé, vin, bière) [Priour *et al.*, 1994; El Gharras, 2009].

V.1.4 Les lignanes

Ils sont constitués de deux unités de phénylpropane. Bien qu'ils entrent dans la composition de certaines graines, céréales, fruits et autres légumes, ils sont environ 1000 fois plus concentrés dans les graines de lins [El Gharras, 2009].

V.2 Propriétés chimiques, et mécanismes d'action contre les radicaux libres.

V.2.1 Propriétés chimiques majeures des polyphénols

Une propriété importante des groupements hydroxyles des phénols est leur acidité due à la labilité des protons acides, qui entraîne la formation d'anionsphénoxydes (Figure 28) stabilisés par résonance. Cet anion, a la possibilité de perdre un électron pour former un radical [Sartori-Thiel, 2003] ; l'électron, lui, pouvant être récupéré par un radical libre. La structure aromatique du radical phénoxyde ainsi formé lui confère une certaine stabilité, donc une réactivité plus faible, en raison de la délocalisation du radical [Leopoldini *et al.*, 2011]. Il peut, ensuite, réagir avec un autre radical libre [Korkina *et al.*, 2012].

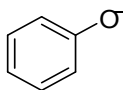


Figure 28 : Structure chimique de l'ion phénoxyde

Les substitutions les plus rencontrées sur les phénols des végétaux sont principalement la méthylation et la conjugaison avec des esters et des glycosides, lesquels peuvent être acylés. Les polyphénols sont généralement glycosylés dans leur état naturel [Sartori-Thiel, 2003].

Par conséquent, l'aptitude de certains polyphénols à être naturellement présents sous forme glycosidique dans l'aliment leur octroie une biodisponibilité toute relative. En effet, il a été montré que la glycosylation, la conjugaison et la polymérisation tendaient à diminuer leur absorption intestinale [Manach *et al.*, 2004].

V.2.2 Mécanismes d'action contre les radicaux libres

La grande capacité des composés phénoliques à contrecarrer les radicaux libres, et à chélater les ions métaux de transitions (cf III.5.2) est directement liée à leurs caractéristiques structurales. Il est prouvé que cette activité est due aux nombres de groupements hydroxyles présents sur les

cycles benzoïques, et aussi à la proximité des groupes alkyls. Ainsi, des différentes familles connues des polyphénols, les flavonoïdes sont-ils ceux qui, en particulier, réunissent toutes ces caractéristiques [Rice-Evans *et al.*, 1996].

V.3 Propriétés biologiques d'intérêt des composés phénoliques

En plus de leur capacité antioxydante, les composés phénoliques sont dotés d'un grand nombre de propriétés biologiques qui sont exploitées dans de nombreux domaines industriels.

Activité antioxydante

Cette activité est, sans nul doute, celle qui caractérise le mieux, et avec la plus grande fréquence, les polyphénols, et, en particulier, les **flavonoïdes**. En effet, de nombreuses revues leur confèrent le rôle d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , NO^{\cdot} , H_2O_2 , 1O_2 , $HOCl$, RO^{\cdot} et ROO^{\cdot}) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN). Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives. Les radicaux libres seraient aussi impliqués dans le processus de vieillissement [Quideau *et al.*, 2011].

Activités antibactérienne, antifongique et antivirale

Les plantes ont une capacité intrinsèque à synthétiser des métabolites secondaires dont certains sont des composés aromatiques de types phénols. Ces composés jouent un rôle de protection des plantes contre les invasions microbiennes, et présentent d'autres mécanismes d'action de lutte contre les champignons, bactéries et virus. Ces propriétés antifongiques et antivirales trouvent de nombreuses applications en médecine humaine [Xia *et al.*, 2011].

Il a été reporté que les raisins *Vitis vinifera* possèdent des propriétés pharmacologiques importantes, et en particulier des activités antimicrobiennes grâce à la présence de nombreux polyphénols, notamment d'**acide gallique**, d'**acide hydroxycinnamique**, de **flavanols**, de **flavonols**, et de **tanins** [Nassiri-Asl et Hosseinzadeh, 2009].

Les composés, appartenant aux **acides phénoliques**, les plus représentatifs de ces effets sont les acides cinnamiques et caféïques. On les retrouve présents dans le thym et la téragone. Ces composés sont particulièrement efficaces contre de nombreuses souches de bactéries, de champignons et de virus [Cheng *et al.*, 2008].

Les possibilités de guérison qu'offrent les **flavonoïdes** sont exploitées de longue date. Hippocrate prescrivait un baume de propolis contre les plaies et les ulcères. Des siècles plus tard, les propriétés antimicrobiennes de la propolis ont été attribuées aux composés de la catégorie des **flavonols** et **flavanones**. En effet, avec leur aptitude à inhiber la germination des spores de plantes pathogènes, ils sont d'excellents candidats pour lutter contre les champignons pathogènes chez l'Homme [Cushnie et Lamb, 2005]. Les **flavonols** issus de fractions de propolis ont également montré des effets significatifs dans la lutte contre l'herpès simplex virus de type 2 ou HSV-2, sexuellement transmissible, et qui est considéré comme un facteur de haut risque pour la transmission du VIH [Khan *et al.*, 2005].

La capacité des **tanins** à créer des complexes avec les protéines par des liaisons hydrogènes, des liaisons hydrophobes ou des liaisons covalentes, leur permet alors de désactiver les adhésions microbiennes, enzymatiques et les enveloppes cellulaires transportant les protéines des microorganismes [Cowan, 1999].

Activité anti-inflammatoire

L'action des **flavonoïdes** d'un extrait de citron sur la perméabilité membranaire fut le premier effet pharmacologique connu de ces composés, il y a plus de 50 ans [Sartori-Thiel, 2003].

Les études sur les flavonoïdes issus de plantes utilisées traditionnellement restent encore très répandues car, bien que l'inflammation soit un phénomène normal d'autodéfense de l'organisme contre des blessures, elle est parfois incontrôlée dans les maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde) ou lorsqu'elle est liée aux réponses allergiques (asthme) [Benavente-Garcia et Castillo, 2008; Conforti *et al.*, 2008].

Dans la famille des **stilbènes**, le resvératrol, a montré des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro*. Les recherches se tournent actuellement vers la synthèse de produits à base de resvératrol dans le but de diminuer l'utilisation de médicaments synthétiques [Udenigwe *et al.*, 2008].

V.4 Applications industrielles des polyphénols

De telles propriétés ont donc été exploitées, et trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique.

Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques [Daglia, 2012].

La capacité antioxydante de composés comme les polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales [Moore *et al.*, 2001].

Enfin, l'effet de certains flavonoïdes en médecine humaine est de plus en plus étudié dans le traitement de certaines maladies, et particulièrement pour le contrôle du virus de l'immunodéficience, principal responsable du SIDA [Sartori-Thiel, 2003].

VI Objectifs généraux de la thèse

Il existe aujourd'hui un fort consensus, partagé aussi bien par les consommateurs, les autorités sanitaires et les marchés, à propos de la volonté d'utiliser de plus en plus de produits basés sur des ressources naturelles, et respectueux de l'environnement. La biodiversité végétale issue du bassin amazonien, en raison de son extraordinaire richesse en ressources génétiques, et des utilisations traditionnelles locales qui en sont faites, constitue une source importante de principes actifs à valoriser.

A l'heure actuelle, l'espèce *Euterpe oleracea* Mart., vernaculairement appelée « açai », est le seul fruit de palmier amazonien à connaître un succès à l'échelle mondiale. Depuis sa première

présentation aux USA en 2004, jusqu'à aujourd'hui, son prix à l'exportation a été multiplié par 6 [Heinrich *et al.*, 2011].

L'édition du New York Times paru le 23 février 2010 mettait en lumière l'augmentation exponentielle de la production annuelle de ce fruit dans l'état du Para au Brésil, passant de 380 à 9400 tonnes de fruits entre 2000 et 2009.

À l'instar de l'*Euterpe oleracea* Mart à ces débuts, l'*Oenocarpus bataua* Mart., dit « patawa », du fait de ses nombreuses utilisations traditionnelles, et du peu de données relatives sur ce fruit, représente des enjeux scientifiques, sociétaux et économiques qui ne peuvent pas être ignorés.

Les travaux de cette thèse s'axent sur la définition de l'activité biologique du fruit mur de ce palmier (en particulier la capacité antioxydante des polyphénols présents) et sur la caractérisation physico-chimique des molécules qui seraient responsables de cette activité ; le fruit de palmier « açai » étant aussi étudié à titre de référence.

Cette recherche s'inscrit dans une démarche innovante, puisqu'elle vise à étudier, dans un premier temps, non pas le fruit dans sa globalité mais chaque partie du fruit (mésocarpe, épicarpe).

Cette démarche a un double objectif : celui, non seulement d'améliorer les connaissances quasi inexistantes relatives à la capacité antioxydante de ce palmier et à sa composition phytochimique, mais aussi, *in fine*, d'entrevoir des usages nouveaux par la création de produits dérivés à court ou moyen terme, tels que des compléments alimentaires, des aliments fonctionnels (aliments) ou des produits cosmétiques et pharmaceutiques.

Chapitre 2 : Partie expérimentale

I Échantillonnages

Les conditions de récolte des fruits de palmier retenus : l'*Oenocarpus bataua* et de l'*Euterpe oleracea* sont réunies dans le Tableau 10.

Nom botanique	Date de récolte	Lieu	Organe	Stade de développement	Saison	Milieu végétatif
<i>Oenocarpus Bataua</i> Mart.	24/03/09	Montsinéry (Guyane française)	Fruits entiers	Fruits mûrs (estimé visuellement)	Saison des pluies	forêt
<i>Euterpe oleracea</i> Mart.	20/04/11	Roura (Guyane française)	Fruits entiers	Fruits mûrs (estimé visuellement)	Saison des pluies	lisière

Tableau 10 : Récapitulatif des conditions de récoltes

Immédiatement après la récolte, les fruits sont lavés et essuyés afin de les débarrasser de tous débris cellulaires et organismes potentiellement responsables de détériorations de leur qualité. Les fruits du patawa récoltés sont alors séparés en trois lots de quantité égale :

- un lot où, après pelage, sont récupérés le mésocarpe et l'épicarpe qu'on nommera le MEM (Mélange Épicarpe Mésocarpe),
- deux lots où le mésocarpe et l'épicarpe sont séparés.

Pour le wassaye, un unique lot est effectué où le mésocarpe et l'épicarpe sont mélangés compte-tenu de la quasi-impossibilité de séparer les deux tissus. Un échantillon commercial de thé vert de Chine est aussi utilisé comme référence.

Chaque partie du fruit est ensuite plongée dans l'azote liquide, afin de le stabiliser du point de vue chimique et biologique. Cette cryogénéisation est primordiale dans la conservation de la matière végétale, car, dans un premier temps, elle sert à stopper les enzymes responsables de la dégradation des polyphénols mais aussi à éviter la formation de cristaux de glace qui provoqueraient l'éclatement des cellules (comme cela est le cas pour la congélation classique). Une fois congelée, la matière végétale est broyée puis lyophilisée. La poudre est finalement aliquotée par lots de 50 g, et placée au congélateur à -20°C jusqu'à analyse.

II Étude des polyphénols

II.1 Choix de la méthode d'extraction

La méthode d'extraction des biomolécules utilisée au laboratoire est la sonication, en raison de sa simplicité d'exécution : un gain de temps, une température ambiante ainsi que des quantités plus faibles de solvant utilisé et une grande reproductibilité [Palma et Barroso, 2002; Biesaga, 2011].

II.2 Choix des solvants

Les polyphénols, classe de molécules plutôt hydrosolubles, sont majoritairement extraits par des solvants de polarité moyenne à forte. Ainsi, les solvants qui ont été retenus pour notre étude sont-ils le méthanol et l'acétone qui présentent une polarité moyenne, et l'eau dont la polarité est la plus élevée. Des mélanges de solvants sont aussi utilisés, tels les mélanges méthanol/eau (70/30, v/v) et acétone/eau (70/30, v/v), dont la polarité sera qualifiée d'intermédiaire.

De plus, le choix d'utiliser un milieu acide a été motivé par le comportement du fruit de patawa, similaire à l'*Euterpe oleracea* Mart. à se comporter comme certaines baies rouges (myrtilles, raisins, cassis..) qui laissent des traces rouges à violacées, en raison de la présence d'anthocyanes ; ces dernières n'étant stables qu'à pH acide, sous la forme d'ion flavylium [Giusti et Wrolstad, 2001].

II.3 Étape d'extraction des polyphénols

Pendant l'étape d'extraction, certaines précautions ont été prises afin de protéger les polyphénols et d'autres biomolécules particulièrement sensibles à toute dégradation éventuelle, en particulier en les protégeant de la lumière. De ce fait, chaque ballon d'extraction a été entièrement recouvert d'une feuille d'aluminium.

Étape d'extraction dite « classique »

La méthode dite d'extraction « classique » consiste à placer le matériel végétal sec (2,5 g) avec 50 ml de solvant (ration matière/ liquide (m/v) de 5 %) dans un ballon, et à le soniquer dans un bain à

ultrasons à 130 kHz pendant 10 min. Le contenu est ensuite centrifugé à 5000 g pendant 10 minutes afin de culotter les débris cellulaires, et filtré sur papier filtre standard en cellulose. Le marc est alors récupéré puis extrait à nouveau à quatre reprises selon le procédé décrit précédemment (Figure 29).

Étape d'extraction avec délipidation

D'après les résultats de **Béreau *et al.* (2001)**, la forte teneur lipidique des fruits de palmier nous a amenés à envisager une étape préliminaire de délipidation dans le protocole d'extraction.

La matière végétale (2,5 g) est dégraissée initialement avec 50 ml de cyclohexane, placée dans le bain à ultrasons pendant 10 minutes à 130 kHz, et filtrée sur papier cellulose. Le marc récupéré est délipidé à deux reprises avant d'être extrait selon le protocole d'extraction classique précédent (Figure 29).

La fin de l'extraction, qu'elle soit classique ou avec une étape de délipidation, est marquée par l'évaporation à sec des surnageants réunis à l'aide d'un évaporateur rotatif dans le cas de solvants organiques ($T= 40^{\circ}\text{C}$), et à l'aide d'un lyophilisateur pour les solvants aqueux. L'extrait sec est ensuite redissout dans le solvant d'extraction à la concentration souhaitée.

Les polyphénols étant surtout sensibles à l'oxydation et à la température, tous les échantillons ont été conservés à basse température, et à l'abri de la lumière avant chaque analyse.

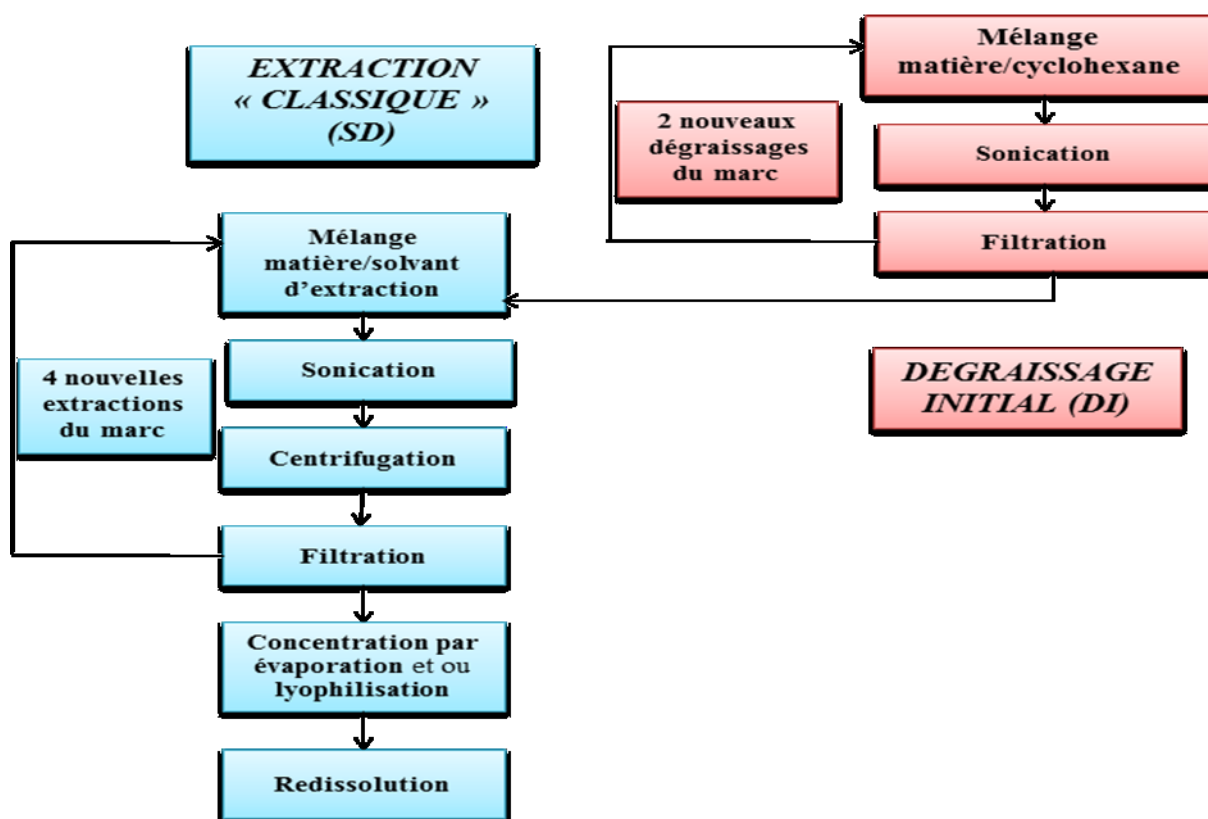


Figure 29: Schéma simplifié des étapes du procédé d'extraction des polyphénols

II.4 Dosage des composés phénoliques

II.4.1 Dosage des polyphénols totaux

Préparation des solutions

Le réactif Folin-Ciocalteu est utilisé en excès. Une solution mère d'acide gallique est préparée à une concentration de 1 g / l dans le méthanol. La gamme qui sera réalisée à partir de celle-ci permettra de tracer la courbe d'étalonnage. Une solution de carbonate de sodium anhydre à 20 % (w/v) est ensuite réalisée dans de l'eau distillée.

Mode opératoire

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par **Arnous *et al.* (2002)** en y apportant quelques modifications.

Dans un tube à hémolyse en verre, on place 2370 µl d'eau distillée, 30 µl d'extrait (ou d'étalon) à 1 g/l et 450 µl de réactif Folin-Ciocalteu. Le milieu est mélangé à l'aide d'un vortex, puis est

ajouté 150 µl d'une solution de carbonate de sodium à 20 % (w/v). Le mélange réactionnel est finalement laissé à incuber durant 2 heures à l'obscurité. L'absorbance est lue à **750 nm** contre le témoin.

Droite d'étalonnage et expression des résultats

Les valeurs de concentration seront directement lues à partir des droites d'étalonnage établies à l'aide de la solution de référence d'acide gallique, de la forme $Abs = a \times [AG] + b$. Il s'ensuit que la concentration de l'échantillon est exprimée en mg d'équivalent de l'étalon par gramme d'extrait sec ou de matière sèche.

« a » représente la pente, « b » l'ordonnée à l'origine de la droite étalon.

La gamme d'acide gallique est tracée pour des concentrations comprises entre 0 et 1000 mg / l (Figure 30).

Application

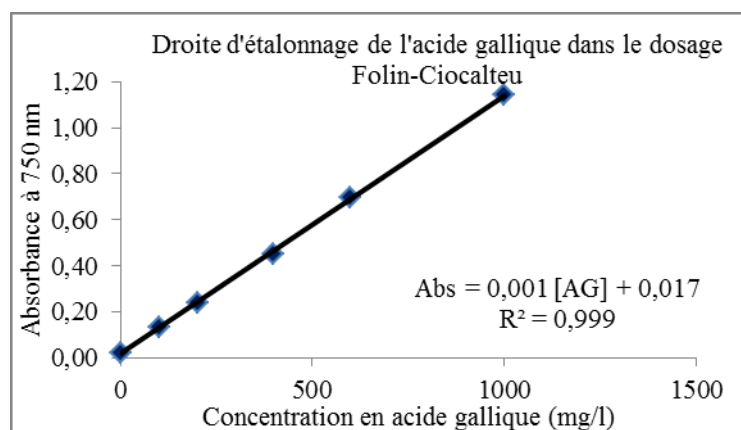


Figure 30 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique dans le dosage de Folin-Ciocalteu

	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Moyenne	σ
échantillon à tester (à 1 g/l)	0,268	0,267	0,228	0,254	0,023

La quantité de polyphénols totaux calculée à l'aide de l'équation de la droite d'étalonnage permet d'aboutir à 237,0 mg EAG/g ES soit 13,3 mg EAG/g MS avec le rendement d'extraction polyphénolique.

II.4.2 Dosage des flavonoïdes totaux

Préparation des solutions

Trois solutions sont réalisées. La première est une solution aqueuse de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % (w/v). La deuxième est une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 5 % (w/v) dans de l'eau distillée, et, enfin, la troisième est une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 1 M. Une solution méthanolique à 1 g/l de catéchine sert de référence. Les solutions filles qui seront réalisées à partir de cette dernière permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

Mode opératoire

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par **Zhishen *et al.* (1999)** et **Kim *et al.* (2003)** en y apportant quelques modifications. Quatre cents μl d'extrait dilué (ou d'étalon ou d'eau distillée pour le témoin) sont placés dans un tube à hémolyse en verre avec 120 μl de NaNO_2 à 5 %. Après 5 minutes, sont ajoutés 120 μl d' AlCl_3 à 10 %, et le milieu est mélangé à l'aide d'un vortex. Après 6 minutes, 800 μl de NaOH à 1 M sont ajoutés au milieu. L'absorbance est lue immédiatement à 510 nm contre le témoin.

Expression des résultats

Les valeurs de concentration seront directement lues à partir de la droite d'étalonnage établies à l'aide de la solution de référence, de la forme $\text{Abs} = a \times [\text{Cat}] + b$. Il s'ensuit que la concentration de l'échantillon est exprimée en mg d'équivalent de l'étalon par gramme d'extrait sec ou de matière sèche.

La gamme de catéchine est tracée pour des concentrations comprises entre 0 et 120 mg/l (Figure 31).

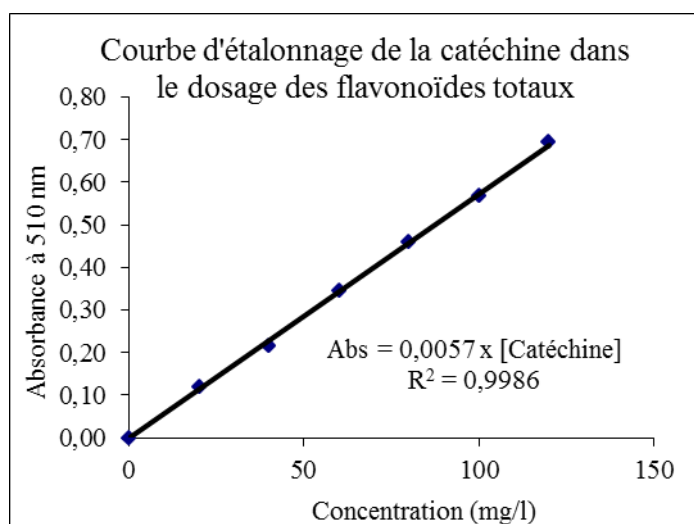


Figure 31 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes totaux

La quantité de flavonoïdes totaux de l'extrait testé à une concentration fixe est alors calculée à l'aide de l'équation de la droite d'étalonnage à partir des valeurs absorbances mesurées.

II.4.3 Dosage des proanthocyanidines totaux ou test au DMACA

Préparation des solutions

Une solution d'acide chlorhydrique (HCl) méthanolique 1 N est effectuée avec de l'HCl à 33 %. Elle servira à réaliser la solution acidifiée de DMACA à 0,1 % (w/v) qui constitue la solution de travail. Cette solution obtenue est conservée à l'abri de la lumière. Une solution d'étalon de catéchine à 1g/l est préparée dans le méthanol. Les solutions filles qui seront réalisées à partir de cette dernière permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

Mode opératoire

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par **Arnous et al. (2002)** en y apportant quelques modifications.

Dans un tube à hémolyse en verre, on introduit 400 µl d'extrait pur ou dilué (ou d'étalon ou de méthanol (pour le témoin)) en présence de 2000 µl de réactif DMACA. Le milieu réactionnel est mélangé grâce à un vortex, laissé à incuber pendant 10 minutes puis analysé en spectrophotométrie à **640 nm** contre le témoin.

Droite d'étalonnage et expression des résultats

Les valeurs de concentration seront directement lues à partir des droites d'étalonnage établies, de la forme $Abs = a \times [Cat] + b$. La concentration de l'échantillon est alors exprimée en mgd'équivalent de l'étalon par gramme d'extrait sec ou de matière sèche.

La courbe d'étalonnage est tracée à partir d'une solution de catéchine allant de 0 à 15 mg/l (Figure 32).

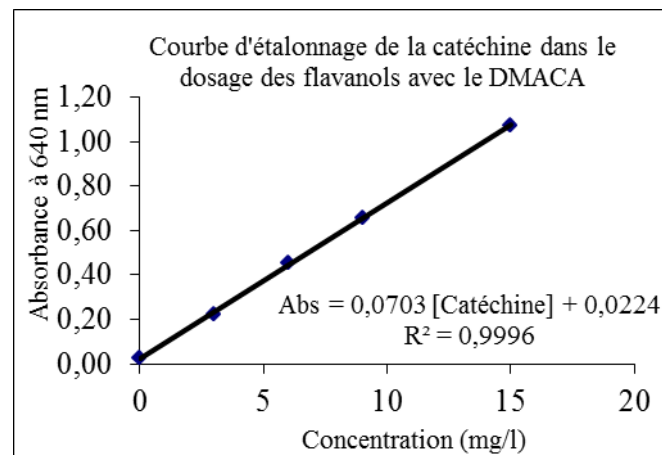


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des proanthocyanidines totaux

Les quantités de proanthocyanidines totaux obtenues sont calculées grâce à la courbe étalon, et à partir des absorbances de chaque extrait étudié à une concentration fixe.

II.4.4 Dosage des anthocyanes monomères totaux : méthode des pH différentiels

Préparation des solutions

Une solution aqueuse de chlorure de potassium à 0,025 M sert de premier réactif. On ajuste ensuite le pH de la solution jusqu'à la valeur 1 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique à 6 N.

Une solution aqueuse d'acétate de sodium à 0,4 M sert de second réactif. Le pH de la solution est ensuite ajusté à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 6 N jusqu'à la valeur de 4,5.

Mode opératoire

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par **Giusti et al. (2001)**. Six tubes à hémolyse en verre sont utilisés par extrait à une concentration donnée. Trois d'entre eux sont dilués à l'aide de la solution de chlorure de potassium, tandis que les trois autres sont dilués avec la solution d'acétate de sodium. Le volume de l'extrait ne devant pas excéder 20 % du volume total. Les tubes sont ensuite placés à l'abri de la lumière durant 15 minutes, puis les absorbances sont lues à **520 nm** et à **700 nm** contre le témoin contenant de l'eau distillée.

Expression des résultats

Il s'agit ici d'un test différentiel. Ainsi l'absorbance finale est-elle obtenue par différence de l'absorbance mesurée aux différentes longueurs d'onde :

$$Abs = (Abs_{520} - Abs_{700})_{pH 1} - (Abs_{520} - Abs_{700})_{pH 4.5}$$

Le calcul de la concentration en anthocyanes monomères totaux (AMT) permet d'obtenir des résultats qui sont exprimés en mg/l :

$$AMT = \frac{(Abs \times M \times DF \times 1000)}{(\epsilon \times l)}$$

Avec **M** = 449,2 g/mol, masse molaire de la cyanidine-3-glycosylée

DF : le facteur de dilution de l'échantillon analysé

l : la longueur de la cellule de mesure en cm

ϵ = 26.900 M⁻¹ cm⁻¹ : le coefficient d'extinction molaire de la cyanidine-3-glycosylée

Les anthocyanes monomères totaux (AMT) sont ensuite exprimées en mg/100 g de matière sèche (MS) :

$$AMT \text{ en mg EEC}_3\text{G/g d'extrait sec} = \frac{\text{anthocyanes monomères totaux (mg/l)}}{\text{Concentration de l'échantillon}}$$

$$AMT \text{ en mgEC}_3\text{G/100 g de matière sèche} = AMT \text{ en mg/g d'extrait sec} \times 100 \times Rdt \text{ extraction}$$

II.5 Purification des extraits bruts sur gel Sephadex LH20

Le fractionnement des extraits bruts a été optimisé sur colonne ouverte et remplie à base de gel Séphadex LH20, au moyen d'un manifold relié à une pompe permettant de récolter les différentes fractions sous vide à débit constant, à l'abri de la lumière (Figure 33) [Zhou *et al.*, 2011].



Figure 33 : Dispositif mis au point pour le fractionnement des parties du fruit de l'*Oenocarpus bataua*

Préparation du gel et conditionnement de la colonne

Sachant que pour 1 g d'extrait déposé, 24 g de résine LH20 sont nécessaires, la quantité de gel adéquate est mélangée délicatement avec le solvant d'élution initial (eau/méthanol/TFA : 80/20/0,3 %) (200 g de Séphadex pour environ 1500 ml de solvant). Le mélange est remué puis laissé à décanter quelques heures. Le surnageant est éliminé, sans ramener la surface du gel à sec. La colonne est ensuite remplie.

Le fractionnement est réalisé à l'aide de trois solvants dont on diminue progressivement la polarité. Les fractions de volume constant étant recueillies par simple contrôle visuel :

- Eau/Méthanol/TFA (80/20/0,3 %)
- Eau/Méthanol/TFA (50/50/0,3 %)
- Acétone/Eau (70/30)

Chaque fraction est ensuite séchée sous pression réduite, pesée puis reprise dans le solvant d'élution pour analyse chromatographique.

II.6 HPLC et UPLC/ MS des polyphénols

L'analyse chromatographique des extraits bruts, des fractions purifiées d'extraits de fruit et des vitamines a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance dans le laboratoire Spiral à Dijon. Le chromatographe utilisé est de type Perkin Elmer série 200 muni d'une pompe quaternaire, d'un injecteur automatique, d'un four à effet pelletier et d'un détecteur UV à barrette de diodes (DAD).

Les différents composés à analyser ont été identifiés par comparaison des temps de rétention et des spectres UV- visible avec ceux des étalons, et, parfois, confirmés par surcharge des témoins. Les étalons polyphénoliques utilisés proviennent d'Extrasynthèse (Genay, France).

- L'analyse chromatographique et massique des échantillons bruts a été réalisée sur une chaîne UPLC Waters couplée à un spectromètre de masse (Amazon X de Bruker) par UPLC-API-IT-MSⁿ (Chromatographie liquide à ultra-haute performance avec ionisation par pression atmosphérique et une trappe ionique pour obtenir trois niveaux de fragmentation). Cet appareil est disponible à la plateforme polyphénols de l'UMR Sciences Pour l'Œnologie (SPO) à Montpellier.

- Les conditions chromatographiques HPLC des composés phénoliques sont rassemblées dans les Tableau 11 & Tableau 12. Certaines conditions en particulier pour les choix des détections UV sont basées sur les résultats issus de la publication de **Merken *et al.* (2000)**.

Colonne	ACE 5 C18
Caractéristiques de la colonne	Longueur × diamètre = 150 mm x 4.6 mm,
	Diamètre des pores = 5µm
T°C	27
Éluant A :	Eau pH 2,2 (par TFA)
Éluant B :	Acétonitrile
Débit :	1ml/min
Volume injecté	20 µl
Longueurs d'onde de détection	280 et 345 nm

Tableau 11 : Conditions chromatographiques HPLC de l'analyse des polyphénols

Temps (min)	%A	%B
0	100	0
5	100	0
50	45	55
51	100	0
60	100	0

Tableau 12 : Gradient d'élution HPLC pour l'analyse des polyphénols

Les conditions d'analyse chromatographique UPLC sont rassemblées dans les Tableau 13 & Tableau 14

Colonne	C18 Waters Acquity BEH
Caractéristiques de la colonne	Longueur × diamètre = 150 mm × 1 mm
	Diamètre des billes = 1,7 µm
T°C	35
Éluant A :	Eau 99 %, Acide formique 1%
Éluant B :	Méthanol 99 %, Acide formique 1 %
Débit :	0,08 ml/min
Volume injecté	0,5 µl
Longueurs d'onde de détection	280, 320, 360 et 520 nm

Tableau 13 : Conditions chromatographiques UPLC d'analyses des polyphénols

Temps (min)	%A	%B
0	98	2
1	98	2
10	70	30
12	70	30
25	25	75
30	10	90
35	10	90
38	98	2
43	98	2

Tableau 14 : Gradient d'élution UPLC pour l'analyse des polyphénols

Les conditions d'analyse par spectrométrie de masse étaient les suivantes :

- Pression du gaz H₂ = 0,34 bars
- HV capillary voltage = 2,5 kV
- Dryingtemperature = 200 °C
- Drying gaz = 8,0 L.min⁻¹
- Pression nebulizer = 14,5 psi
- Tension capillary exit = 140 V
- Syringe draw rate = 10 µl/min

Les spectres de masse des extraits bruts ont été obtenus par plusieurs modes d'ionisation (positif et négatif).

II.7 HPLC des anthocyanes

II.7.1 Analyse qualitative

L'analyse par chromatographie des anthocyanes est tirée de la méthode type II (2003) du « Recueil International des Méthodes d'Analyses-OIV » (Tableau 15 et Tableau 16).

Colonne	Colonne MerckLicrospher 100 RP-18
Caractéristiques de la colonne	Longueur × diamètre = 250 mm x 4 mm,
	Diamètre des billes : 5 µm
T°C	40
Éluant A :	Acide acétique/acétonitrile/eau (10/3/87) (v/v/v)
Éluant B :	Acide acétique/acétonitrile/eau (10/50/40) (v/v/v)
Débit :	0,8ml/min
Volume injecté	20 µl
Longueurs d'onde de détection	518 et 280 nm

Tableau 15 : Conditions chromatographiques de l'analyse des anthocyanes

Temps (min)	%A	%B
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6
46	94	6

Tableau 16 : Gradient d'élution pour l'analyse des polyphénols

II.7.2 Analyse quantitative

Une fois que les composés ont été identifiés par les méthodes décrites dans l'analyse qualitative, ils sont ensuite dosés par étalonnage externe au moyen d'une droite d'étalonnage réalisée à partir d'étalons anthocyanes commerciaux pris à différents concentrations.

II.8 Analyse UPLC des proanthocyanidines par dépolymérisation au phloroglucinol

La méthode est basée sur une réaction d'acidolyse des proanthocyanidines en présence d'un agent nucléophile, le phloroglucinol (Figure 34). La rupture des liaisons C-C entre les unités flavanols constitutives des proanthocyanidines, en milieu acide, libère les unités terminales telles qu'elles et les unités supérieures (initialement substituées en position 4) sous forme d'un carbocation qui est

piégé par le nucléophile pour former un adduit stable (Figure 35) [Kennedy et Jones, 2001]. Les unités natives libérées et les dérivés formés à partir des unités supérieures sont ensuite séparés en UPLC, puis quantifié en triple quadripôle.

La stéréochimie des unités et les substitutions étant conservées, la méthode donne accès à la proportion des différents types d'unités constitutives, au degré de polymérisation moyen des chaînes et à la teneur en flavanols de l'échantillon.

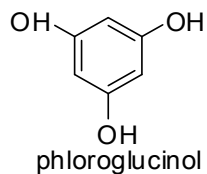


Figure 34 : Structure chimique de la molécule phloroglucinol

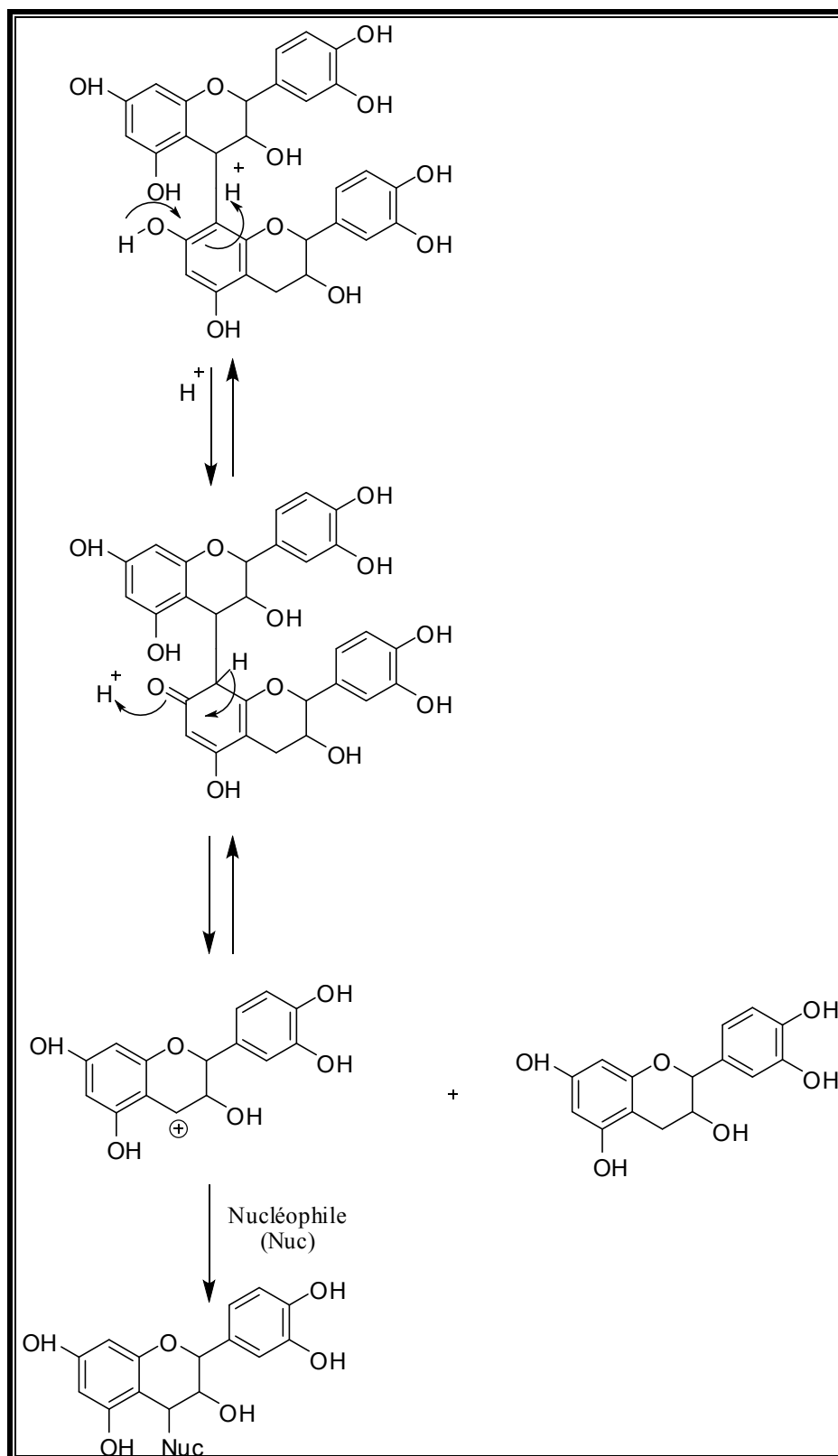


Figure 35 : Réaction supposée de clivage par catalyse acide des proanthocyanidines [Kennedy et Jones, 2001]

II.8.1 Préparation de l'échantillon

L'analyse des proanthocyanidines par phloroglucinolyse est basée sur les travaux de **Kennedy et Jones (2001)**, et est celle mise en place à la plateforme polyphénols de l'UMR SPO à Montpellier. La réaction a été réalisée dans des tubes de type eppendorf en plastique de contenance 1,5 ml. Un volume de 100 µl d'extrait brut de patawa (échantillon patawa MEM Acétone / eau) est évaporé au Genevac. Le culot est repris avec du réactif de phloroglucinolyse. Ce dernier est réalisé à partir de phloroglucinol et d'acide ascorbique dilués dans une quantité suffisante de méthanol acidifié par HCl à 0,2 mol/l. Les tubes sont ensuite placés au bain Marie à 50°C pendant 20 minutes. A la sortie du bain Marie, les tubes sont plongés dans de la glace, et la réaction est arrêtée par addition de 500 µl de solution tampon formiate d'ammonium à 200 mM après centrifugation (10 minutes, 1000 tours/ minutes). L'extrait brut et l'extrait traité sont filtrés à 0,22 µm puis analysés en UPLC.

II.8.2 Analyse qualitative

Les analyses de l'extrait brut et de l'extrait traité ont été conduites sur une chaîne UPLC (Waters Acquity) couplée à un spectromètre de masse (AmaZon X de Bruker) décrits précédemment, en mode positif. Les caractéristiques chromatographiques, et le gradient utilisés sont renseignés dans le Tableau 13 & le Tableau 17.

Temps (min)	%A	%B
0	98	2
1	98	2
10	70	30
12	70	30
25	25	75
30	5	95
35	5	95
38	98	2
43	98	2

Tableau 17 : Gradient d'élution pour l'analyse des proanthocyanidines

III Étude des vitamines

III.1.1 Protocole d'extraction de la vitamine E

Le dosage de la vitamine E a été réalisé selon la norme AFNOR NF EN 12822 de janvier 2011.

Mode opératoire

Brièvement, il s'agit d'une saponification de la poudre lyophilisée en présence d'acide ascorbique, de méthanol et de potasse sous reflux et sous courant d'azote pendant 40 minutes à 80°C. Après reflux, le milieu réactionnel est refroidi avec de l'eau afin que le ratio alcool/eau soit de 1/1. Il s'ensuit une extraction au dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau jusqu'à ce que les eaux de rinçages soient neutres et séchées sur sulfate de sodium, et enfin évaporées sous pression réduite. Finalement, le résidu sec est repris au méthanol.

III.1.2 Protocole d'extraction de la vitamine C

Le protocole suivi est celui de l'AFNOR NF EN 14130 de décembre 2003.

Mode opératoire

La vitamine C est extraite de la poudre lyophilisée en utilisant une solution d'acide métaphosphorique. Une solution réductrice de L-cystéine à 40 g/l est utilisée pour transformer l'acide L(+)-désydroascorbique en acide L(+)-ascorbique. Durant les 5 minutes de réduction, le milieu réactionnel est ajusté à pH 7,0-7,2 par du sodium tri-phosphate à 200 g/l. Finalement le milieu est ramené à pH 2,5-2,8 par de l'acide métaphosphorique à 200 g/l.

III.1.3 HPLC des vitamines

III.1.3.1 Analyse qualitative de la vitamine E

Ces conditions permettent de vérifier la présence ou non des différentes formes de tocophérols (Tableau 18).

Colonne	Licrospher100-RP18
Caractéristiques de la colonne	Longueur × diamètre = 250 mm x 4 mm
	Diamètre des pores= 5 µm
T°C	30
Éluant :	Eau/méthanol (3/97, v/v)
Débit :	1,5 ml/min
Volume injecté	50 µl
Longueurs d'onde de détection UV	290 et 325 nm
Longueurs d'onde de détection fluorimétrique	Excitation: 295 nm, Émission: 330 nm

Tableau 18 : Conditions chromatographiques de l'analyse de la vitamine E

III.1.3.2 Analyse qualitative de la vitamine C

Les conditions chromatographiques dans le cas de l'étude de la vitamine C sont réunies dans le Tableau 19.

Colonne	Licrospher 100 RP-18
Caractéristiques de la colonne	Longueur × diamètre = 250 mm x 4 mm
	Diamètre des pores= 5 µm
T°C	30
Éluant	mélange de phosphate de potassium aqueux (0,1 M) et de bromure de N-cétyl-N,N,N-triméthylammoniumméthanolique (0,05 M)
Débit :	0,7 ml/min
Volume injecté	30 µl
Longueurs d'onde de détection UV	265 nm

Tableau 19 : Conditions chromatographique de l'analyse de la vitamine C

III.1.3.3 Analyse quantitative des vitamines

Une fois que les composés ont été identifiés par les méthodes décrites dans l'analyse qualitative, ils sont ensuite dosés par étalonnage externe à partir d'une droite d'étalonnage réalisée grâce aux étalons (vitamine E et C commerciales) pris à différents concentrations.

IV Évaluation chimique de l'AO, *in vitro*

Tous les réactifs des tests antioxydants, et des dosages des composés phénoliques ont été fournis par les laboratoires Fisher Scientific®, Acrosorganics® et Fluka®. Les solvants utilisés, de grade RPE, ont été commandés chez Carlo Herba et Fluka®. Le spectrophotomètre UV/Visible est de marque Cary 50 Varian et le fluorimètre de marque Cary Eclipse Varian.

Beaucoup de tests standardisés évaluant l'activité antioxydant sont simples, peu coûteux et rapides à mettre en œuvre. Les tests DPPH, TEAC, FRAP et ORAC ont été retenus dans le cadre de cette étude. Des modifications ont été, cependant, apportées afin de les optimiser et de les adapter à notre étude.

IV.1 Test DPPH

Préparation des solutions

Une solution de DPPH méthanolique est préparée extemporanément à 0,1 mM. Une solution mère de Trolox® à 98 % de pureté est réalisée à 5 mM dans le méthanol.

Mode opératoire

Le test utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par **Kordali *et al.* (2005)** en y apportant quelques modifications.

Avant le test, un balayage de l'extrait à tester dans le domaine UV- visible est pré-requis à différentes concentrations, afin de s'assurer, qu'à la longueur d'onde du test antioxydant considéré, aucune interférence due à l'absorption de composés initialement présents dans le produit ne viendra perturber le test. Par la suite, pour déterminer le temps d'incubation optimal pour chaque échantillon, l'absorbance des extraits et du témoin négatif au cours de la réaction est suivie cinétiquement à différentes concentrations.

Le test consiste donc à mélanger, dans un tube à hémolyse en verre, 3900µl de solution DPPH• avec 100µl d'extrait (ou de méthanol pour le témoin négatif). L'absorbance est mesurée à **515 nm** après avoir laissé incuber la réaction, à l'obscurité, pendant 2h.

Expression des résultats

Après avoir tracé la courbe d'après la formule qui suit :

$$\% \text{ **Activité Antioxydante** } = 1 - \frac{\text{Abs Trolox}^{\text{®}}}{\text{Abs méthanol}} \times 100$$

On distingue que cette courbe présente deux zones, une partie linéaire, et une partie asymptotique. La zone linéaire est de la forme : % AO = a × [Trolox[®]]. À partir de cette formule, il est possible d'en déduire la concentration en Trolox[®] qui permet de piéger 50 % des radicaux présents, soit de déterminer la CI₅₀ en mg / l (concentration minimale inhibitrice à 50 %) du Trolox[®] (Figure 36).

$$CI_{50} \text{ Trolox}^{\text{®}} = \frac{50}{a}$$

« a » représente la pente de la régression linéaire.

La CI₅₀ des extraits est basée sur le même mode de calcul que celui décrit précédemment. La formule permettant d'exprimer l'activité AO en mg équivalent Trolox[®] par gramme d'extrait sec ou en équivalent Trolox[®] par gramme de matière sèche est la suivante :

$$\text{mg d'équivalent Trolox}^{\text{®}}/\text{g d'extrait sec} = \frac{CI_{50} \text{ Trolox}^{\text{®}}}{CI_{50} \text{ extrait}} \times 1000$$

$$\text{mg d'ET/g de matière sèche} = \text{mg d'ET/g d'extrait sec} \times \text{Rdt d'extraction}$$

Application

La gamme étalon du Trolox[®] obtenue pour des concentrations allant de 10 à 80 μM, et la droite d'activité antiradicalaire qui en découle, sont signalées dans la Figure 36.

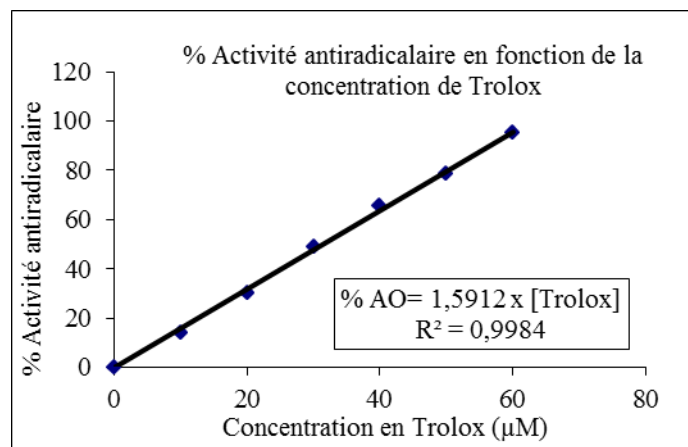
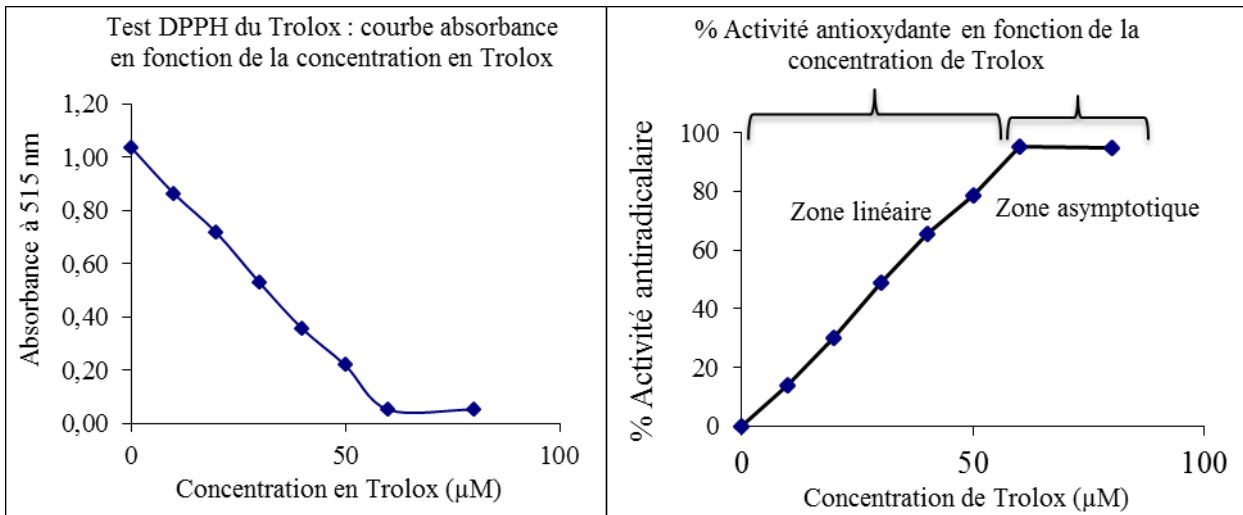


Figure 36 : Gamme étalon de Trolox® établie avec le test DPPH, et droite du pourcentage d'AO du Trolox®

Dans le cas présent, la concentration en Trolox® qui inhibe 50 % des radicaux DPPH est de 31,4 µM soit 7,8 mg/l (Figure 36).

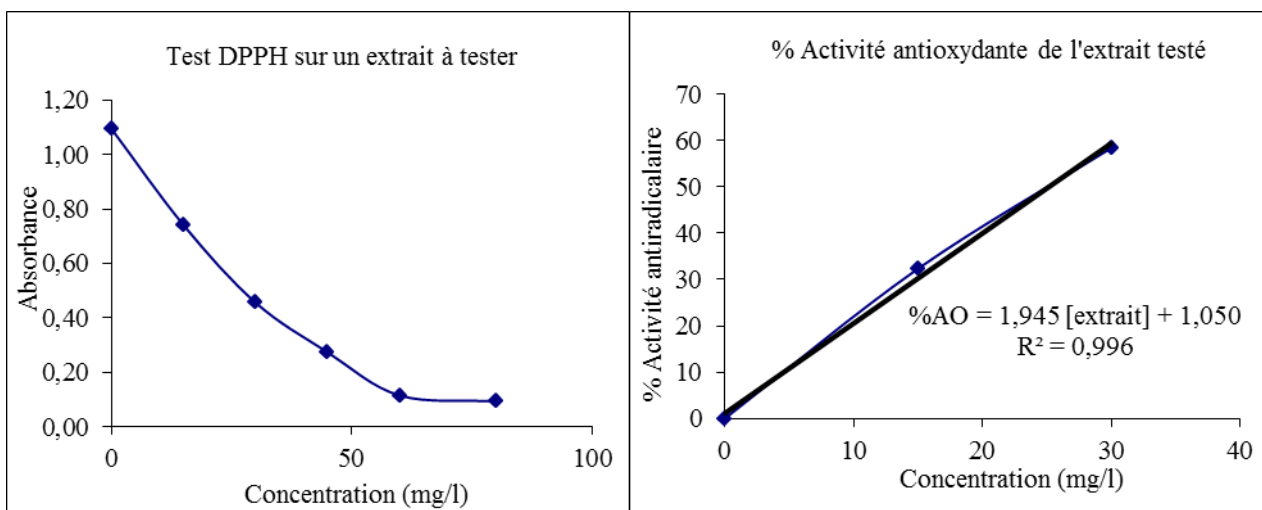


Figure 37 : Courbes d'absorbance et de pourcentage d'AO obtenues pour un extrait dans le test DPPH

La CI_{50} de l'échantillon testé équivaut 25,2 mg/l, ce qui revient à 305,9 mg d'ET / g d'extrait sec et 20,2 mg d'ET/ g de MS pour un rendement d'extraction de composés phénoliques de 6,6 % (Figure 37).

IV.2 Test TEAC ou ABTS^{•+}

Préparation des solutions

Une solution mère d'ABTS^{•+} est préparée en mélangeant 10 ml d'une solution méthanolique ABTS à 14 mM, et 10 ml d'une solution méthanolique de persulfate d'ammonium à 4,9 mM. Le mélange réactionnel est mis en incubation, à l'obscurité, pendant 16 h à température ambiante. La solution fille de travail d'ABTS^{•+} est obtenue en diluant la solution mère d'ABTS^{•+} avec du méthanol jusqu'à obtention d'une absorbance d'environ 1 à 734 nm. Une solution mère de Trolox[®] à 98 % de pureté est réalisée à 5 mM dans le méthanol.

Mode opératoire

Le test est basé sur le protocole de **Re et al. (1999)** en y apportant quelques modifications.

Les mêmes tests préliminaires que ceux décrit dans le cas du test DPPH sont réalisés ici.

Dans un tube à hémolyse en verre, 30 µl d'extrait dilué (ou de méthanol) sont additionnés à 2970 µl de solution de travail d'ABTS^{•+}. L'absorbance est mesurée à **734 nm** après avoir incubé la réaction à l'obscurité pendant 1 h.

Droite d'étalonnage et expression des résultats

La courbe représentant le pourcentage d'activité AO, et l'expression générale des résultats sont déterminées sur le même mode que celui décrit pour le test DPPH.

IV.3 Test FRAP

Préparation des solutions

Dans un premier temps, une solution tampon acide acétique / acétate de sodium à 300 mM à pH = 3,6 est préparée.

Le réactif TPTZ à 10mM, dilué dans de l'HCl à 40 mM, est préparé extemporanément. Le deuxième réactif FeCl₃ à 20 mM est également préparé extemporanément.

Finalement, la solution de travail FRAP est réalisée en mélangeant 2,5 ml de solution TPTZ, 2,5 ml de solution FeCl₃ et 25 ml de solution tampon. Cette solution doit être impérativement conservée dans un bain à 37°C.

Mode opératoire

Le protocole qui suit est basé sur la méthode mise au point par **Benzie *et al.* (1996)**, qui a subi quelques modifications [**Pulido *et al.*, 2000**].

Le test consiste à mélanger, dans des tubes à hémolyse en verre, 100 µl d'extrait dilué (ou de méthanol) à 300 µl d'eau distillée puis à 3000 µl de solution de travail FRAP maintenue à 37 °C. L'absorbance est mesurée à **595 nm** après avoir laisser incuber la réaction dans un bain thermostaté à 37 °C à l'obscurité pendant exactement 30 minutes.

Droite d'étalonnage et expressions des résultats

La droite d'étalonnage est établie à partir des absorbances lues pour la gamme de solutions de sulfate ferreux heptahydraté utilisée comme composé de référence. Elle est de la forme : Abs = a×[Fe(II)] + b. Chaque extrait est testé, et l'absorbance qui en découle permet de déterminer sa concentration soit en µM d'équivalent Fe (II) en utilisant les formules suivantes :

$$\text{Concentration en } \mu\text{M d'Eq Fe(II)} = \frac{\text{Abs} - b}{a}$$

« a » représente la pente, « b » l'ordonnée à l'origine de la droite étalon.

En considérant ensuite la concentration de l'extrait étudié, on exprime alors l'AO soit directement en µM d'équivalent Fe (II) soit en µmol d'équivalent Fe (II) / g d'extrait sec et de matière sèche.

$$mg\ d'EqFe(II)/gd'\text{ extrait sec} = \frac{\text{Concentration en } \mu M\ d'EqFe(II) \times M_{FeSO_4 \cdot 7H_2O}}{\text{Concentration de l'extrait} \times 1000}$$

$$mg\ d'Eq\ Fe(II) / g\ de\ matière\ sèche = mM\ d'Eq\ Fe(II) \times Rdt$$

Application

Une droite d'étalonnage de sulfate de fer est réalisée pour des concentrations de 100 à 1.000 μM (Figure 38).

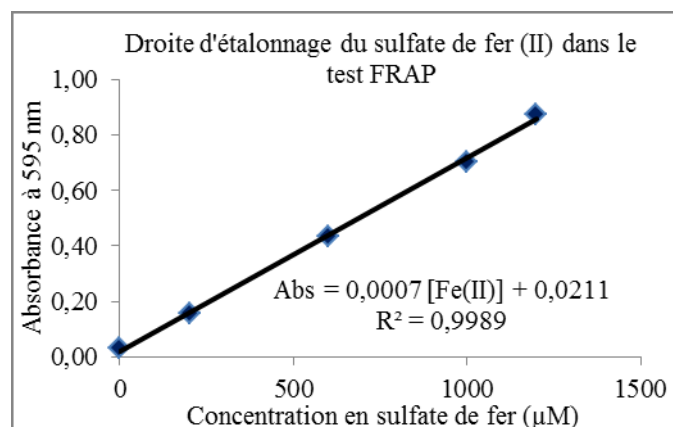


Figure 38 : Droite d'étalonnage du sulfate de fer (II) dans le test FRAP

	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Moyenne	σ
échantillon à tester (à 0,2 g/l)	0,545	0,630	0,610	0,594	0,040

La concentration de l'extrait en μM d'équivalent Fe(II) est de 818,4 soit 1133,5mg d'équivalent Fe (II) /g ES, soit avec un rendement d'extraction de 8,5 %, et une valeur finale et 96,4 mg d'équivalent Fe(II) /g MS.

IV.4 Test ORAC_{Fl}

Préparation des solutions à caractère hydrophile

Une solution mère de fluorescéine ou Fl_{Na} de travail à 1 mM (qui peut être conservée au congélateur) est préparée extemporanément dans une solution tampon phosphate à 75 mM et pH 7,4. Les solutions fille à 1 μM et petite-fille à 30 nM qui en découlent sont aussi réalisées dans la solution tampon phosphate.

La solution de 2,2'-azobis (2-méthyl-propionamide) dihydrochloride ou AAPH est fraîchement préparée avant l'injection dans un tube à hémolyse en y déposant 42,4 mg de poudre dans 1 ml de solution tampon phosphate.

Enfin, une solution mère tamponnée de Trolox[®] à 1 mM est réalisée.

Préparation des solutions à caractère amphiphile/lipophile

Une solution de β -cyclodextrinéméthylée (RMCD) (7 % (w/v)), et une solution de Trolox[®] sont préparées dans un mélange acétone/eau à 50 % (v/v). Une solution fille de Trolox[®] de 100 μ M à 20 % (v/v) est réalisée dans la solution de RMCD. Le mélange est ensuite mis sous agitation pendant 1 h à température ambiante, et à l'abri de la lumière pour le tracé de la droite d'étalonnage. Ces proportions seront, ensuite, conservées pour les études des extraits du mésocarpe du fruit du patawa. Les solutions de travail de Fl_{Na} et d'AAPH sont réalisées suivant le procédé décrit précédemment.

Mode opératoire

Le test ORAC_{FL} est appliqué aux extraits présentant un caractère hydrophile en suivant la méthode développée par **Ou et al. (2001)**. Il en existe une variante qui consiste à introduire la β -cyclodextrinéméthylée pour permettre la solubilisation d'antioxydants lipophiles en solution aqueuse par formation de complexes d'inclusion (Figure 39) [**Huang et al., 2002**].

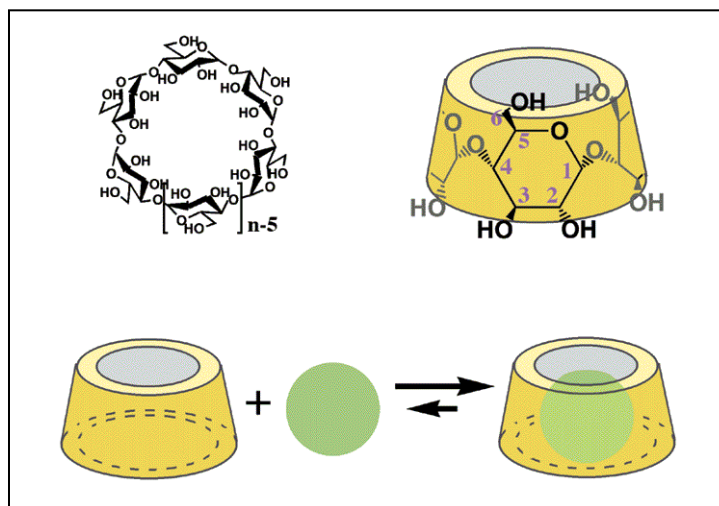


Figure 39 : Formation de complexes d'inclusion de cyclodextrines (α ($n = 6$), β ($n = 7$), γ ($n = 8$)) avec une molécule invitée

Le test consiste à mélanger, directement dans les cuves en verre, 200 µl d'extrait dilué ou de méthanol avec 2000 µl de solution Fl_{Na} . Les cuves sont alors placées dans le passeur d'échantillon sous agitation mécanique à 37°C. Deux cents µl de solution d'AAPH sont, ensuite, ajoutés au milieu pour déclencher la génération de radicaux libres. Une mesure de fluorescence ($\lambda_{excitation} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 520 \text{ nm}$) est effectuée toutes les minutes pendant 30 min.

Droite d'étalonnage, et expression des résultats

Chaque concentration d'échantillon génère une courbe cinétique différente. Ainsi, les aires sous les courbes de chaque échantillon reflétant les cinétiques de réaction sont-elles calculées avec la formule suivante :

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{29}/f_0 + f_{30}/f_0$$

avec f_0 = la fluorescence initiale lue à 0 min et f_i = la fluorescence lue au temps i

Le résultat est alors exprimé en aire nette (AUC_{nette}) que l'on obtient avec la formule suivante :

$$AUC \text{ nette} = AUC \text{ échantillon} - AUC \text{ blanc}$$

Il est donc possible de tracer une droite d'étalonnage de la forme à partir de solutions de Trolox[®] aux différentes concentrations. Elle a, alors, pour équation : $AUC \text{ nette} = a \times [Trolox^{\text{®}}] + b$.

« a » représente la pente et « b » l'ordonnée à l'origine de la régression linéaire.

Le calcul de l'activité AO d'un extrait d'une concentration donnée est également basé sur la détermination de son AUC nette. En reportant cette AUC_{net} sur la droite d'étalonnage du Trolox[®], le résultat peut finalement être exprimé en µmol d'équivalent Trolox[®] par gramme d'extrait sec et par gramme de matière sèche.

Application

Les aires sous les courbes de déclin de fluorescence de différentes concentrations de Trolox[®] permettent d'aboutir à une droite d'étalonnage de 0 à 100 µM (Figure 40).

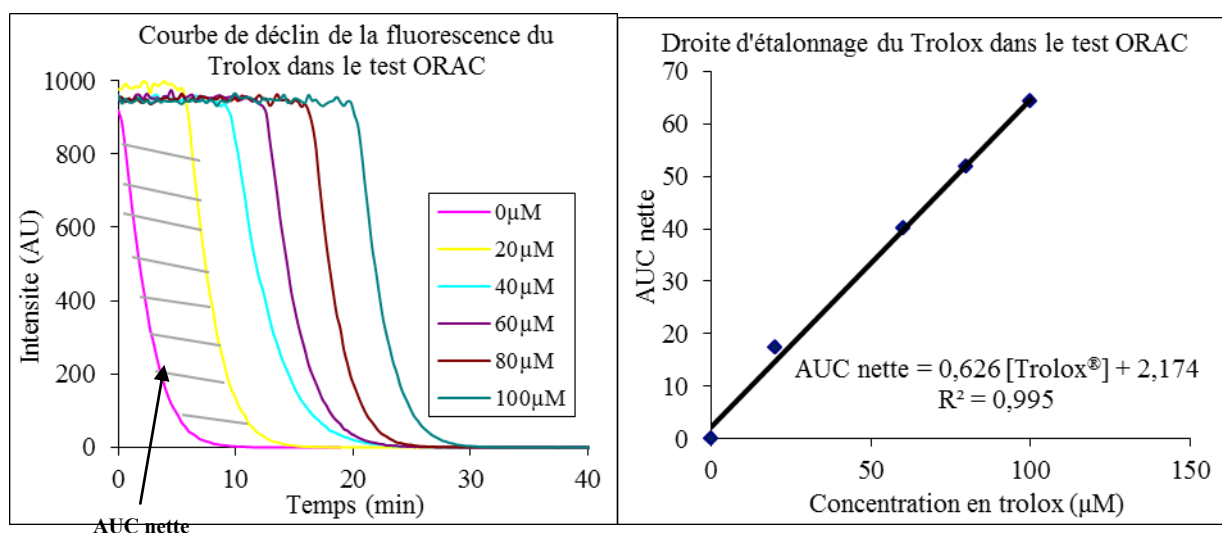


Figure 40: Courbes de déclin de fluorescence, et droite d'étalonnage du Trolox® dans le test ORAC

	Intensité fluorescente 1	Intensité fluorescente 2	Intensité fluorescente 3	Moyenne	σ
échantillon à tester	133,5	137,3	133,5	134,8	2,2

Il ressort de la droite d'étalonnage que l'AO équivaut à 1966,6 μM ET/g ES ou 492,2 mg ET /g ES soit 32,5 mg ET /g MS en considérant le rendement d'extraction.

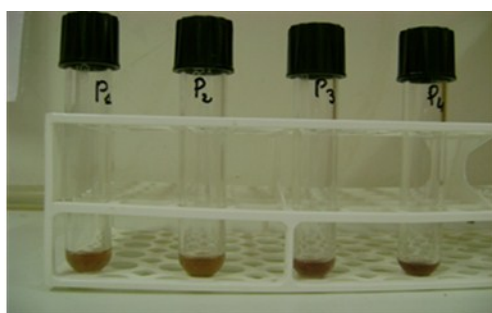
V Évaluation biologique de l'AO, *in vitro* par le test KRL

Un test antioxydant biologique a été utilisé dans cette étude car celui-ci possède la particularité d'évaluer la capacité antioxydante d'un composé en mettant en évidence plusieurs mécanismes réactionnels mobilisant les défenses enzymatiques et chimiques à des niveaux intra et extracellulaires.

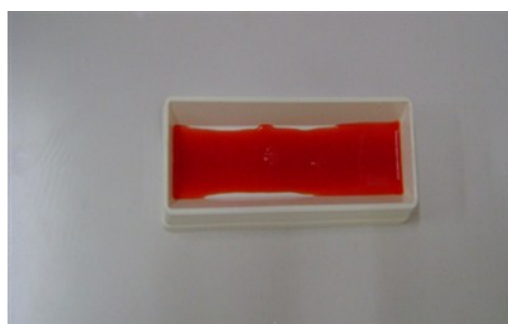
Ce test étant soumis à un brevet, certaines données ont été difficilement accessibles en raison de leur confidentialité [Blache et Prost, 1992]. Le réactif KRL (à base d'AAPH) est directement fourni par la filiale Kirial International des Laboratoires Spiral (Couternon, France) à une certaine concentration, et le sang témoin (sang de cheval) est distribué par Biomérieux. La solution tampon, fournie également par la filiale, est une solution de type phosphate (pH 7,4 et isotonique). Le test est réalisé sur des microplaques de 96 puits.

Mode opératoire

Cinquante µl de solution tampon isotonique KRL sont placés, en présence de 120 µl d'échantillon (ou de solution de référence (Trolox[®])), sur des puits sur microplaque avec 50 µl de sang total témoin, et 50 µl de réactif KRL pendant une nuit à T° = 37 °C, sous agitation orbitale spécifique. La lecture est effectuée à **620 nm**, afin de détecter la présence ou non d'un trouble lié à la suspension cellulaire sans influence de la couleur. La Figure 41 illustre les différentes étapes clés du test KRL.



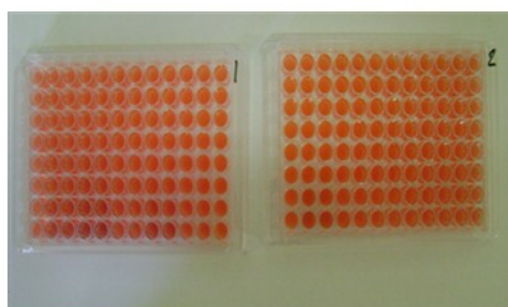
1 – Préparation des échantillons de l'épicaque
(P₁, P₂ = extraits méthanolique aqueux)
(P₃, P₄ = extraits acétonique aqueux)



2 – Dilution du sang total



3 – Dilutions préalable des échantillons à tester



4 – Dilutions finales des échantillons et ajouts des différents réactifs avant étape de cinétique

Figure 41 : Différentes étapes avant la mise en place du test KRL

Expressions des résultats

Le logiciel spécifique KRL (Kirial) permet de calculer le temps de demi-hémolyse à partir des courbes cinétiques (sigmoïdes) des absorbances établies pour une concentration donnée. La résistance des hématies due aux extraits ou au Trolox[®] est mesurée par rapport au témoin, et est exprimée en pourcentage selon la formule suivante.

$$\% \text{ Temps de demi – hémolyse} = \frac{\text{Temps de demi – hémolyse à } T_i - \text{Temps de demi – hémolyse à } T_0}{\text{Temps de demi – hémolyse à } T_0}$$

avec T_0 = le temps de demi-hémolyse lu pour le sang témoin, et T_i = le temps de demi-hémolyse lu aux concentrations i .

D'après l'expression précédente, il est ensuite possible de tracer la droite d'étalonnage, et de déterminer la zone de linéarité du test en fonction des différentes concentrations de Trolox[®]. Cette droite, représentant le pourcentage d'augmentation du temps de demi-hémolyse du sang témoin, est de la forme: % temps de demi-hémolyse = $a \times [\text{Trolox}^{\text{®}}]$ où « a » représente la pente de la régression linéaire.

L'activité AO de chaque extrait est basée sur le calcul de son % d'augmentation de temps de demi-hémolyse, et sur le report de cette valeur sur la droite d'étalonnage. Les résultats sont ensuite exprimés en μmol ou mg d'équivalent Trolox[®] par extrait sec ou matière sèche, comme dans les cas précédent.

Application

La gamme de Trolox[®] est tracée pour des concentrations comprises entre 0 et 1000 μM (Figure 42).

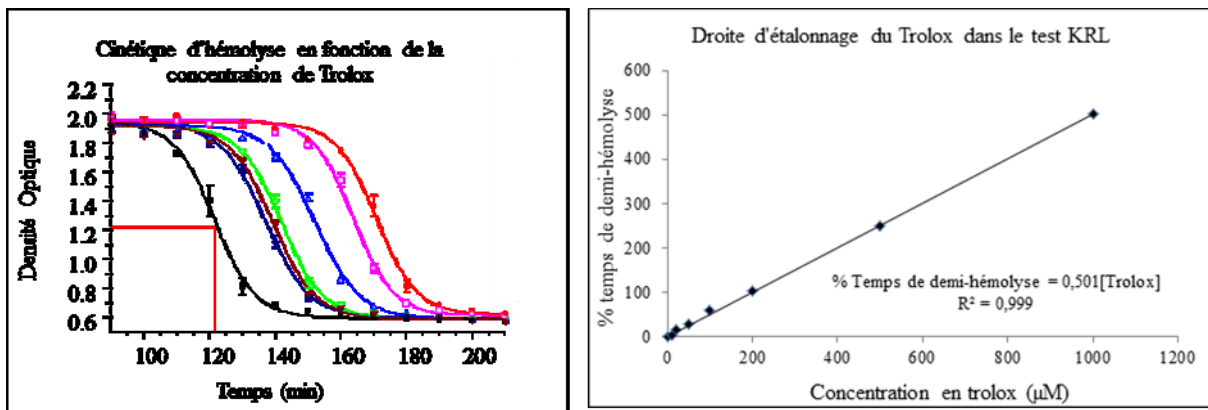


Figure 42 : Courbes d'hémolyse du sang témoin en présence de Trolox[®] et droite d'étalonnage correspondante

Pour un extrait placé à 0,1 g/l, le pourcentage d'augmentation du temps de demi-hémolyse calculé étant égal à 180,76, il en ressort qu'en considérant l'équation de la droite d'étalon, l'AO serait égale à 3727,7 μmol d'ET/g extrait sec, soit 194,8 μmol d'ET/g de matière sèche en considérant le rendement d'extraction de l'extrait testé.

Chapitre 3 : Résultats et Discussions

Lors de l'étape de préparation de l'échantillon, il nous est apparu relativement aisé de séparer les différents composants tissulaires du fruit l'épicarpe et le mésocarpe. C'est pourquoi, nous avons entrepris d'optimiser les conditions d'extractions de chacun de ces tissus afin trouver des conditions d'extraction optimale de la pulpe. Cette optimisation étant effectuée par l'évaluation de la quantité de polyphénols extraite, et du pouvoir antioxydant de l'extrait. Ainsi, les deux premiers chapitres traitent-ils séparément de l'étude de l'épicarpe et du mésocarpe, et ont fait l'objet d'une optimisation via des tests préliminaires afin de révéler les valeurs d'activité antioxydantes les plus significatives possibles. Ces conditions ont, ensuite, été utilisées dans l'étude du fruit entier, appelé ici Mélange Épicarpe Mésocarpe (MEM).

I Étude menée sur l'épicarpe de l'Oenocarpus bataua

I.1 Optimisation du procédé d'extraction par suivi de l'AO (Test DPPH)

L'étape d'extraction a fait l'objet d'une optimisation, et plusieurs paramètres ont été testés : la nature des solvants, la nécessité ou non d'un milieu acidifié (les polyphénols étant plus stables à pH acide) et/ou d'une étape de délipidation. Le choix des solvants a été orienté par de nombreuses études réalisées sur la recherche de conditions optimales d'extraction des polyphénols. L'emploi du solvant acétonique pur a été écarté en raison de sa faculté à précipiter les protéines. Ces dernières forment aussi des associations avec les flavonoïdes et plus particulièrement les tanins. L'emploi de l'acétone pourrait favoriser la diminution en tanins, et, donc, influencer sur l'activité antioxydante de l'échantillon [Yu et Dahlgren, 2000; Burns *et al.*, 2001].

Le but était d'observer l'impact de tous ces paramètres sur la valeur de l'activité antioxydante (AO) (mesurée par le test DPPH) et sur la quantité de polyphénols présents dans les extraits (déterminée grâce au test Folin-Ciocalteu). Le critère prépondérant de sélection des extraits dans notre étude étant cette première. Le choix particulier de tester l'AO par le test au DPPH a résidé dans la simplicité de mise en œuvre de la méthode et à sa bonne reproductibilité.

Les résultats obtenus sont conciliés dans le Tableau 20. Les valeurs relatives de la CI_{50} de chaque extrait ont alors été évaluées par rapport à celle déterminée dans le cas du Trolox[®], pour lequel une valeur de $5,3 \pm 0,3$ mg/l a été mesurée. On rappelle que la CI_{50} représente la quantité de réactifs nécessaire à l'inhibition de la moitié de la quantité initiale de radicaux présents.

Solvants d'extraction	Protocole suivi	Rendement d'extraction de matière sèche (%)	σ	CI ₅₀ (mg/l) DPPH	σ	[PT] (mg EAG/g ES)	σ
Eau	DI ^a	4,3	0,2	28,8	4,1	121,0	27,5
Eau pH = 2	DI	10,1	1,2	61,5	2,1	129,5	15,5
	SD ^b	6,9	1	27,3	3,8	152,8	14,8
MeOH	DI	6	0,3	29,0	3,8	119,4	9,2
MeOH pH = 2	DI	9	0,1	25,6	3,8	188,5	3,4
	SD	13,2	1,8	40,6	11,8	117,1	11,1
MeOH/Eau	DI	6,1	0,7	20,7	1,6	271,6	14,1
	SD	5,6	0,1	16,3	0,7	355,3	36,8
MeOH/Eau/pH = 2	DI	10,1	1,1	21,7	6,5	239,4	28,3
	SD	10,5	2,7	34,4	2,7	201,5	22,0
Ac/Eau	DI	6,8	1	22,4	0,8	251,1	12,5
	SD	6,4	0,1	12,5	0,9	291,9	24,8
Ac/Eau/pH = 2	DI	10	0,8	24,4	2,4	272,3	30,3
	SD	10,5	3,6	25,2	5,2	186,8	6,5

Tableau 20 : Optimisation du procédé d'extraction sur les extraits d'épicarpe d'*Oenocarpus bataua* Mart

a : DI : Délipidation Initiale et b : SD : Sans Délipidation.

Rendements d'extraction

On observe que les rendements d'extraction n'excèdent pas 11 %; les valeurs les plus élevées étant obtenues avec l'utilisation de solvants acidifiés. L'hydrolyse de liaisons intermoléculaires en milieu acide pourrait expliquer cette augmentation. [Liang et Xu, 2001]

Effet de la polarité du solvant sur l'AO lors de l'étape d'extraction

L'AO et la quantité de polyphénols d'un extrait sont des paramètres qui dépendent fortement des conditions opératoires de l'extraction, et en particulier de la nature et de la polarité du solvant.

- ✓ À pH neutre en présence d'une étape de délipidation

La Figure 43 montre que tous les extraits présentes une activité AO largement inférieure à celle du Trolox, référence de notre test. Les extraits réalisés avec de l'eau et du méthanol, présentent les

activités AO et les taux de polyphénols les plus faibles dans cette comparaison. Par contre, les extraits issus de solvants de polarité intermédiaire constitués par des solvants mixtes, possèdent les activités AO et les teneurs polyphénoliques légèrement supérieures.

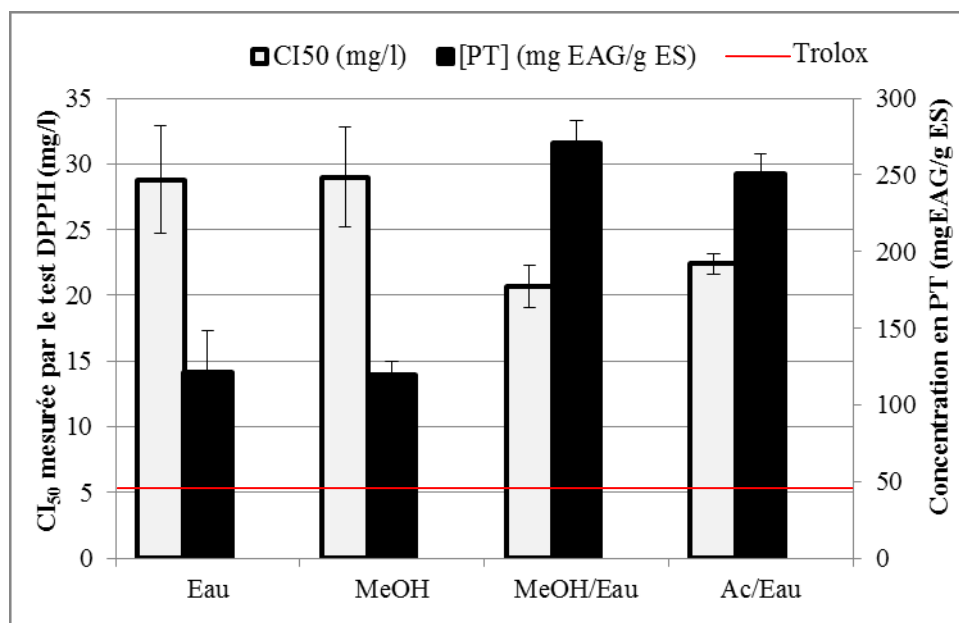


Figure 43 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PT d'extraits d'épicarpe en milieu neutre et avec une DI

Ces tendances sont en accord avec de nombreux résultats issus de la littérature, pour lesquels l'AO et la quantité de composés phénoliques ne sont pas favorisés dans le cas d'extraits utilisant des solvants purs, mais le sont par l'emploi de solvants mixtes. La présence d'eau dans ces derniers augmenterait la perméabilité des tissus végétaux et favoriserait le phénomène de diffusion de masse dans l'étape d'extraction [Moore *et al.*, 2000; Trabelsi *et al.*, 2010; Arimboor et Arumughan, 2011].

✓ À pH acide en présence d'une étape de délipidation

Dans ces conditions (Figure 44), l'acidification ne semble pas influencer l'activité AO. Tous les extraits présentent une capacité antioxydante équivalente. Les quantités polyphénoliques se situant autour de quelques dizaines de mg d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec.

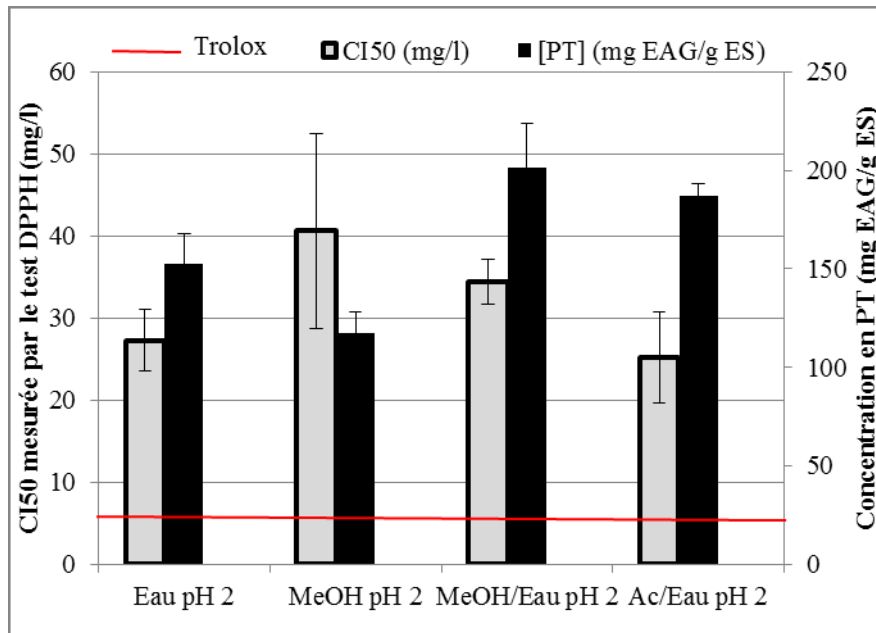


Figure 44 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PT d'extraits d'épicarpe en milieu acide et avec une DI

✓ À pH acide sans étape de délipidation

L'absence de délipidation a eu un effet positif sur l'activité AO pour les extraits aqueux et hydroacétonique (Figure 45), car ceux-ci présentent des valeurs de CI_{50} équivalentes. L'effet de ce paramètre sera étudié plus en détail dans la suite de chapitre.

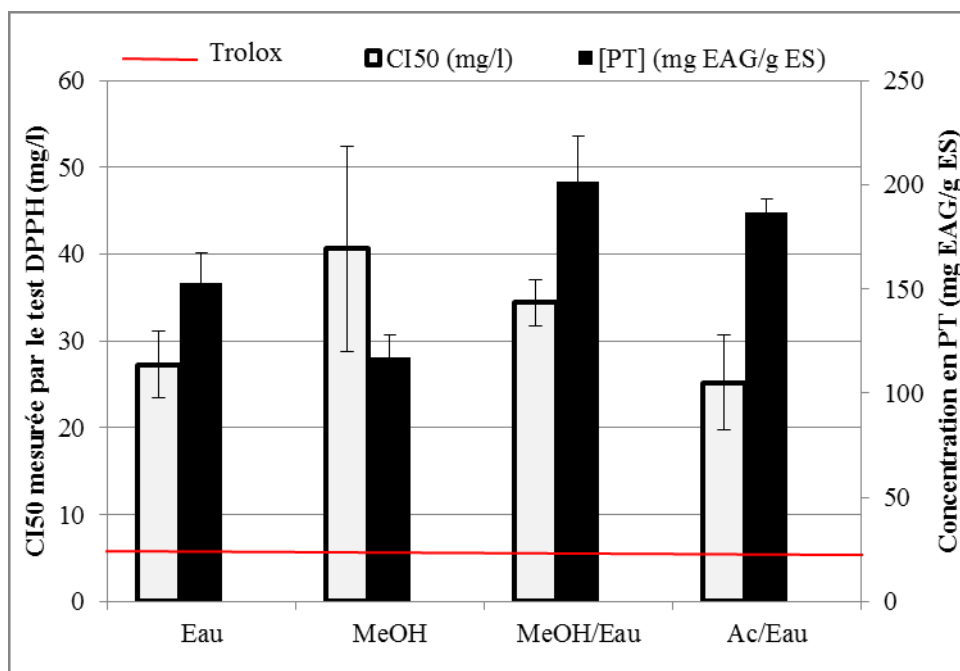


Figure 45 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PT d'extraits d'épicarpe en milieu acide et sans une DI

L'influence de la polarité du solvant dans un milieu acidifié (ou non), et en présence (ou non) d'une étape de délipidation met en évidence que l'utilisation de solvant mixte de polarité intermédiaire permet d'aboutir à une activité antioxydante significative si on la compare à celle du composé de référence testé.

Effet de l'acidité du milieu sur l'AO

Des histogrammes présentés dans la Figure 46, une tendance globale semble se dégager, l'acidification n'a pas les mêmes conséquences suivant le milieu d'extraction étudié. On note, pour l'extrait aqueux, une nette diminution de la capacité AO, et une constance de la teneur en polyphénols lorsque celui-ci est acidifié. Cependant, ceci ne semble pas s'appliquer à l'extrait méthanolique qui présente respectivement une activité AO et une teneur en polyphénols légèrement supérieure en milieu acide. De même, l'acidification n'a aucun effet significatif sur la teneur en polyphénols, et l'activité AO des mélanges binaires.

L'absence d'effet de l'acidification sur les AO dans le test DPPH peut s'expliquer par plusieurs hypothèses.

Il a été démontré qu'en milieu acidifié, la cinétique de transfert d'électron, et/ou de proton - mécanismes majeurs du piégeage des radicaux libres (et des réactions d'oxydo-réduction) - tend à diminuer fortement. La capacité de déprotonation des fonctions hydroxyles, en particulier pour un flavonoïde, serait alors diminuée, ce qui limiterait son rôle de donneur de proton et d'électron en milieu acide. Par exemple, la réactivité du 3- hydroxyflavone vis-à-vis du radical DPPH[•] dans le méthanol non acidifié est 100 fois plus importante que dans le méthanol acidifié, car ce dernier freine l'apparition de la forme énolate dérivé du groupement phénol en solution [Musialik *et al.*, 2009].

L'action des protons provenant de l'acidification pourrait également intervenir directement sur le radical en diminuant ainsi sa réactivité vis-à-vis des molécules potentiellement antioxydantes [Ozcelik *et al.*, 2003].

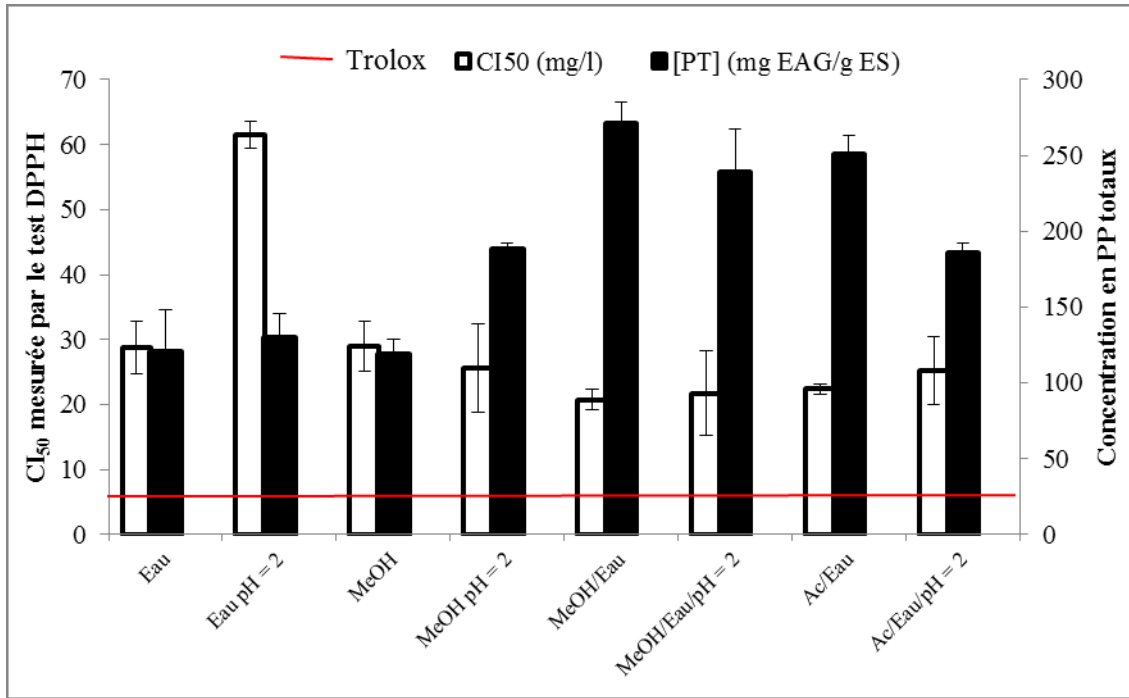


Figure 46 : Effet de l'acidification du milieu lors de l'étape d'extraction des PT d'extraits d'épicarpe

Effet de la délipidation sur l'AO

Si on considère les solvants de polarité voisine, l'élimination de composés de nature amphiphile et/ou lipophile traduite par l'étape de délipidation a un léger effet sur la valeur d'AO et la teneur en polyphénols des extraits étudiés (Figure 47). Tout particulièrement, dans le cas des extraits issus de solvants mixtes, l'AO a diminué en même temps que la valeur des polyphénols totaux. Des résultats similaires ont été observés lors de l'étude de l'AO sur la peroxydation des liposomes en présence d'extraits bruts et délipidés méthanoliques de feuilles, d'écorce et de fruits du *Laurus nobilis* [Simic *et al.*, 2003].

L'étape de délipidation entraînerait une perte de molécules liposolubles présentant des propriétés antioxydantes : des polyphénols, mais vraisemblablement aussi des molécules comme les vitamines E et A présentant un caractère amphiphile et/ou lipophile.

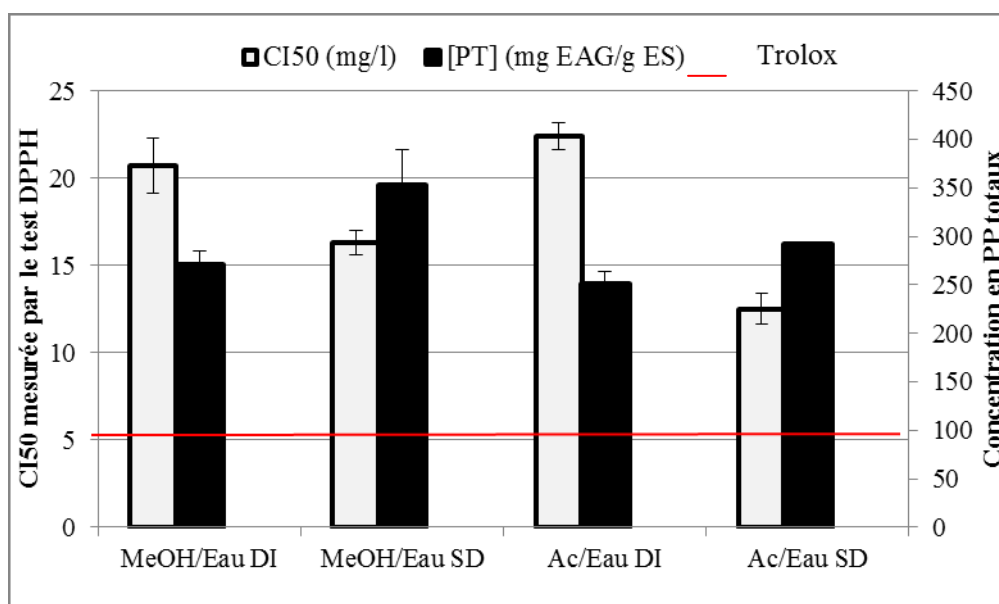


Figure 47 : Effet de la délipidation lors de l'étape d'extraction des PT d'extrait d'épicarpe

I.2 Sélection des conditions optimales d'extractions

L'étude précédente a permis de rechercher les conditions optimales d'extraction permettant d'obtenir des extraits cellulaires les plus fortement AO. Elles se caractérisent par une utilisation de **solvants mixtes acétone/eau et méthanol/eau, une absence de délipidation et d'acidification du milieu** dont les valeurs de CI_{50} sont respectivement $12,5 \pm 0,9$ et $16,3 \pm 0,7$ mg/l. Ces résultats vont dans le sens des résultats obtenus par des travaux de recherche traitant aussi de l'influence des conditions expérimentales lors de l'extraction de polyphénols. nombreux travaux issus de la littérature traitant ce sujet [Kim *et al.*, 2007; Gonzalez-Montelongo *et al.*, 2010].

Les extraits obtenus dans ces deux conditions se révèlent fort intéressants puisque ces derniers présentent une CI_{50} seulement deux fois supérieures à celle obtenue pour une solution contenant une molécule pure comme notre référence : le Trolox® ($CI_{50} = 5,3 \pm 0,3$ mg/l).

L'étude a donc été poursuivie sur la base de ces deux conditions. Notamment, par la recherche d'une meilleure évaluation du caractère antioxydante, des extraits obtenus, par l'utilisation d'autres tests d'activité AO et de leurs compositions en polyphénols en utilisant différents tests de dosages de certaines familles.

I.3 Autres évaluations du pouvoir antioxydant des extraits sélectionnés pour l'épicarpe d'*Oenocarpus bataua* Mart.

I.3.1 Étude comparée de l'activité antioxydante *in vitro* par tests chimiques

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire [Cao et Prior, 1998].

Nous avons fait le choix d'exprimer les résultats de façon homogène pour cette étude comparative : autrement dit, en mg d'équivalent d'un antioxydant (choisi comme référence) par gramme de matière sèche. La valeur la plus élevée correspondra à l'activité la plus forte. Les tests TEAC, FRAP et ORAC étant exprimés en fonction du Trolox[®], le test FRAP utilisant le Fe (II) comme référence.

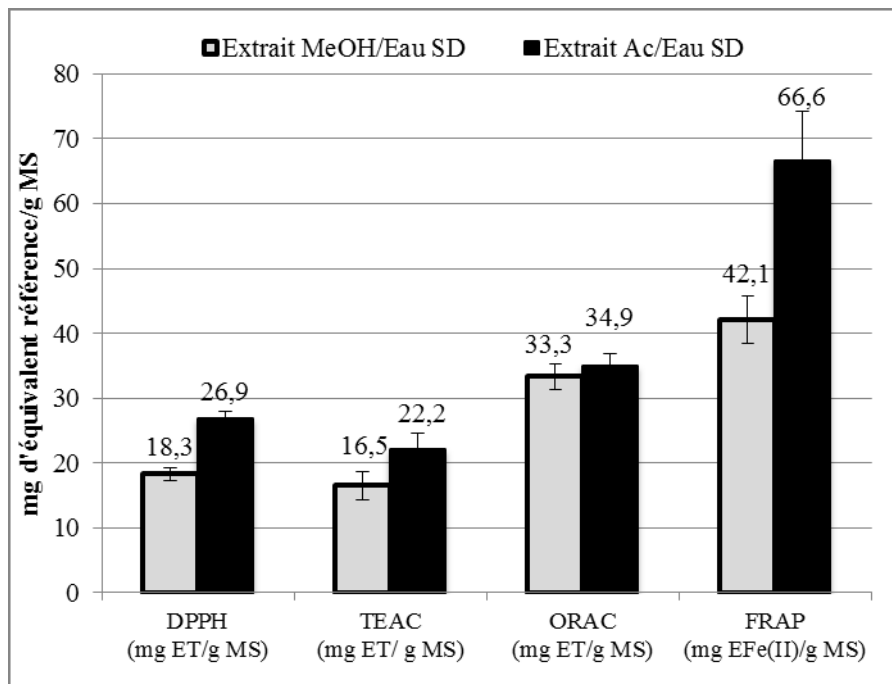


Figure 48 : Étude comparée de l'activité antioxydante des extraits d'intérêt issus de l'épicarpe de l'*Oenocarpus bataua*

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 48. On observe que, quel que soit le test antioxydant utilisé, l'extrait élaboré avec le solvant mixte Acétone/eau présente une activité réductrice légèrement meilleure voir égale dans le cas du test ORAC compte tenu des incertitudes.

Cette différence est beaucoup plus marquée dans le cas du test FRAP, témoignant vraisemblablement de la présence de molécules antioxydantes pouvant participer à un autre type de mécanisme réactionnel.

En effet, si on s'intéresse aux mécanismes réactionnels de chaque test utilisé, on note que les réactions mis en jeu peuvent différer d'un test à l'autre. L'ORAC est considéré actuellement comme le test chimique de mesure d'activité antioxydante le plus pertinent, puisque celui-ci est un test dynamique basé sur un stress induit par des radicaux peroxylys se rapprochant des mécanismes cellulaires induits par ces derniers. Cependant, il ne tient pas compte de l'action des biomolécules antioxydantes sur les défenses intracellulaires. Les 3 autres tests chimiques, FRAP, TEAC et DPPH, sont basés uniquement sur des mécanismes réactionnels chimiques. Tantôt, il s'agit d'une réduction pour le FRAP, tantôt d'un transfert d'électron pour le DPPH, ou encore d'un transfert d'électron et de proton pour le TEAC [Prior *et al.*, 2005; Seeram *et al.*, 2008].

A ce titre, dans le cas des extraits hydroacétoniques, on pourrait penser que le mécanisme supplémentaire soit un mécanisme de réduction. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'acétone extrairait des molécules dont les propriétés oxydantes seraient plus importantes que dans le cas d'un solvant méthanolique. En effet, de nombreuses études réalisées sur l'extraction de molécules à caractère antioxydant montrent, de façon générale, que des extraits de végétaux issus de solvant acétonique favorisent une plus grande libération de composés bioactifs [Ajila *et al.*, 2010; Gonzalez-Montelongo *et al.*, 2010; Wallace et Giusti, 2010; Bettaieb Rebey *et al.*, 2011]. Par comparaison, les valeurs d'AO recueillies sur 45 plantes médicinales chinoises étaient supérieures avec un extrait acétonique pour 36 et 37 de ces plantes avec respectivement les méthodes TEAC et FRAP [Li *et al.*, 2008].

Si les valeurs d'activité antioxydante sont exprimées en μmol équivalent Trolox[®] /g de matière fraîche, nous pouvons alors les comparer avec celles d'autres fruits tropicaux comme, par exemple la goyave. Avec 30 % de perte d'eau en moyenne lors de la dessiccation, la valeur d'AO de l'extrait de l'épicarpe acétonique en DPPH devient 78,4 μmol ET/g MF. Cette valeur calculée est environ deux fois supérieure à celle des quatre génotypes de goyave testés [Thaipong *et al.*, 2006].

I.3.2 Évaluation de l'activité antioxydante par un test biologique

Au cours de nos travaux, dans un souci de comparaison des différents tests antioxydants existants, nous avons opté pour le test biologique KRL. Ce dernier reflète au mieux les mécanismes d'action des biomolécules au niveau du système complexe de défenses antioxydantes d'un milieu physiologique comme le sang. Il est le seul test à pouvoir évaluer la globalité du système de défenses enzymatiques et chimiques, à la fois intracellulaires et extracellulaires, d'un sang soumis à un stress radicalaire normalisé. Contrairement à la plupart des autres tests, le test KRL est un test dynamique dont la durée est suffisamment longue pour que l'ensemble des mécanismes chimiques et enzymatiques de défenses puissent agir.

Des conditions opératoires standardisées de préparation des échantillons pour le test KRL ont été mises au point. Chaque extrait a été séché, puis dissout à 0,2 % (w/v) dans de l'éthanol, et finalement dans le tampon PBS isotonique avant l'essai.

Les résultats obtenus sur les deux extraits sélectionnés sont présentés dans la Figure 49. Nous observons que l'extrait hydroacétonique présente une AO près de deux fois supérieure à celle de l'extrait hydrométhanolique. Cela signifie que cet extrait a la capacité de protéger deux fois plus les cellules sanguines d'un stress oxydant que l'extrait hydrométhanolique. Plus précisément, ces extraits devraient donc avoir une plus grande faculté à franchir la membrane plasmique des cellules afin de réduire les dommages causés par l'attaque radicalaire sur les érythrocytes [Jensen *et al.*, 2008]. Niki *et al* (1988) ont étudié les phénomènes d'oxydation des érythrocytes et ont mis en évidence que lors de l'attaque radicalaire causée par la décomposition thermique de l'AAPH, l'acide ascorbique et l'acide urique présents dans la phase aqueuse (le plasma) jouaient le rôle de piègeurs de radicaux, puis l' α -tocophérol positionné au niveau de la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire agissait majoritairement sur ces molécules réactives. Ces deux extraits étant constitués d'une quantité équivalente de composés polyphénoliques, les résultats décrits précédemment pourraient aussi suggérer que dans l'extrait hydroacétonique, d'autres composés que les polyphénols agiraient notablement sur l'évaluation de l'activité AO.

Ces résultats viennent alors corroborer les résultats d'activité AO précédents.

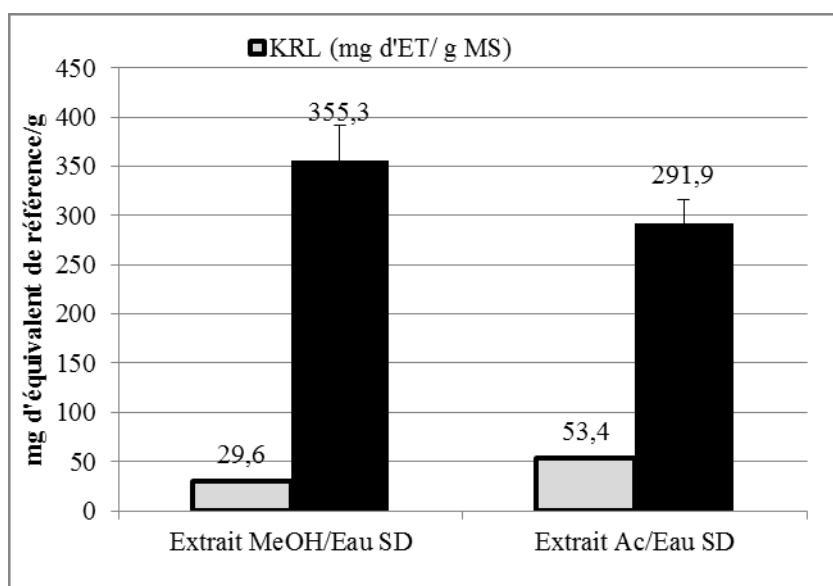


Figure 49 : Comparaison de l'activité antioxydante et des PT des extraits d'intérêt de l'épicarpe avec le test KRL

I.4 Dosages des polyphénols dans l'épicarpe d'*Oenocarpus bataua*

Le dosage des familles et sous-familles (présenté en Figure 50) de composés phénoliques issus des extraits de l'épicarpe montrent que l'extrait hydroacétonique est celui qui contient la plus grande proportion de flavonoïdes et de composés proanthocyanidines, alors que la fraction aqueuse méthanolique contient plus d'anthocyanes monomères. Si cette dernière est convertie en matière fraîche, celle-ci peut être comparée à la valeur déterminée d'anthocyanes monomère totaux dans le cas d'extraits de fraises. Il en ressort que la teneur d'AMT pour la fraction hydrométhanolique de l'épicarpe devient $47,6 \pm 4,6$ mg EC3G/g MF et est quasiment équivalente à celle mesurée par **Liu et al. (2011)** qui est de $42,2 \pm 0,3$ mg EC3G/g MF dans la fraise. La proportion des polyphénols totaux étant voisine dans les deux cas.

Ces observations semblent confirmer les résultats précédents puisqu'ils laissent penser que les deux extraits présenteraient des compositions polyphénoliques différentes en quantité et, peut-être aussi, en nature. Néanmoins, le dosage des polyphénols totaux par le test Folin-Ciocalteu implique que toutes les molécules réductrices comme les sucres réducteurs ou la vitamine C, sont dosées, ce qui par conséquent rend ce dosage non sélectif vis-à-vis des polyphénols en surestimant les valeurs obtenues [**Fukushima et al., 2009**].

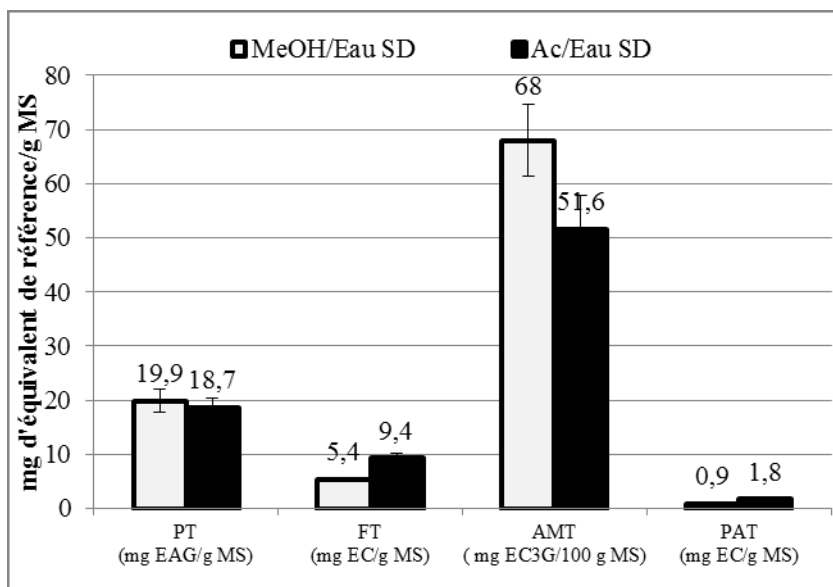


Figure 50 : Étude comparée des teneurs polyphénoliques d'extraits de l'épicarpe

À l'issue des résultats des tests de capacité antioxydante et de dosages des différents composés phénoliques, des analyses chromatographiques qualitatives ont été envisagées. Elles ont donc été menées sur l'extrait acétone/eau le plus AO.

I.5 Investigations chromatographiques par HPLC de l'extrait bruthydroacétonique de l'épicarpe

I.5.1 Analyses qualitatives de l'extrait acétonique de l'épicarpe

Les conditions expérimentales utilisées lors des analyses chromatographiques permettent d'envisager un ordre d'éluion possible des composés polyphénoliques. Les composés les plus polaires sont moins retenus par la colonne C18 alors que ceux possédant un caractère apolaire se verraient plus retenus par celle-ci. L'ordre d'éluion des molécules étant aussi déterminé par la nature et le gradient des solvants utilisés.

On peut donc envisager que pour un solvant d'éluion tel que l'acétonitrile les premiers constituants à être élués soient : les acides hydroxybenzoïques, suivis des flavan-3-ols, des acides hydroxycinnamiques, des coumarines, des flavanones, des dihydrochalcones, des flavonols et des flavones. Si les polyphénols devaient contenir des groupements apolaires (groupement méthoxy

par exemple), ils seraient alors plus retenus par la phase stationnaire. S'ils devaient posséder des sucres, ils seraient alors élués avant leur forme aglycone. Et enfin, dans le cas d'une acétylation éventuelle du sucre, les temps de rétention seraient alors augmentés [Abad-Garcia *et al.*, 2009].

Le profil d'éluion des composés issus de l'extrait a été suivi à 280 nm, longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques. En effet, tous les phénols sont détectés dans la région des ultra-violets avec un pic d'absorption maximum à 280 nm du à la présence du cycle phénolique. Le cycle B présent dans les différentes classes de flavonoïdes est caractérisé généralement par un pic d'absorption qui se situe dans un intervalle de mesure compris entre 300 et 380 nm, exception faite pour les anthocyanes dont le cycle B présente un maximum d'absorption entre 460 et 560 nm. Le Tableau 21 concilie les différentes longueurs d'onde généralement utilisées dans le cas de l'étude des composés phénoliques [Merken et Beecher, 2000; Stecher *et al.*, 2001; Robbins, 2003].

C'est la raison pour laquelle les chromatogrammes aux longueurs caractéristiques de 320,360 et 520 nm ont été aussi analysés (Figure 51).

Classes de composés phénoliques	λ_{\max} (nm)
Acide hydroxybenzoïque	280
Acide hydroxycinnamique	280, 320
Stilbène	280, 320
Flavanol	280
Dihydrochalcone	280
Flavonone	280
Flavone	280, 360
Isoflavone	280
Flavonol	280, 360
Isoflavone	280
Anthocyane	280, 520
Tanins	280

Tableau 21 : Longueurs d'onde utilisées dans l'étude des composés phénoliques

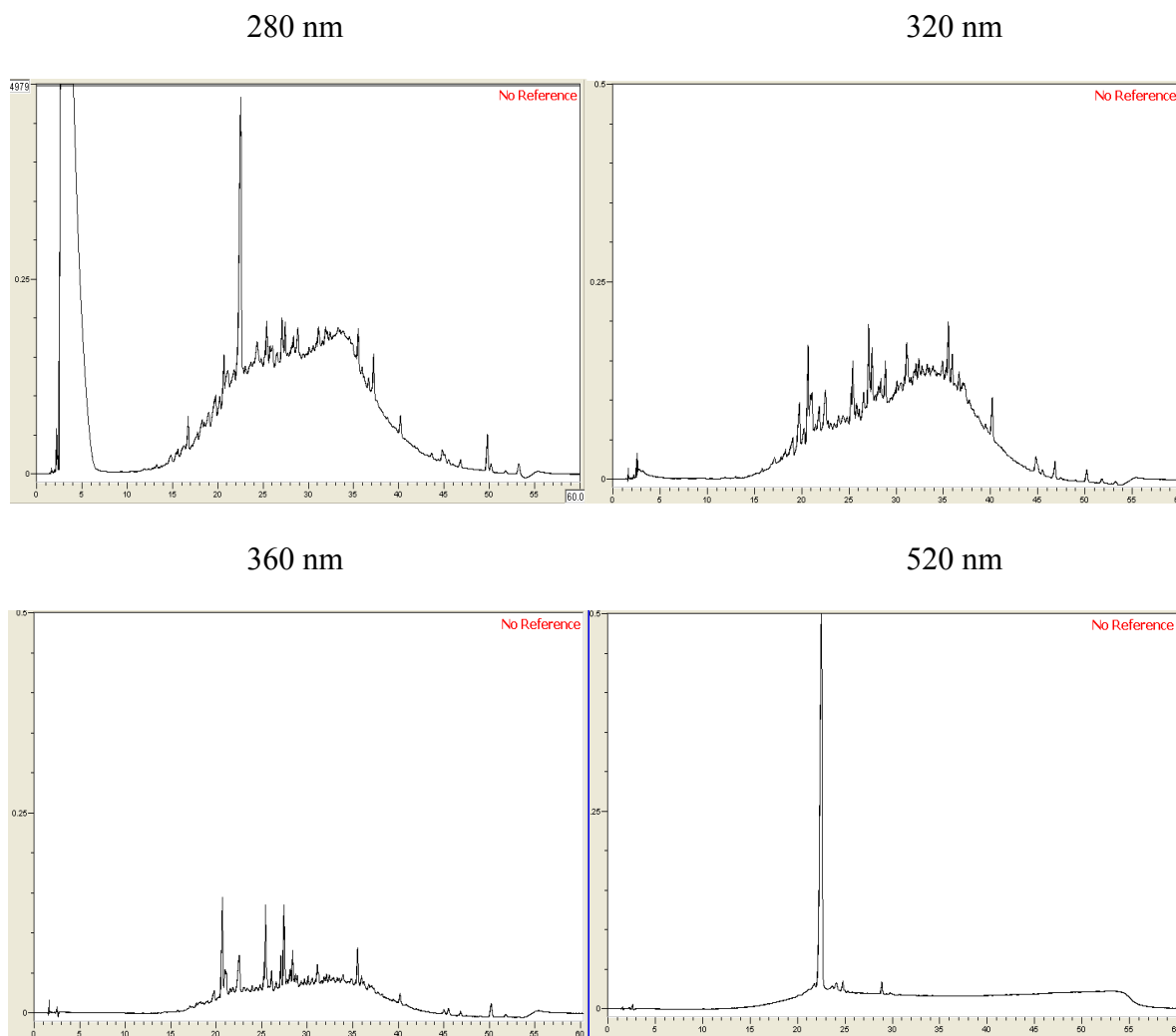


Figure 51 : Chromatogrammes de l'extrait hydroacétonique de l'épicarpe à différentes longueurs d'onde

De ces chromatogrammes, il ressort que le spectre de l'extrait brut à 280 nm est très fourni et assez peu résolu, rendant ainsi la comparaison des spectres aux différentes longueurs d'onde relativement difficile. Le profil d'élution à 280 nm se caractérise par une forte augmentation de la ligne de base sur la majeure partie du chromatogramme. Cette dérive de la ligne de base montre une impossibilité du système chromatographique à séparer les molécules présentes, montrant aussi une forte hétérogénéité en nombre et en composition de l'extrait, puisque cette dérive s'étend sur plus de 30 minutes sur un chromatogramme qui en compte 60.

Ce type de comportement chromatographique traduit souvent la présence de tanins condensés, sous famille très hétérogène de polyphénols très présente dans le règne végétal. On parle alors de bosse des tanins [Lantto *et al.*, 2009]. Ainsi, la méthode d'identification par chromatographie vient-elle confirmer les premiers résultats obtenus par dosages spectrophotométriques UV-Visible.

De plus, la présence de pics marqués tout au long de cette bosse suggère que d'autres polyphénols seraient par instant co-élus avec ces composés provoquant une augmentation de la densité optique. Ils nous permettent d'envisager la présence de différentes sous- familles polyphénoliques dans l'extrait. Ce que confirme la comparaison entre les chromatogrammes à 320, 360 et 520 nm. On note la présence de très nombreux pics et du massif des tanins au niveau du chromatogramme extrait à 320 nm, laissant suspecter une forte présence d'acides phénoliques et de leurs polymères d'acide hydroxycinnamiques et de stilbènes.

La comparaison des deux chromatogrammes à 280 et à 320 nm montre que ceux-ci sont pratiquement identiques. Compte tenu des intensités maximales observées et de la différence entre les deux longueurs d'ondes (40 nm) il est peu plausible que le chromatogramme à 320 nm soit celui d'une molécule ou d'un groupe de molécules dont la longueur d'onde à 320nm serait située dans la seconde partie de son spectre UV-visible et dont le maximum d'absorption se situerait à 280 nm. Il est plus vraisemblable que ces deux chromatogrammes à 280 et 320 nm correspondent à ceux d'une molécule ou d'un groupe de molécules dont les maxima d'absorption se situeraient à ces deux longueurs d'onde. L'ensemble de ces observations nous amène donc à suspecter dans ce cas la présence de tanins dits hydrolysables si cette bosse est bien une bosse de tanins.

La présence de quelques pics majoritaires à 360 nm laisserait supposer l'existence de flavonols et de flavones, bien que cette dernière famille appartienne aux flavonoïdes les moins rencontrés dans le monde végétal. Enfin, un pic très marqué à 520 nm suggère la possible présence de composés anthocyaniques dans l'extrait ; résultat préalablement mis en évidence par le dosage des anthocyanes monomères totaux.

Cette première analyse qualitative a été affinée par surcharge de témoins commerciaux en utilisant plusieurs acides phénoliques et flavonoïdes de différentes natures. Les temps de rétention et les longueurs d'onde correspondant aux maxima sont consignés dans le Tableau 22. La superposition des chromatogrammes à 280 nm illustrée à la Figure 52, et la comparaison du pic cible à celui du témoin, ne nous a permis que de suspecter la présence éventuelle de deux composés : l'acide chlorogénique et quercétine 3-*O*-glucoside (Figure 53).

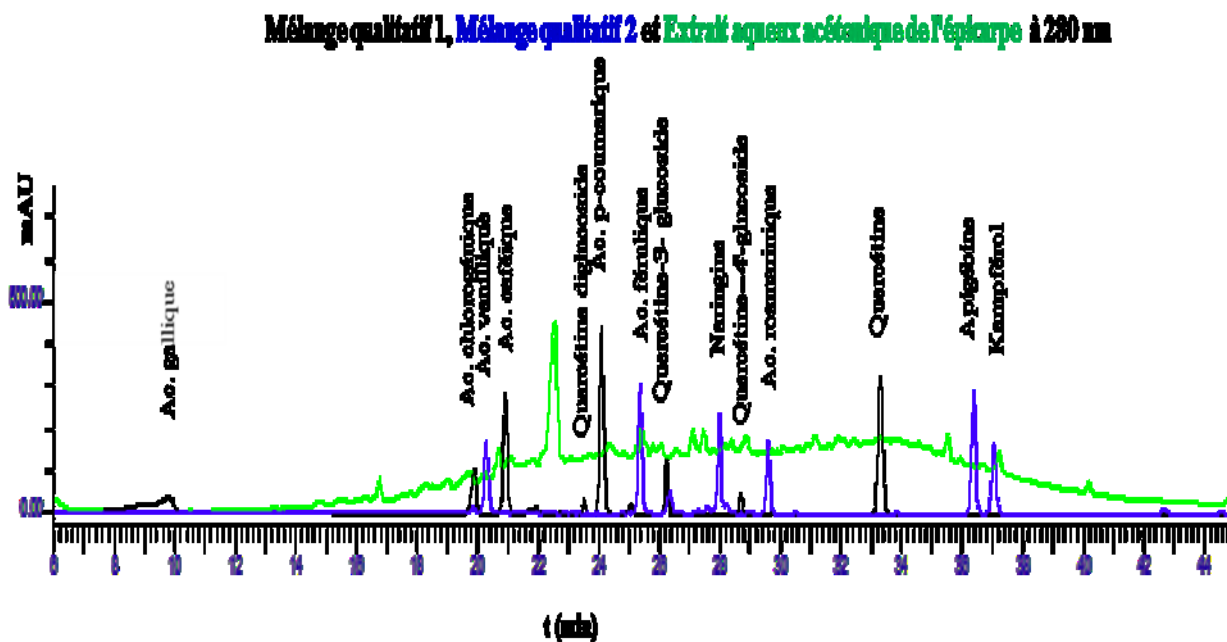


Figure 52 : Superpositions des chromatogrammes de l'extrait brut d'épicarpe et des mélanges qualitatifs à 280nm

Composés phénoliques testés	Famille (poly)phénolique	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Présence potentielle des composés dans l'extrait brut (comparaison des Tr et des spectres UV)
Acide gallique	Acide hydroxybenzoïque	9,46	280	non
Catéchine	Flavanol	19,45	280	non
Acide chlorogénique	Acide hydroxycinnamique	19,71	280, 345	oui
Acide vanillique	Acide hydroxybenzoïque	20,09	280	non
Acide caféique	Acide hydroxycinnamique	20,69	280, 345	non
Quercétinediglucooside	Flavanol	23,31	280, 345	non
Acide p-coumarique	Acide hydroxycinnamique	23,87	280, 345	non
Acide férulique	Acide hydroxycinnamique	25,18	280, 345	non
Rutine	Flavanol	25,44	280, 345	non
Quercétine 3- O-glucoside	Flavanol	26,1	280, 345	oui
Naringine	Flavanone	27,85	280, 345	non
Quercétine-4'-glucoside	Flavanol	28,45	280, 345	non
Acide rosmarinique	Acide hydroxycinnamique	29,53	280, 345	non
Quercétine	Flavanol	33,07	280, 345	non
Apigénine	Flavone	36,17	280, 345	non
Kaempférol	Flavanol	36,82	280, 345	non

Tableau 22 : Étude comparative des temps de rétention et des spectres UV-visibles entre l'extrait brut d'épicarpe et les mélanges qualitatifs

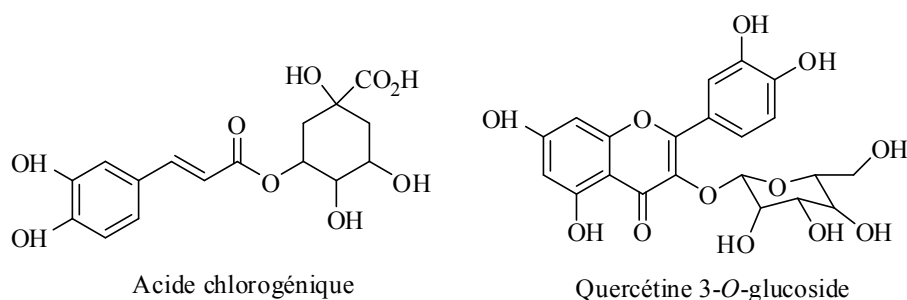


Figure 53 : Structures chimiques de l'acide chlorogénique et de la quercétine 3-O-glucoside

I.6 Conclusion

L'optimisation du protocole d'extraction des polyphénols de l'épicarpe du patawa a montré que, lorsque les extraits étaient élaborés avec des solvants mixtes (de type acétone/eau ou méthanol/eau) sans étape de délipidation, ceux-ci présentaient les meilleures activités antioxydantes au regard du test DPPH. Lorsque ces mêmes extraits sont comparés à l'aide d'autres méthodes de mesure de la capacité antioxydante, qu'elles soient chimiques et/ou biologiques, l'extrait acétonique a démontré le pouvoir antioxydant le plus élevé dû, très certainement, à la capacité de ce solvant à extraire plus de molécules présentant un caractère AO.

L'extrait brut de l'épicarpe s'est révélé complexe, et la présence de toutes les grandes familles de composés phénoliques a été fortement suspectée : les acides phénoliques, les stilbènes, les flavonols, les anthocyanes et les tanins, composés naturellement présents dans les plantes et les fruits et connus pour leurs effets biologiques importants [Han *et al.*, 2007; de Pascual-Teresa *et al.*, 2010].

Toutefois, si au cours de ce travail, il n'a pas été possible de corrélérer l'activité AO mesurée par la présence de polyphénols, nous avons tout de même pu évaluer leur présence par dosage et/ou par spectroscopie. C'est le cas des tanins et des anthocyanes. De même, des hypothèses fortes nous ont poussés à envisager la présence de deux polyphénols présentant un fort pouvoir AO.

Le premier est l'acide chlorogénique appartenant à la famille des acides phénoliques. Il est considéré comme étant un des composés les plus répons dans le règne végétal, puisqu'on le retrouve en grande quantité dans la pomme, la prune ou encore le café et est très étudié pour ses effets antioxydants *in vitro*. [Clifford, 2000; Chun *et al.*, 2003]. Il a également été identifié dans la datte, autre fruit de palmier très apprécié [Karasawa *et al.*, 2011]. Le deuxième composé est la

quercétine 3-*O*- glucoside appartenant à la classe des flavonols. Il possède de nombreuses propriétés biologiques, avec notamment un effet antioxydant important lorsqu'il est testé vis-à-vis du test DPPH [**Razavi *et al.*, 2009**].

La complexité de l'extrait brut ne nous a pas permis de faire une analyse efficiente des différents composés. Ainsi, des études postérieures permettant une purification des composés (fractionnement) devront-elles être réalisées afin de confirmer les premiers résultats obtenus et d'approfondir les élucidations structurales commencées au moyen d'autres techniques analytiques et d'autres tests permettant la localisation et la détermination des sucres présents (LC/MS, RMN).

II Étude menée sur le mésocarpe de l'*Oenocarpus bataua*

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes donc intéressés à l'évaluation du potentiel antioxydant du mésocarpe à travers différents tests. Les résultats obtenus nous ont ensuite amenés à déterminer l'extrait d'intérêt par bioguidage, et à mener, en parallèle, quelques investigations d'un point de vue structural par chromatographie.

II.1 Optimisation du procédé d'extraction par suivi de l'AO (Test DPPH)

Dans le but d'optimiser le potentiel antioxydant des extraits, nous avons réalisé l'extraction des polyphénols du mésocarpe du patawa en modifiant plusieurs paramètres expérimentaux, comme le pH, la polarité du solvant et l'étape de délipidation. **L'activité antioxydante étant suivie par le test DPPH et le dosage des polyphénols totaux (PT) par le dosage Folin-Ciocalteu.** Les résultats obtenus sont conciliés dans le Tableau 23 :

Solvants d'extraction	Protocole suivi	Rendement d'extraction de matière sèche (%)	σ	CI ₅₀ (mg/l) DPPH	σ	[PT] (mg EAG/g ES)	σ
Eau	DI	15,8	1,1	37,5	10,5	61,2	10,2
Eau pH = 2	DI	18,3	0,3	16,4	3,0	270,5	40,6
	SD	14	0,4	8,2	0,4	243,0	26,1
MeOH	DI	19,7	0,4	10,0	0,9	210,2	29,1
MeOH pH = 2	DI	27,6	1,3	13,7	0,7	268,5	13,8
	SD	68,9	32,7	25,3	7,7	81,4	34,6
MeOH/Eau	DI	12,6	1,0	6,0	0,6	350,6	17,7
	SD	12,8	0,3	7,1	0,5	475,9	16,3
MeOH /Eau/pH = 2	DI	21,0	0,7	12,0	0,4	357,8	11,6
	SD	20,1	0,5	13,6	3,9	293,3	39,7
Ac/Eau	DI	16,6	1,2	5,8	0,5	324,8	39,7
	SD	17,5	0,5	7,3	0,7	410,8	37,6
Ac/Eau/pH = 2	DI	22	4,5	15,6	0,2	266,3	9,0
	SD	28,8	10,7	7,9	0,4	306,0	6,3

Tableau 23 : Optimisation du procédé d'extraction sur les extraits de mésocarpe d'*Oenocarpusbataua*Mart

Tout comme l'étude de l'épicarpe, la comparaison de paramètres clés ayant une influence sur l'activité AO ont permis de statuer sur les meilleures conditions d'extraction du mésocarpe. Ainsi, le rendement d'extraction, et l'effet de la polarité du solvant, de l'acidité du milieu et de l'étape de délipidation sur la teneur en polyphénols et l'activité AO ont-ils été analysés.

Rendements d'extraction

Les rendements obtenus sont très variables (Tableau 23), puisque les rendements en matière sèche sont compris entre 15 et 30 %. Le rendement le plus important est obtenu pour le solvant méthanol acidifié avec une valeur calculée de près de 70 %, avec, cependant, un écart type très important rendant cette valeur significativement plus proche des 30 %.

L'absence de délipidation tend à augmenter le rendement d'extraction des biomolécules actives, en même temps que l'écart type. Ce résultat confirme que ce tissu végétal compte de nombreux composés apolaires.

Si on compare les extraits délipidés, ou non, on observe que l'acidification tend à augmenter le rendement d'extraction en raison des liaisons rompues par hydrolyse acide et par la libération d'autres composés endogènes du tissu [Vuong *et al.*, 2011].

Effet de la polarité du solvant lors de l'étape d'extraction

- ✓ À pH neutre en présence d'une étape de délipidation

A pH neutre, les valeurs d'AO les plus remarquables sont obtenues pour les extraits de polarité moyenne, c'est-à-dire pour les solvants mixtes Ac/Eau et MeOH/Eau (Figure 54). Les valeurs des CI_{50} mesurées pour ces extraits sont identiques à l'incertitude près de celle du Trolox[®] (CI_{50} du Trolox[®] de $5,3 \pm 0,3$ mg/l), ce qui indique une AO chimique *in vitro* très importante. On note également que les teneurs polyphénoliques de ces deux extraits sont très voisines et élevées, comparativement aux valeurs mesurées dans l'extrait aqueux et alcoolique pur.

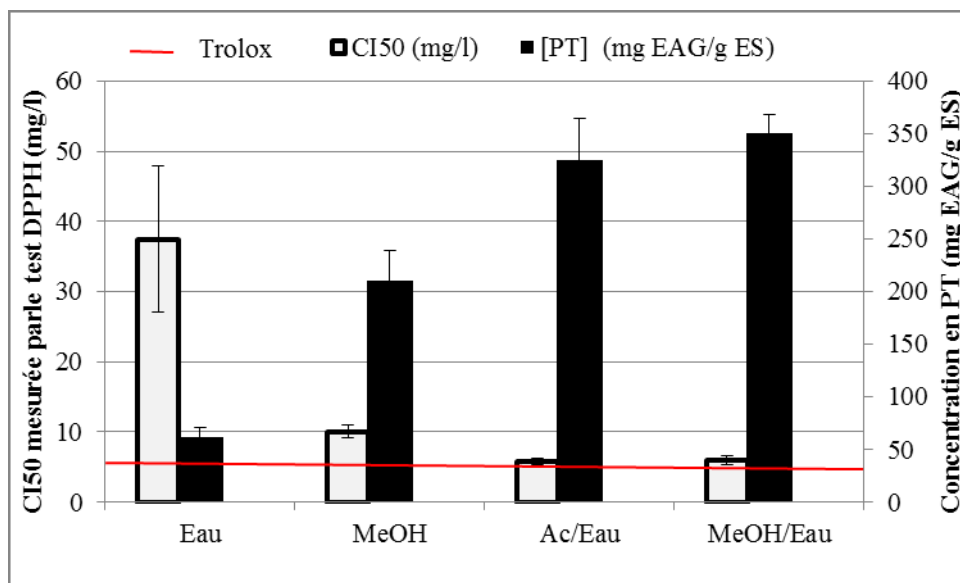


Figure 54 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PP d'extraits du mésocarpe en milieu neutre et avec une DI

✓ À pH acide en présence d'une étape de délipidation

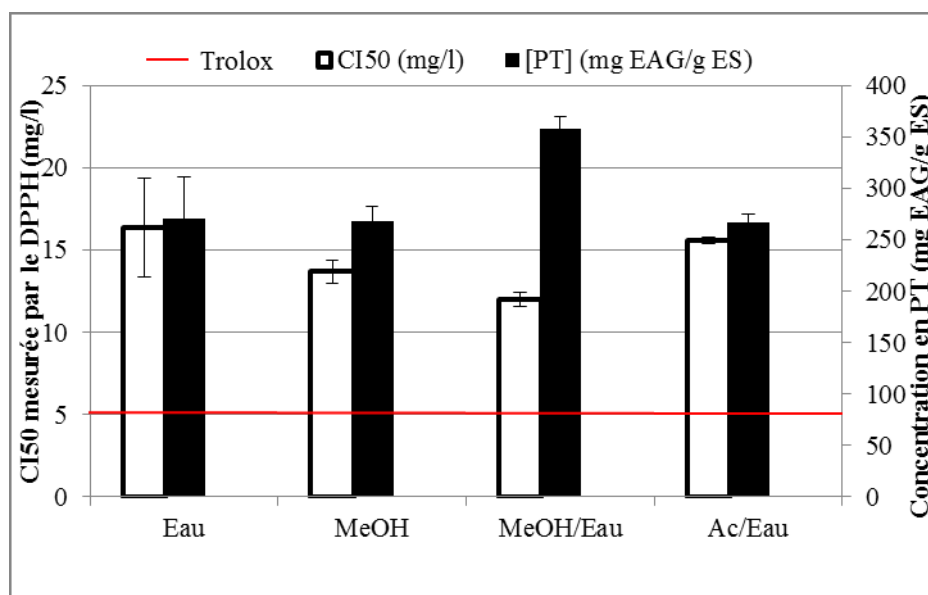


Figure 55 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PP d'extraits du mésocarpe en milieu acide et avec une DI

L'acidification du milieu entraîne que l'extrait hydroalcoolique possède l'activité antioxydante la plus forte ainsi qu'une quantité polyphénolique très importante par rapport aux autres extraits testés (Tableau 31).

✓ À pH acide sans étape de délipidation

Dans ces conditions d'extraction, les extraits les plus actifs sont l'eau et le mélange binaire hydroacétonique.

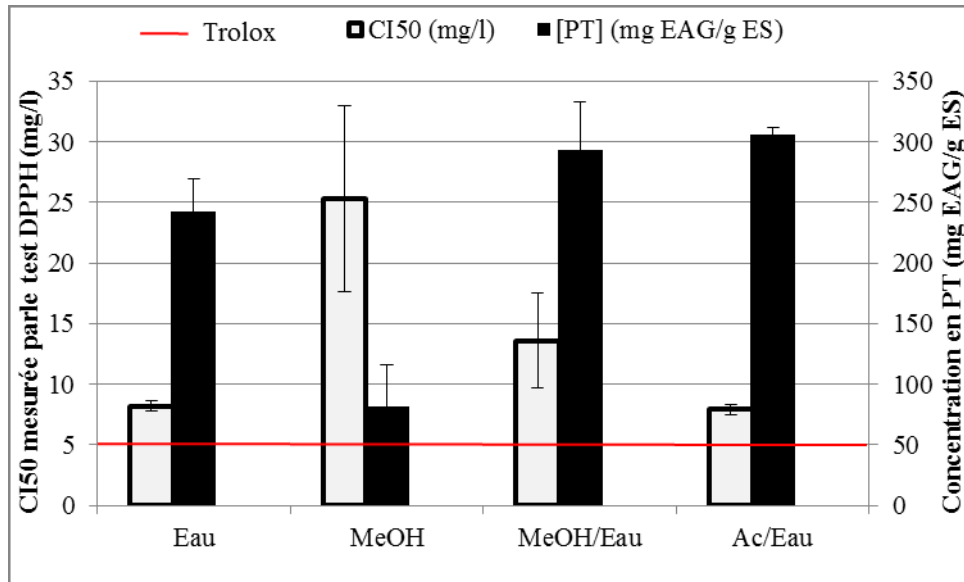


Figure 56 : Effet du solvant lors de l'étape d'extraction des PP d'extraits du mésocarpe en milieu acide et sans une DI

Bien que les résultats tendent à diverger en fonction du paramètre considéré, les conditions d'extraction choisies ont été orientées par les valeurs d'activité antioxydante les plus élevées, et la forte présence de polyphénols dans l'extrait

Effet de l'acidité du milieu sur l'activité antioxydante

En absence de délipidation, on observe que l'acidification tend à améliorer les valeurs d'activité AO pour les extraits réalisés avec le méthanol et l'eau, ce qui n'est pas le cas pour les extraits issus des solvants mixtes Ac/Eau et MeOH/Eau, pour lesquels l'acidification fait diminuer cette capacité antioxydante (Figure 57). Dans le cas des premiers, l'augmentation de la capacité AO s'accompagne de l'augmentation de la quantité polyphénolique. Cette observation est très marquée dans le cas des extraits aqueux. La tendance inverse est observée dans le cas des extraits de solvants mixtes. Pour l'extrait hydroacétonique, la diminution de l'activité AO est suivie de la baisse de la teneur polyphénolique.

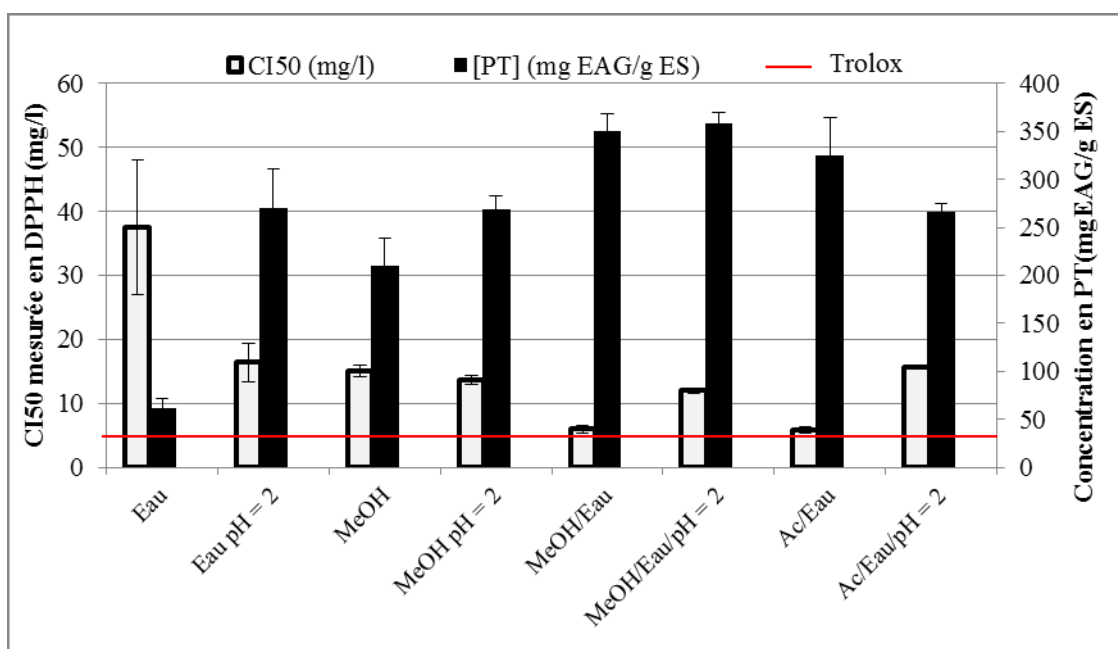


Figure 57 : Effet de l'acidification du milieu lors de l'étape d'extraction des PP d'extraits de mésocarpe

Effet de la délipidation sur l'AO

L'étude de la délipidation est effectuée pour des solvants de polarité voisine, c'est-à-dire les solvants binaires. Les résultats montrent que le pouvoir AO d'extraits du mésocarpe de patawa est légèrement améliorée lorsque les composés à caractère lipophile et/ou amphiphile sont éliminés (Figure 58). Dans le cas de ce tissu, l'étape de délipidation a eu un effet positif sur les valeurs de capacité antioxydante.

Dans les mêmes conditions d'extraction, c'est-à-dire en présence d'une étape de délipidation, l'AO déterminée pour le thé vert a révélé une CI_{50} de $7,6 \pm 0,9$ mg/l en présence du solvant hydroalcoolique et $7,0 \pm 0,5$ mg/l en présence du solvant hydroacétonique.

Cette étape a également eu pour conséquence de diminuer la quantité de polyphénols totaux. Ce résultat semble indiquer que la délipidation extrait des molécules possédant un pouvoir antioxydant.

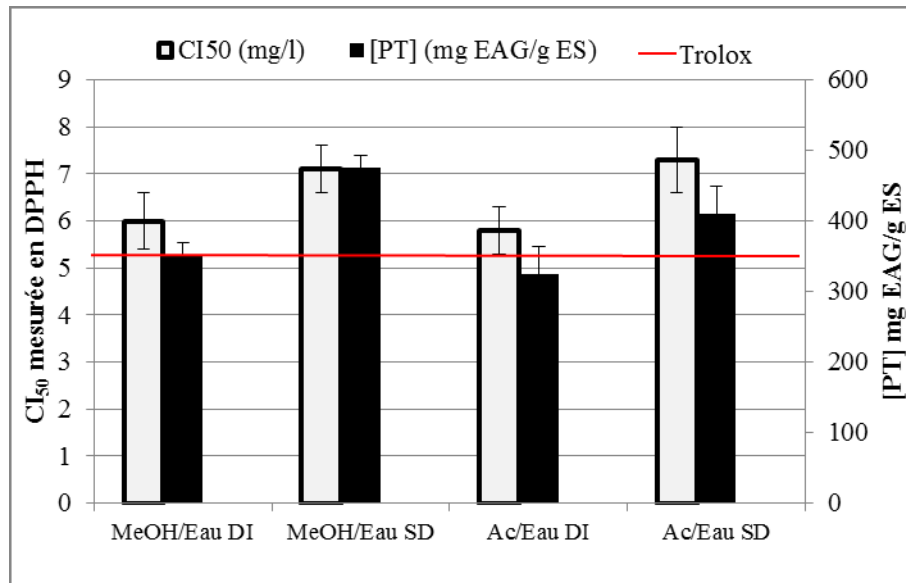


Figure 58 : Effet de la délipidation lors de l'étape d'extraction des PP d'extrait de mésocarpe

II.2 Sélection des extraits d'intérêt dans l'étude du mésocarpe

Les extraits qui ont été conservés pour la suite de l'étude du mésocarpe ont été élaborés à partir **des mélanges Acétone/eau et Méthanol/Eau avec une étape de délipidation**, dont les valeurs de CI50 sont respectivement $5,8 \pm 0,5$ et $6,0 \pm 0,6$ mg/l. En effet, ces extraits présentent la plus forte activité antioxydante parmi tous les extraits étudiés, et, en plus, possèdent une capacité antioxydante *in vitro* équivalente à celle relevée pour le Trolox[®] lorsque ceux-ci sont testés avec le radical DPPH.

La poursuite de ces travaux a consisté à appliquer ces deux extraits aux tests AO chimiques (TEAC, FRAP, ORAC) et biologique (KRL).

II.3 Évaluation du pouvoir antioxydant pour les extraits d'intérêt du mésocarpe de l'*Oenocarpus bataua* Mart.

II.3.1 Étude comparée de l'activité antioxydante *in vitro* chimique

Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 59.

Il faut souligner que dans le cas du test ORAC, les études préliminaires menées sur les extraits d'intérêt du mésocarpe n'ont pas permis d'aboutir à des résultats homogènes (en matière d'écart-type), quand seule la fluorescéine était utilisée pour ce test. Ces observations nous ont laissé supposer que certaines molécules présentes dans les extraits de mésocarpe ne seraient pas totalement solubilisées, entraînant ainsi des variations significatives au niveau des résultats. Des hypothèses ont donc été émises sur le fait que lors des étapes de délipidation effectuées sur ces extraits, il n'a pas été possible d'aboutir à l'élimination totale de composés à caractère lipophile voire amphiphile, gênant par là-même le dosage de l'AO en fluorimétrie. Le test ORAC a donc été appliqué à ces extraits en y introduisant la β -cyclodextrinéméthylée RMCD (*Randomly Methylated β -cyclodextrin*) pour permettre la solubilisation d'antioxydants lipophiles et/ou amphiphiles en solution aqueuse par formation de complexes d'inclusion.

L'évaluation de l'AO de ces extraits par les autres tests *in vitro* chimiques n'a pas présenté de telles difficultés.

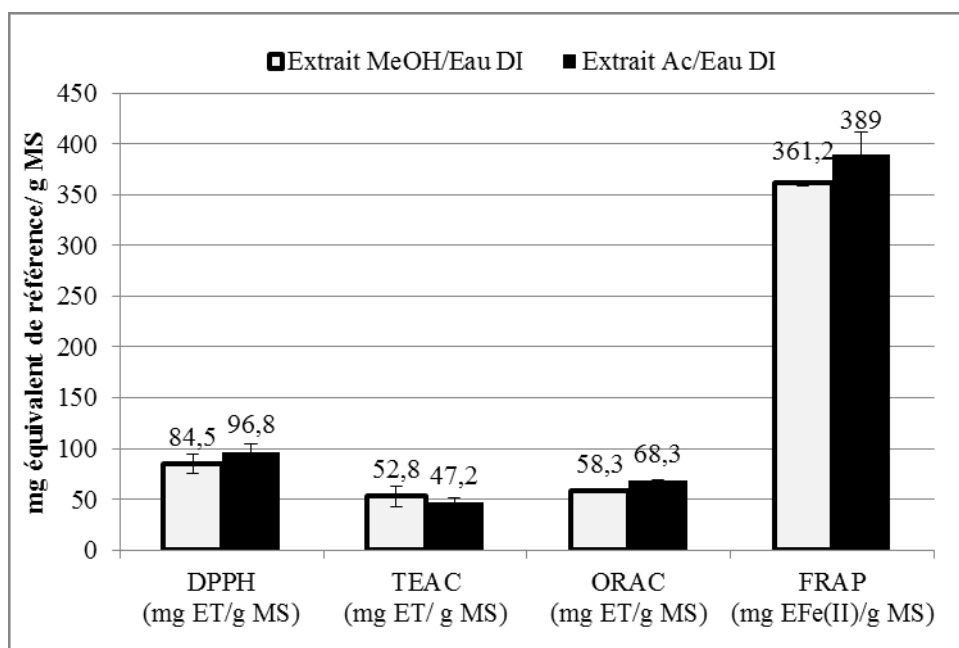


Figure 59 : Étude comparée de l'activité antioxydante des extraits d'intérêt issus du mésocarpe de l'*Oenocarpus bataua*

L'étude comparative de l'AO ne permet pas de discriminer les deux extraits puisque les valeurs calculées d'activité sont très voisines (Figure 59). Les quantités polyphénoliques étant les mêmes pour ces deux extraits (Tableau 23), les molécules AO présentes utiliseraient les mêmes mécanismes réactionnels.

Les valeurs mesurées sont plus élevées que celles déterminées dans le cas de l'étude de l'épicarpe.

II.3.2 Évaluation de l'activité antioxydante par un test biologique

Tout comme pour le test ORAC, les préparations des extraits bruts issus du mésocarpe ont présenté certaines difficultés lors de leur préparation avant les essais pour le test KRL. L'utilisation d'éthanol, ainsi qu'une étape de sonication, ont été nécessaires lors de la re-solubilisation de l'extrait séché en raison des agrégats.

Les résultats obtenus sont représentés à la Figure 60.

La différence de résultat entre les deux extraits est assez marquée. L'extrait acétonique est plus de 2,5 fois plus antioxydant que l'extrait méthanolique. Ce résultat est assez surprenant puisqu'aucune différence n'a pu être faite avec les autres tests chimique AO. De même que dans le cas de l'épicarpe, les résultats du test KRL semblent indiquer que les deux solvants mixtes solubiliseraient des composés phénoliques de nature différente (Figure 49).

Si les mécanismes engagés semblent identiques *in vitro*, il semblerait, qu'*in vivo*, les polyphénols issus de l'extrait hydroacétonique du mésocarpe soient capables d'activer d'autres mécanismes responsables de la protection cellulaire vis-à-vis du stress oxydant ou de mieux pénétrer la membranaire érythrocytaire. Une autre hypothèse serait la présence d'autres molécules AO non polyphénoliques qui seraient solubilisées par cet extrait, et qui agiraient aussi sur les mécanismes antioxydants cellulaires. Enfin, ces résultats nous montrent que le mésocarpe ($159 \pm 4,6$ mg ET/g MS) présente une activité AO trois fois supérieure à celle trouvée pour l'épicarpe ($53,4 \pm 1,2$ mg ET/g MS).

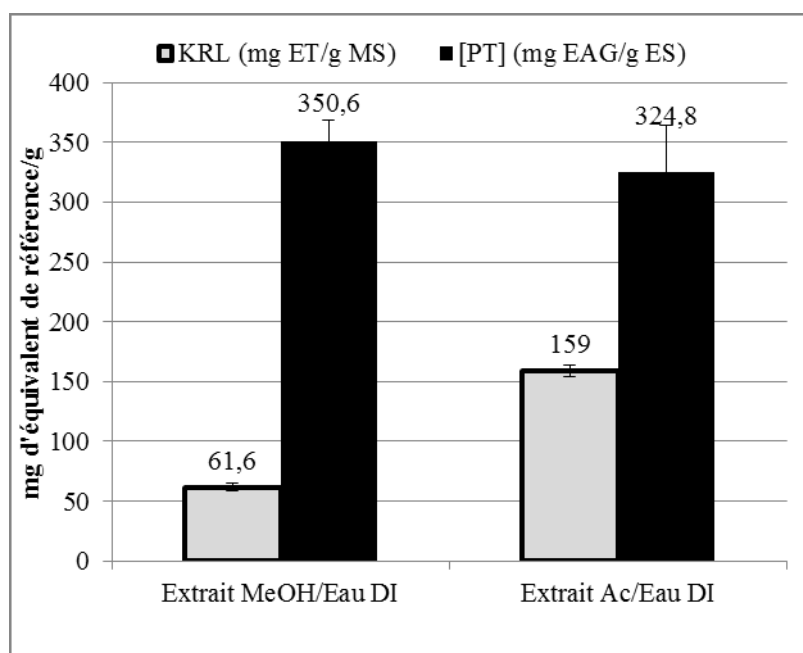


Figure 60 : Comparaison de l'activité antioxydante et des PT des extraits d'intérêt du mésocarpe avec le test KRL

La protection des érythrocytes représente un enjeu médical important notamment dans la lutte contre certaines maladies génétiques. Des extraits de propolis riches en composés polyphénoliques ont permis d'accroître la résistance membranaires des cellules sanguines de patients souffrant de sphérocytose héréditaire²³ [Moreira *et al.*, 2011]. Ceci fait du mésocarpe du patawa une nouvelle ressource naturelle à exploiter.

II.4 Dosages des polyphénols totaux et sous-familles des extraits de l'épicarpe de l'*Oenocarpus bataua*

Lors de la préparation du mésocarpe, nous avons observé sa faculté à brunir à l'air libre, laissant sous-entendre une forte présence de polyphénols et de la polyphénol-oxydase (PPO) ; ce qui s'est vérifié car, en comparaison, le mésocarpe (53,9) présente des valeurs plus élevés que l'épicarpe (19).

L'extrait acétonique aqueux présente, là aussi, les valeurs les plus élevées en PT, en FT et en PAT (Figure 61).

²³Sphérocytose héréditaire : maladie génétique se caractérisant par des globules rouges anormaux, petits et sphériques

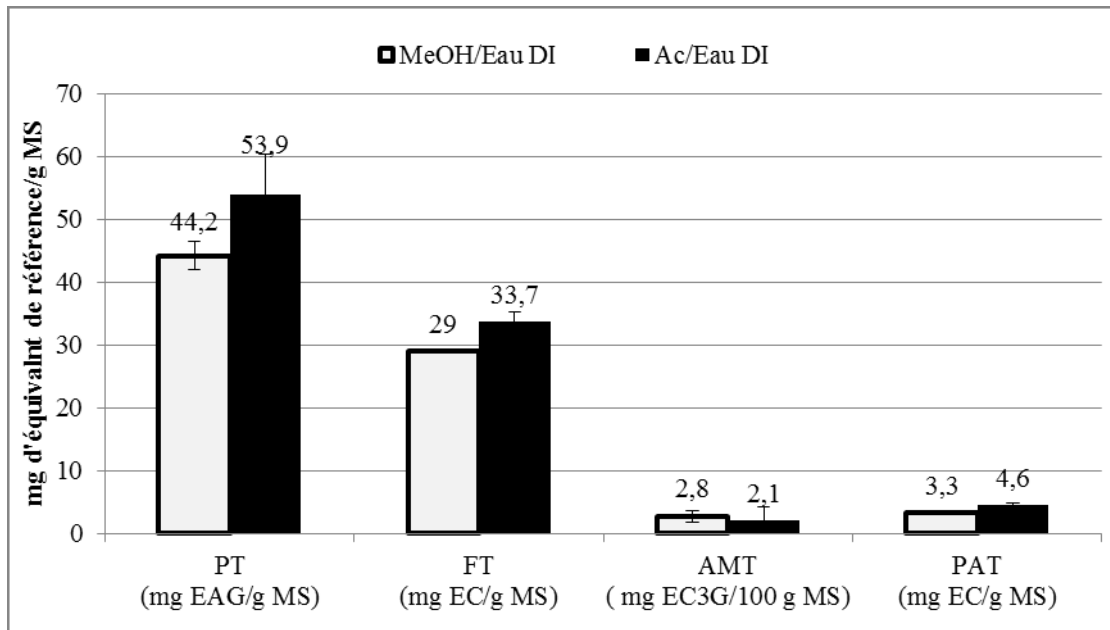


Figure 61 : Étude comparée des teneurs polyphénoliques d'extraits du mésocarpe

Si on compare la répartition des polyphénols présents dans les deux tissus végétaux, on constate une distribution différentielle des familles et sous familles dans l'extrait acétone/eau puisque le mésocarpe compte un plus grand nombre de polyphénols (environ 3 fois plus), de flavonoïdes (environ 3,5 fois plus) et de proanthocyanidines (environ 2,5 fois plus) tandis que l'épicarpe, quant à lui, contient une plus grande quantité d'anthocyanes monomères totaux (environ 24,5 fois plus).

II.5 Bioguidage et élucidation structurale des composés présents dans l'extrait acétonique du mésocarpe

II.5.1 Premières analyses qualitatives de l'extrait brut acétone/eau du mésocarpe par HPLC et spectroscopie UV

Encore une fois de façon surprenante, le chromatogramme obtenu à 280 nm pour l'extrait brut du mésocarpe est assez ressemblant à celui de l'épicarpe en raison de sa résolution relativement médiocre, de la présence d'une bosse qui pourrait témoigner de la présence de tanins et des co-élutions tout au long de ce massif (Figure 62). Cependant la bosse semble plus étroite puisque celle-ci ne s'étale que sur 20 minutes sur un chromatogramme comportant 60 minutes d'acquisition, de plus celle-ci s'achève par un sommet de très grande amplitude. Il est possible

d'envisager l'existence de plusieurs familles polyphénoliques au sein de ce tissu en examinant les spectres à différentes longueurs d'onde.

Comparativement à l'épicarpe pour lequel le chromatogramme extrait à 320 nm était pratiquement identique à celui du 280 nm, dans le cas du mésocarpe, les chromatogrammes sont totalement différents, de même que pour ceux des autres longueurs d'onde (360 et 520 nm). Ceci laisse penser que la bosse serait uniquement due à des composés dont le maximum d'absorption serait à 280 nm. C'est une caractéristique des tanins condensés. Ce résultat est en accord avec les valeurs trouvées lors du dosage des proanthocyanidines. L'observation à 320 nm d'une dérive de la ligne de base et de pics laisse supposer la présence d'un certain nombre de composés pouvant être attribués à des acides phénoliques, des acides hydroxycinnamiques et des stilbènes et aussi des tanins hydrolysables. À 360 nm, le chromatogramme présente un nombre de pics moins importants. A cette longueur d'onde, on peut suspecter la présence de flavonols et de flavones. Enfin, cette partie du fruit semble être très peu pourvue en anthocyanes, comme le confirme le spectre à 520 nm, et les valeurs déterminées d'anthocyanes monomères totaux.

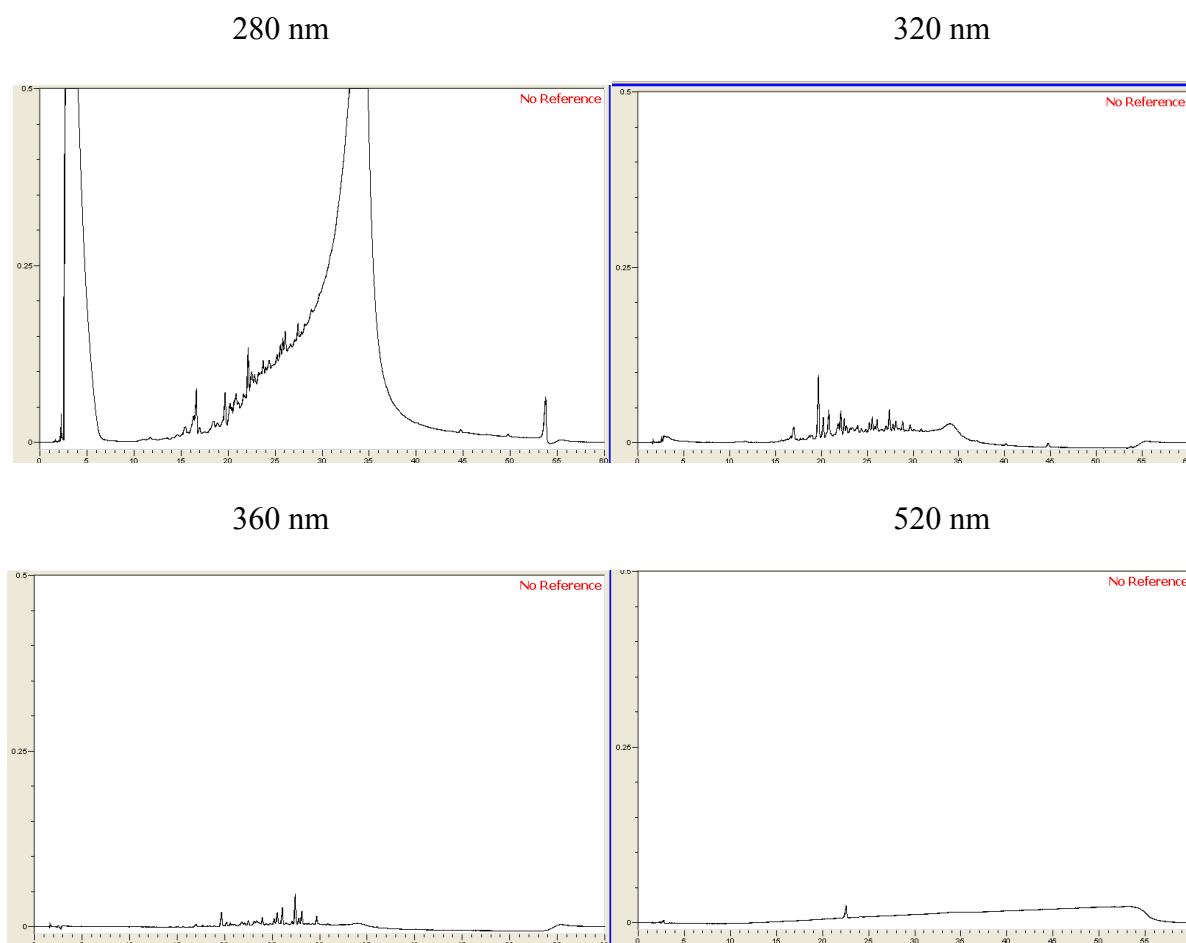


Figure 62 : Chromatogrammes de l'extrait hydroacétonique du mésocarpe à différentes longueurs d'onde

Une superposition à 280 nm du spectre de l'extrait brut établi dans les mêmes conditions chromatographique que précédemment avec les chromatogrammes réalisés à partir de mélanges qualitatifs présentés lors de l'étude de l'épicarpe est présentée à la Figure 63.

Mélange qualitatif 1, Mélange qualitatif 2, Extrait acétonique du mésocarpe à 280 nm

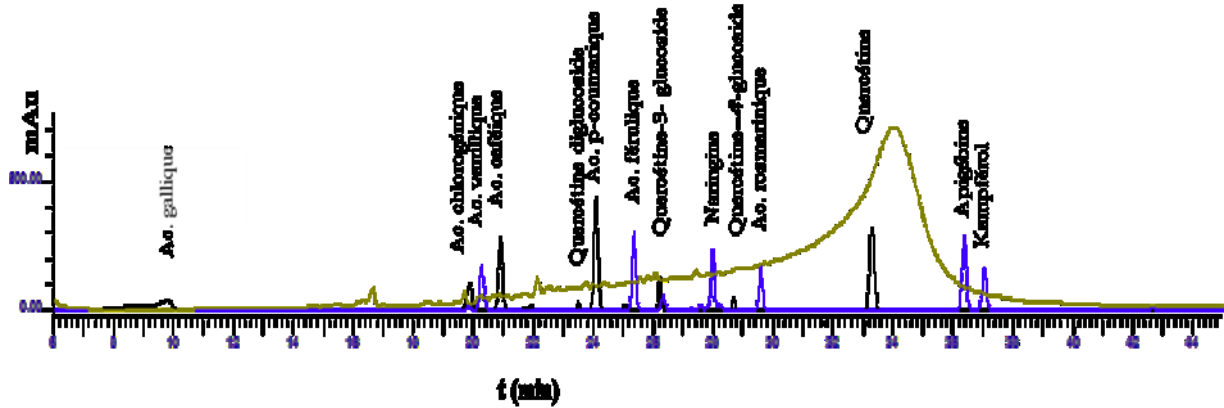


Figure 63: Superposition des chromatogrammes de l'extrait du mésocarpe et des mélanges qualitatifs à 280 nm

Composés phénoliques testés	Famille (poly)phénolique	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Présence potentielle des composés dans l'extrait brut (comparaison des Tr et des spectres UV)
Acide gallique	Acide hydroxybenzoïque	9,46	280	non
Catéchine	Flavanol	19,45	280	non
Acide chlorogénique	Acide hydroxycinnamique	19,71	280, 345	oui
Acide vanillique	Acide hydroxybenzoïque	20,09	280	non
Acide caféique	Acide hydroxycinnamique	20,69	280, 345	non
Quercétinediglucoside	Flavonol	23,31	280, 345	non
Acide p-coumarique	Acide hydroxycinnamique	23,87	280, 345	non
Acide férulique	Acide hydroxycinnamique	25,18	280, 345	non
Rutine	Flavonol	25,44	280, 345	non
Quercétine 3- O-glucoside	Flavonol	26,1	280, 345	non
Naringine	Flavanone	27,85	280, 345	non
Quercétine-4'-glucoside	Flavonol	28,45	280, 345	non
Acide rosmarinique	Acide hydroxycinnamique	29,53	280, 345	non
Quercétine	Flavonol	33,07	280, 345	non
Apigénine	Flavone	36,17	280, 345	non
Kaempférol	Flavonol	36,82	280, 345	non

Tableau 24 : Étude comparative des temps de rétention et des spectres UV-visibles entre l'extrait brut de mésocarpe et les mélanges qualitatifs

La comparaison des spectres UV a permis de suspecter la seule présence de l'acide chlorogénique dans ce tissu végétal, confirmé par les temps de rétention. L'injection d'autres témoins mériteraient d'être effectuée afin de compléter cette partie pour laquelle un seul composé est supposé (Tableau 24).

II.5.2 Fractionnement et analyse chromatographique de l'extrait d'intérêt du mésocarpe

Les valeurs de capacité antioxydante *in vitro* du mésocarpe supérieures à celle de l'épicarpe, et l'allure du chromatogramme brut de l'extrait acétonique sont autant d'éléments qui nous ont poussés à purifier cet échantillon. En effet, la présence supposée des tanins d'acquisition nous a permis d'orienter les recherches sur l'utilisation de la résine Séphadex LH-20 dont le rôle est de permettre la séparation de composés suivant leur taille [Zhou *et al.*, 2011].

La purification de cet extrait a ensuite fait l'objet d'une optimisation notamment sur le choix et les proportions des solvants utilisés. Nous avons choisi et fait varier les proportions de trois solvants. Le premier possède une forte polarité puisqu'il est majoritairement aqueux (composé d'eau/méthanol/TFA à (80/20/0,3 %)), le second, un caractère intermédiaire avec une quantité équivalente d'eau et de méthanol (d'eau/méthanol/TFA : 50/50/0,3 %) et, enfin, le dernier est de nature apolaire (acétone/eau à 70/30). Compte tenu de la nature de la résine utilisée, le choix de ces solvants a pour but de permettre d'éluer les composés en fonction de leur taille et de leur polarité. Ainsi, les composés les plus petits et les plus polaires sortiraient-ils au début tandis que ceux présentant une masse molaire importante seraient élués en dernier. Deux fractions, d'environ 50 ml, sont réalisées avec chaque solvant.

L'hypothèse selon laquelle les molécules sortent en priorité au début de chaque nouveau solvant utilisé, nous a amenés à poursuivre en priorité les tests sur celles-ci (Figure 64).

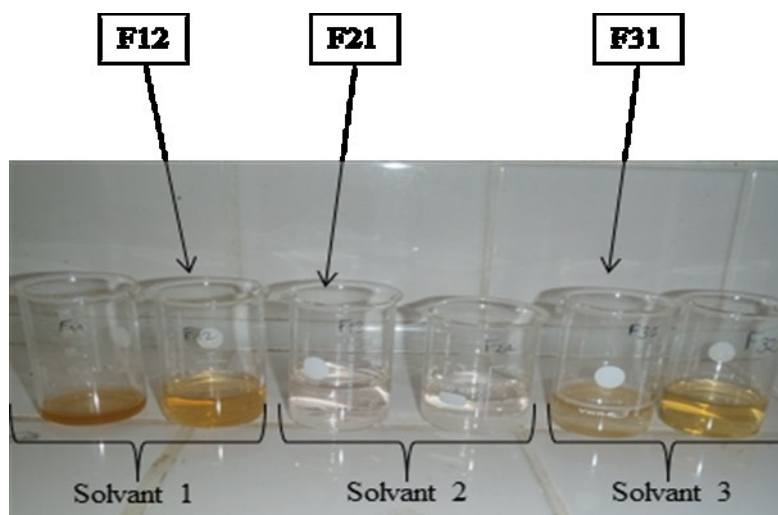


Figure 64 : Fractions obtenues à partir de la purification sur résine Séphadex LH-20 de l'extrait de mésocarpe

Afin d'obtenir des informations qualitatives sur chaque type de fraction, des chromatogrammes à 280 nm ont été effectués en priorité sur les fractions F12, F21 et F31 dans les mêmes conditions expérimentales chromatographiques que l'extrait brut (Figure 65). Chacune des fractions est analysée aux différentes longueurs d'onde, à l'instar de l'extrait brut, exception faite du chromatogramme à 520 nm dont le signal est déjà très faible dont ce dernier.

Si on considère la fraction F12, on observe que le chromatogramme de celle-ci présente un comportement similaire à celui de l'extrait initial avec la perte de la bosse et la dérive de la ligne de base à 320 nm avec peu de pics observés et aucun pic visible à 360 nm. Ce qui a été mis en évidence dans le cas de l'extrait brut semble s'appliquer pour cette fraction car on pourrait supposer la présence des deux types de tanins dans des proportions différentes.

Pour la fraction F21, l'information importante est l'absence de cette bosse et la diminution du sommet de grande amplitude à 280 nm. Quelques pics sont visualisés à 320 et 360 nm mais cette fraction serait essentiellement constituée de composé ayant un maximum d'absorption à 320nm.

Et enfin, la dernière fraction F31, dont l'éluant est apolaire, montre une résolution générale des pics moins bonne avec la présence de nombreux composés co-élus en même temps que le massif des tanins condensés sur plus de la moitié du chromatogramme. La présence de flavones, de flavonols, de stilbènes, d'acides hydroxycinnamiques, d'acides phénoliques supposés est plus marqué que dans la fraction précédente (Figure 65, Figure 66 & Figure 67).

L'ensemble de ces résultats confirme notre hypothèse sur la forte inhomogénéité de l'extrait initial, notamment sur la quantité de tanins que nous avons commencé à séparer par le jeu de leur polarité différentielle. L'hétérogénéité de ces composés est vraisemblablement due à des degrés de polymérisation différents.

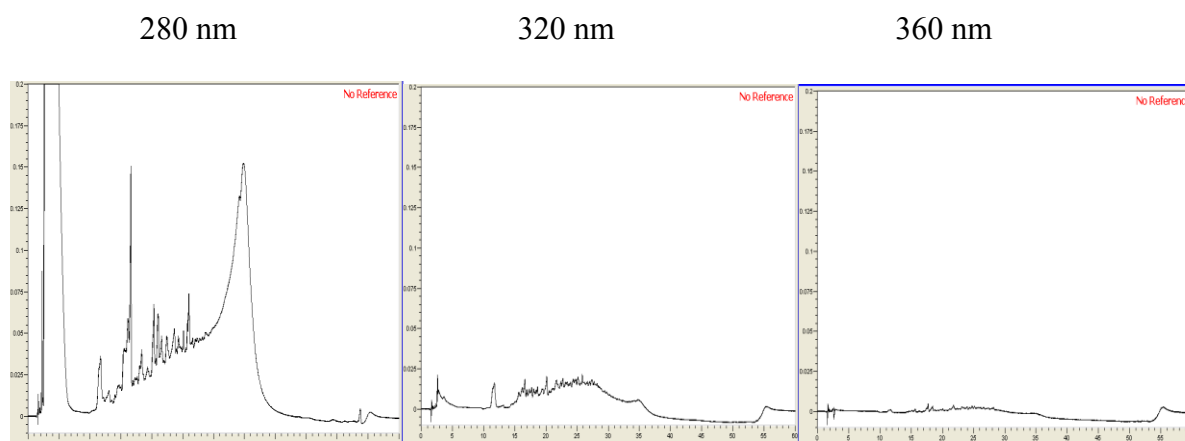


Figure 65: Chromatogrammes de la fraction F12 de l'extrait d'intérêt du mésocarpe à différentes longueurs d'onde

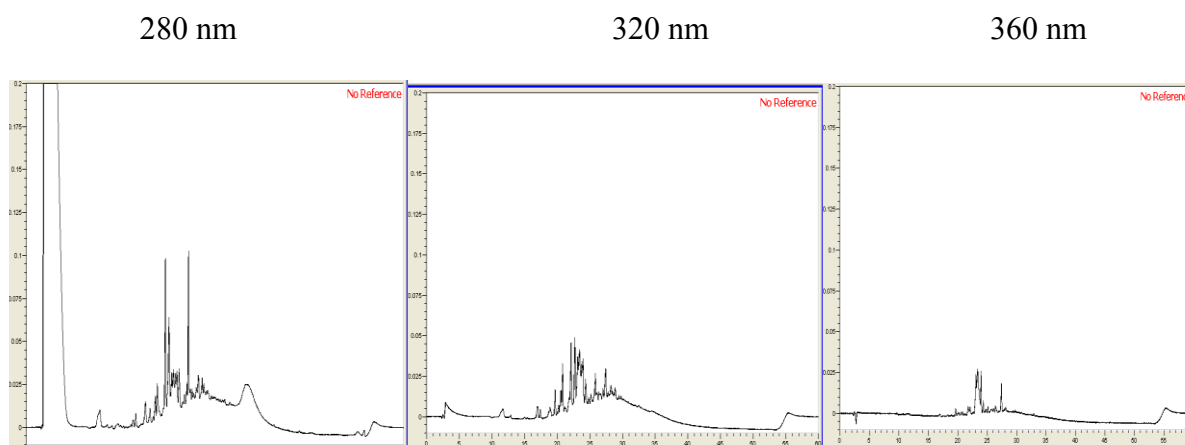


Figure 66 : Chromatogrammes de la fraction F21 de l'extrait d'intérêt du mésocarpe à différentes longueurs d'onde

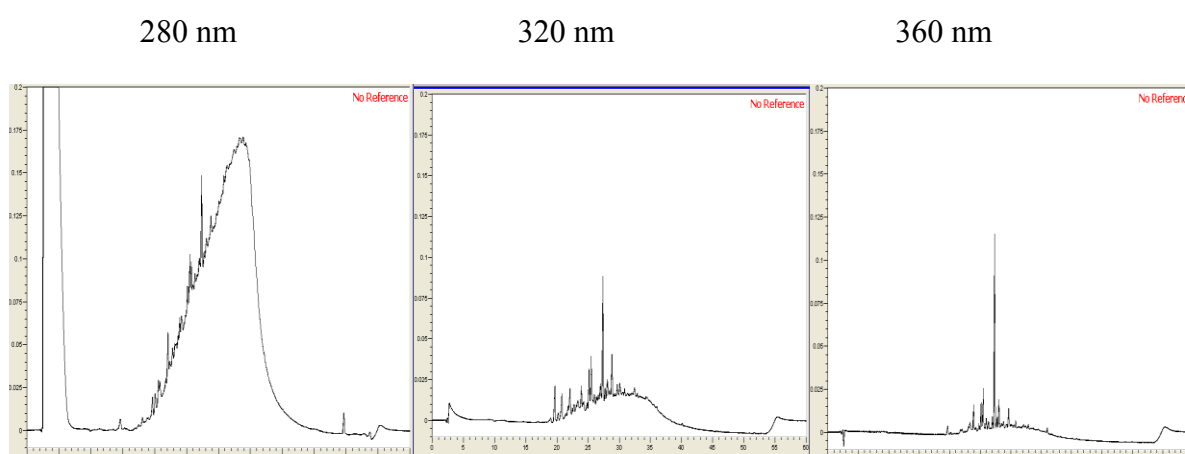


Figure 67 : Chromatogrammes de la fraction F31 de l'extrait d'intérêt du mésocarpe à différentes longueurs d'onde

II.5.3 Activité antioxydante *in vitro* biologique des fractions purifiées de l'extrait d'intérêt du mésocarpe

Dans la suite de ce chapitre, nous avons souhaité évaluer la contribution des fractions précédentes à l'activité antioxydante en comparaison de celle de l'extrait brut initial. Elles ont donc été testées en priorité par le test que nous jugeons dans cette étude comme étant le plus complet en raison des mécanismes réactionnels mis en jeu : le test KRL.

Néanmoins, chaque fraction étant initialement à des concentrations différentes, elles ont toutes été ramenées à la même concentration que l'extrait brut pour être comparées.

Il en ressort que les fractions F12, F21 et F31 présentent respectivement 15 ; 7,1 et 5 % de l'AO globale de l'extrait brut.

Lors de la purification d'extraits potentiellement riches en polyphénols, l'étude de l'AO des différentes fractions peut conduire à des phénomènes de synergie, d'antagonisme et/ou addition fréquemment rencontrés entre polyphénols eux-mêmes mais aussi entre polyphénols et autres composés présents dans la matrice végétale. On appelle synergie l'effet coopératif entre antioxydants qui permet d'accroître l'activité antioxydante. Cette augmentation est supérieure à la somme donc à l'addition des activités antioxydantes prises individuellement [Heo *et al.*, 2007; Freeman *et al.*, 2010]. A l'inverse, si l'augmentation de l'AO intervient lors de la dissociation de polyphénols, on parlera d'effet antagoniste [Hidalgo *et al.*, 2010].

Ainsi, même s'il apparaît difficile de conclure sur l'impact du fractionnement sur les valeurs d'activité antioxydante puisque toutes les fractions n'ont pas été étudiées, peut-on en déduire que la composition phytochimique de la fraction F12 présente des molécules possédant une plus forte activité antioxydante que les molécules appartenant à la fraction F11 et F31. Cette étude devrait être prochainement approfondie afin de déterminer le pourcentage d'activité de chaque fraction élaborée. Cette information pourra ensuite permettre de conclure sur les possibles effets de synergie ou d'antagonisme présents au sein de cette matrice végétale.

II.6 Conclusion

Le tissu mésocarpe a également fait l'objet d'une optimisation de son activité antioxydante. Cette mise au point a fait ressortir que ce tissu présentait une AO *in vitro* chimique (égale à celle du trolox pour le test DPPH) et biologique très intéressante comparée à celle de l'épicarpe. C'est pourquoi, ce tissu sera utilisé pour comparaison au cours de l'analyse de la pulpe complète. La détermination des quantités phénoliques totales indique que cette partie du fruit est plus riche en composés polyphénoliques, flavonoïdes et proanthocyanidines, par rapport à l'épicarpe.

Les premiers résultats de l'étude qualitative chromatographique des polyphénols ont permis d'émettre l'hypothèse -uniquement sur la base des spectres UV et des témoins disponibles- de la présence d'acide chlorogénique, composé qui serait également présent dans le tissu épicarpe. Ils ont aussi permis de suspecter la forte présence de tanins condensés, bien que celle de tanins hydrolysables puissent être aussi envisagée mais dans de proportions plus faibles.

Le fractionnement de l'extrait étudié a eu pour conséquence d'isoler une fraction présentant 15 % de l'AO globale de l'extrait brut vis-à-vis du test KRL. Des investigations plus poussées concernant l'élucidation structurale, faisant appel à une purification plus complète et à des méthodes d'analyses plus pointues (Spectrométrie de masse à haute résolution et / ou RMN), devront être menées afin de compléter ces premiers résultats. Une analyse structurale et fonctionnelle pourrait se révéler fort intéressante afin d'élucider les mécanismes d'actions AO que semble présenter le mésocarpe au niveau cellulaire.

III Étude menée sur le Mélange Épicarpe Mésocarpe (MEM) de *Oenocarpus bataua* Mart. et comparaison avec l'espèce *Euterpe oleracea* Mart.

L'apport de connaissance scientifique nouvelle sur le mélange des tissus du fruit du patawa présente un intérêt industriel notable, en particulier en considérant la facilité avec laquelle il est possible de récupérer la matière végétale. En effet, toute valorisation industrielle à partir de ce fruit devra prendre en compte les fortes contraintes liées à son dépulpage. C'est pourquoi, nous avons mené de façon plus approfondie l'étude sur le Mélange Épicarpe Mésocarpe (MEM) de ce fruit.

III.1 Choix des conditions d'extraction

Les conditions d'extraction des biomolécules du Mélange Épicarpe-Mésocarpe (MEM) sont directement issues des résultats déduits de l'optimisation de l'épicarpe et du mésocarpe. En effet, les conditions d'extraction des deux tissus convergent vers l'emploi des mêmes solvants d'extraction, avec dans le premier cas une absence de délipidation, et l'inverse dans l'autre cas. Ceci correspond à quatre extraits (Tableau 25).

Solvant requis pour l'étude du MEM	Traitement
MeOH/Eau	SD
MeOH/Eau	DI
Ac/Eau	SD
Ac/Eau	DI

Tableau 25 : Conditions d'extraction des polyphénols du MEM de *Oenocarpus bataua* Mart.

Rendements d'extraction des composés bioactifs de type polyphénol

Les rendements d'extraction des polyphénols du MEM présentent des valeurs basses, et proches quels que soient les solvants et les modes de traitement utilisés. (Tableau 26). De même, la délipidation n'a aucun effet significatif ce paramètre.

Solvant d'extraction	Protocole suivi	Rdt d'extraction de matière sèche (%)
MeOH/Eau	DI	8,5 ± 1,0
MeOH/Eau	SD	8,9 ± 2,1
Ac/Eau	DI	9,4 ± 0,5
Ac/Eau	SD	10,5 ± 2,0

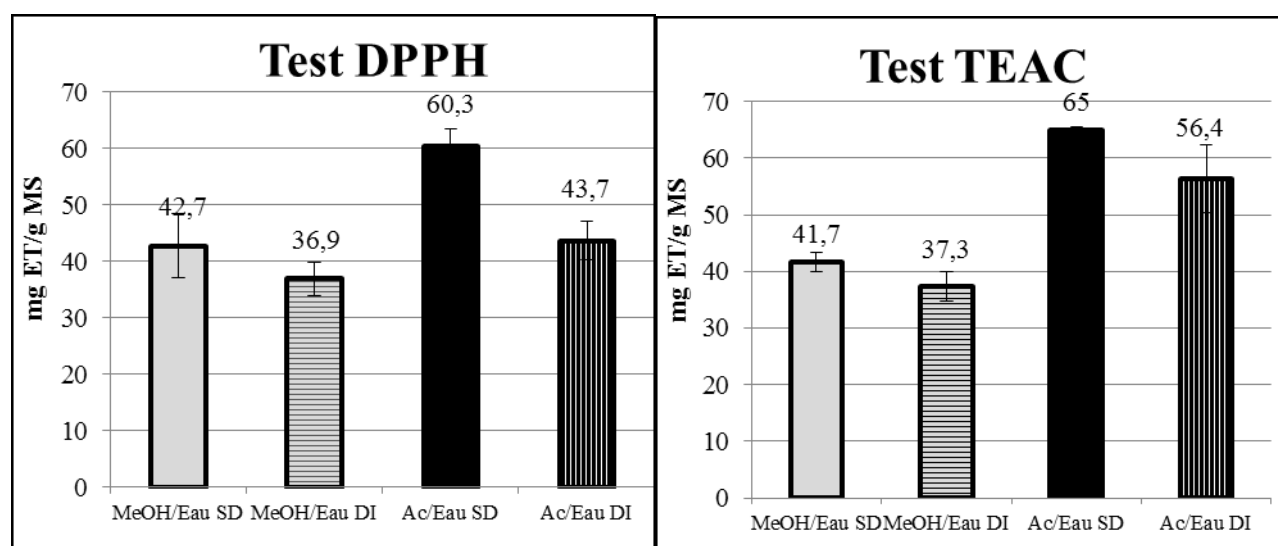
Tableau 26 : Rendement d'extraction des polyphénols du MEM

Les valeurs obtenues pour le fruit global se situent entre les valeurs de rendement des deux tissus étudiés précédemment.

III.2 Évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* chimique des extraits du MEM du patawa et du mésocarpe d'açaï

III.2.1 Étude comparée de l'AO sur les extraits du MEM

Les quatre extraits ont donc été soumis aux tests AO *in vitro* chimiques. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 68.



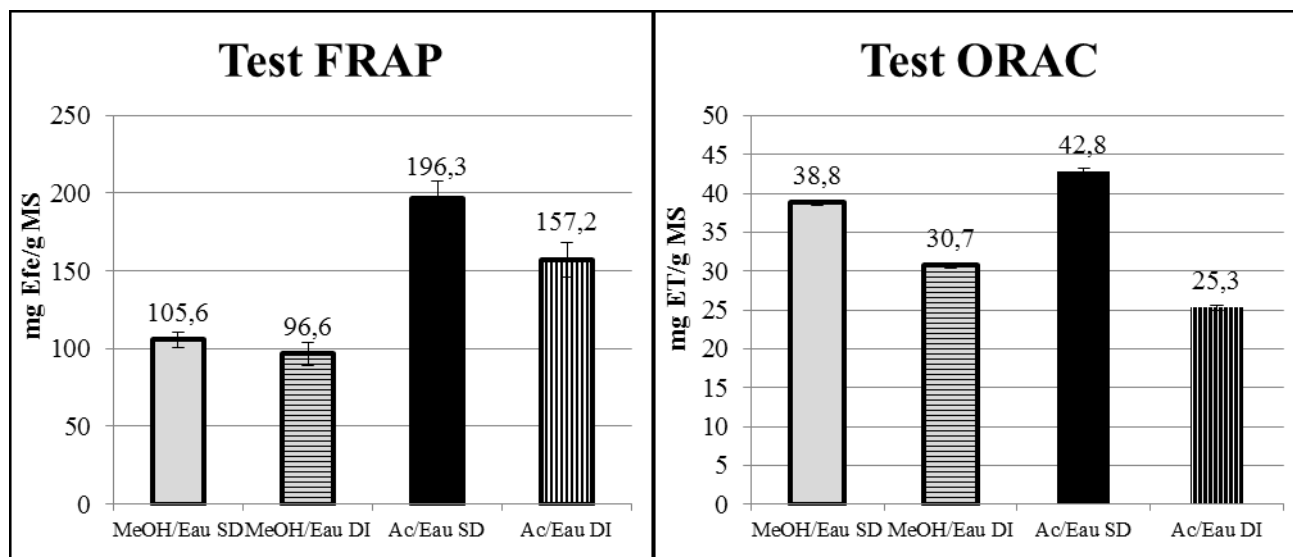


Figure 68 : Étude comparée de l'AO in vitro chimique des extraits du MEM

Influence de la délipidation sur l'AO in vitro chimique

L'étape de délipidation entraîne, dans le cas des quatre tests, une baisse générale de l'activité antioxydante. De nombreux auteurs ont proposé que les molécules qui sont habituellement extraites par ce processus et qui sont à caractère amphiphile et lipophile, telles que les lipides, les acides gras et les vitamines liposolubles, jouent un rôle non négligeable dans la mesure de la capacité antioxydante [Simic *et al.*, 2003; Counet *et al.*, 2006].

On note également que cette diminution est plus marquée dans le cas des extraits élaborés à partir d'acétone/eau.

Influence du solvant sur l'AO in vitro chimique

Le comportement du MEM présente les mêmes caractéristiques que les deux tissus étudiés séparément. L'AO la plus remarquable est obtenue pour les extraits utilisant l'acétone/eau.

L'évaluation par pesée d'une dizaine de fruits de la proportion d'épicarpe et de mésocarpe dans le fruit entier a montré que le MEM est constitué d'environ 70 % du premier tissu et 30 % du deuxième. Cette information peut légitimement permettre d'envisager la question suivante : Avec la connaissance de l'AO des différentes parties du fruit peut-on alors prédire l'AO du fruit global

en considérant ces proportions ? En d'autres termes, la capacité antioxydante dans le cas de notre étude est-elle additive ?

Les valeurs d'AO issues de chaque test pour chaque extrait ont donc été reconsidérées en y intégrant les proportions de chaque tissu. Elles ont ensuite été comparées aux valeurs déterminées expérimentalement du MEM (Tableau 27).

Tests AO (mg équivalent de référence/g MS)	Extrait MeOH/Eau SD		Extrait Ac/Eau SD	
	Valeur AO calculée	Valeur AO expérimentale	Valeur AO calculée	Valeur AO expérimentale
DPPH	38 ± 4	43 ± 6	48 ± 3	60 ± 3
TEAC	28 ± 4	42 ± 2	30 ± 3	65 ± 1
FRAP	138 ± 4	106 ± 5	163 ± 12	196 ± 12
ORAC	41 ± 2	39 ± 1	45 ± 2	43 ± 1
KRL	40 ± 2	52 ± 7	85 ± 2	97 ± 1

Tableau 27 : Comparaison des valeurs d'AO calculées et expérimentales des extraits de MEM

Toutes les valeurs sont du même ordre de grandeur. Cependant, quelques données méritent une attention particulière. En effet, les valeurs calculées et expérimentales déterminées dans le test ORAC sont quasi identiques. Ces résultats, traduisant le caractère additif de l'AO, sont en accord avec les travaux réalisés par **Heo et al. (2007)** sur la comparaison entre l'AO de composés phénoliques pris individuellement, et lorsqu'ils sont associés à un, voire deux autres polyphénols dans le test TEAC.

La poursuite des travaux sur la recherche d'AO a donc été réalisée, dans un premier temps sur les extraits de MEM **acétonique et méthanolique aqueux, en absence de délipidation**. Pour ces travaux, il nous a semblé judicieux de comparer les résultats obtenus avec deux références l'açaï et du thé vert, tous deux connus pour leur forte activité antioxydante, et, pour le premier, pour son appartenance à la famille des palmiers amazoniens. Compte tenu des valeurs élevées d'activités AO obtenues pour le mésocarpe, il a aussi été considéré pour l'étude comparative qui suit. Les extraits ont été réalisés dans les mêmes conditions que pour le MEM. Le mésocarpe présentant en plus une étape de délipidation. Ces comparaisons ont été complétées avec d'autres plantes dont les données proviennent de la littérature.

III.2.2 Étude comparée de l'AO des extraits conservés du MEM et d'autres plantes

L'étude comparée de l'AO qui suit concerne le Mélange épicarpe Mésocarpe (MEM), le mésocarpe du patawa, l'acai et le thé vert. Les résultats des capacités mesurées des extraits conservés sont illustrés à la Figure 69.

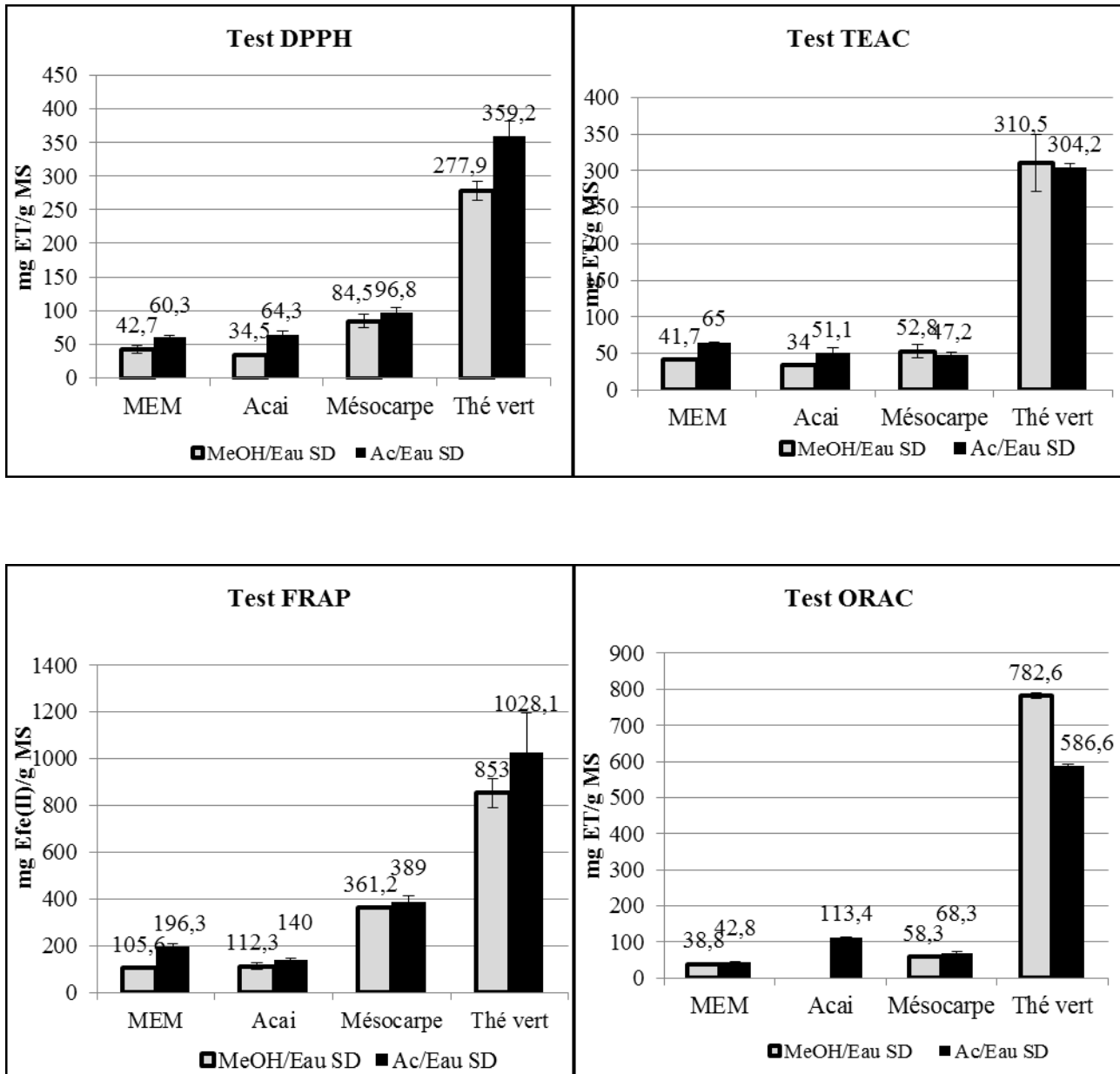


Figure 69 : Étude comparée de l'AO in vitro chimique d'extraits du MEM et d'autres plantes

Que ce soit un extrait méthanolique ou acétonique, et quelque soit le test utilisé, le thé vert possède la capacité antioxydante la plus élevée. Ce résultat est en accord avec de nombreux

travaux réalisés sur le thé vert, qui témoignent de sa grande capacité antioxydante liée notamment à sa teneur en catéchines [de Mejia *et al.*, 2009; Perumalla et Hettiarachchy, 2011; Costa *et al.*, 2012]. Nous avons, en plus, constaté que les rendements d'extraction de biomolécules, confirmés par le dosage en polyphénols totaux de cette plante, sont très largement supérieurs aux autres plantes, ce qui favorise l'action antioxydante. Le mésocarpe du patawa arrive en deuxième position, excepté pour l'ORAC. L'açaï et le fruit du patawa se disputent la 3^{ème} et 4^{ème} position dans ce classement, hormis lorsque l'extrait d'açaï acétone/eau est dosé en ORAC où il détient la deuxième place. Globalement, on note que les capacités AO les plus élevées sont issues des extraits hydroacétoniques.

Compte tenu de l'ordre d'importance fixée entre les tests, il apparaît que, pour le test ORAC, l'extrait d'açaï présente un pouvoir largement supérieur à celui du MEM. La recherche sur la capacité antiradicalaire de l'açaï a permis de montrer que sa composition polyphénolique, et en particulier sa teneur en anthocyanes, permet d'expliquer en partie sa bonne capacité antioxydante [Lichtenthaler *et al.*, 2005]. C'est pourquoi, il nous a semblé important de quantifier ces molécules dans la suite de cette étude.

Schauss *et al* (2006) ont également évalué l'AO de la pulpe d'açaï dans un extrait acétone/eau (50/50, v/v). Il révèle une valeur de 1027 $\mu\text{mol ET/g}$ d'extrait contre 453,2 dans notre étude. Cette différence peut provenir de la polarité des solvants, compte tenu des proportions engagées (acétone/eau, 70/30 v/v pour le patawa), du processus d'extraction utilisé, par agitation mécanique dans le premier cas et par sonication dans le deuxième, et aussi du degré de maturité du fruit qui est directement relié à sa composition phytochimique.

Une comparaison similaire concernant l'activité AO peut également être faite sur d'autres fruits. Babbar *et al.* (2011) ont déterminé l'AO par le test TEAC sur des extraits méthanoliques aqueux (70 %) de différentes parties de fruits tels que la banane, le raisin et le litchi (Tableau 28). Ceux-ci sont comparés au fruit du patawa et au mésocarpe. En tenant compte de l'écart-type du mésocarpe du patawa, la valeur la plus faible d'AO de cette partie du fruit se situerait après les graines de litchi et serait équivalente à l'AO des graines de raisins, tout comme le patawa. Il faut toutefois être très prudent lors de la comparaison des données issues de la littérature car il faut tenir compte du procédé d'extraction des biomolécules. Dans le cas présent, les fruits ont été séchés à l'aide d'un four durant 12 et 18 heures mais non lyophilisés comme dans le cas du fruit du patawa.

Fruits testés	TEAC sur extrait méthanolique aqueux	σ
Graine de litchi	48,9	2,2
Péricarpe de litchi	36,4	1,8
Pépins de raisin	42,2	1,9
Peau de banane	5,6	0,3
Patawa	41,7	1,7
Mésocarpe de patawa	52,8	9,6

Tableau 28 : Comparaison de l'AO d'extrait méthanolique aqueux de mésocarpe du patawa et de différents fruits

Une étude très récente d'**Abadio Finco et al. (2012)** sur l'évaluation de la capacité AO d'un autre fruit de palmier, très voisin du patawa et appartenant au même genre, a été effectuée. Il s'agit de l'espèce *Oenocarpus bacaba* Mart. connue sous le nom de « comou » en Guyane, dont les utilisations traditionnelles culinaires identiques à celles du patawa sont également très appréciées des populations locales.

Les résultats sont tous exprimés en équivalent de la référence par gramme de matière fraîche (Tableau 29).

	AO mesurée en DPPH (mmol ET/g MF)	AO mesurée en TEAC (μ mol ET/g MF)	AO mesurée en FRAP (mmolEFe(II)/g MF)	AO mesurée en ORAC (μ mol ET/g MF)
Extrait Ac/Eau de MEM (patawa) (extraction par sonication)	0,14 \pm 0,01	176,3 \pm 18,6	0,44 \pm 0,03	79,1 \pm 1,0
Extrait Ac/Eau de comou (extraction par agitation mécanique)	0,34 \pm 0,00	32,9 \pm 3,0	0,24 \pm 0,01	107,5 \pm 15,0

Tableau 29 : Comparaison de l'AO in vitro chimique entre le patawa et le comou, deux espèces du même genre

Il apparaît que l'extrait de patawa montre une capacité antioxydante plus importante vis-à-vis des tests TEAC et FRAP mais inférieur au regard des tests DPPH et ORAC.

Néanmoins, les protocoles de mises en œuvre de ces deux tests diffèrent entre les 2 extraits. Dans le cas du TEAC, l'extrait de comou est mis en contact avec le radical anion ABTS^{-•} généré par de l'ABAP (2,2'-azobis (2- amidinopropane hydrochloride)) et par chauffage à 60°C [Van Den Berg

et al., 1999]. Dans le cas de l'extrait de patawa, il s'agit de la formation du radical cation $ABTS^{+\cdot}$ par le persulfate d'ammonium à température ambiante. La nature et la taille du contre-ion, l'effet de la solvation induite par la nature du milieu réactionnel sont autant d'éléments qui influent sur la réactivité des espèces chargées en solution, et, par conséquent, sur les résultats obtenus [Hogen-Esch et Smid, 1966].

Le temps d'incubation des échantillons dans le test FRAP n'a pas été spécifié dans le cas de l'extrait de comou, or cette information est d'importance puisqu'il a été démontré que l'absorbance devait être mesurée à un temps précis, car la cinétique de réaction n'aboutissait pas un plateau. Au cours de la thèse, la mesure a été fixée à 30 minutes [Pulido *et al.*, 2000].

III.3 Évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* biologique du MEM et d'autres plantes

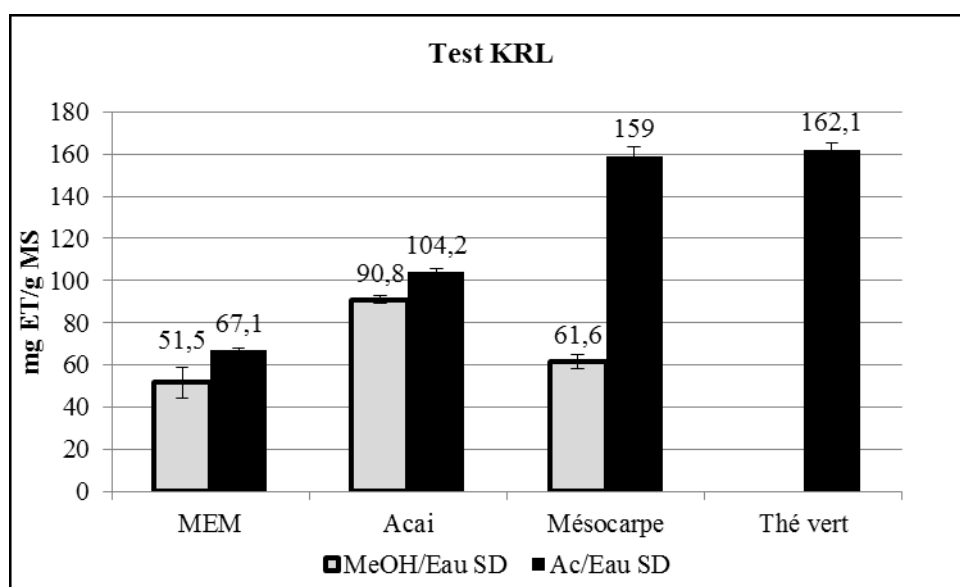


Figure 70 : Étude comparée de l'AO *in vitro* biologique d'extrait du MEM et d'autres plantes

L'action protectrice du thé vert sur les cellules sanguines est la plus importante si on la compare à d'autres plantes ou partie de plante reconnues pour leur pouvoir antioxydant comme le montre la Figure 71. Cette capacité antioxydante est traduite par une forte augmentation du temps de demi-hémolyse aux concentrations testées (entre 0,1 et 0,5 g/l). Par conséquent, le mésocarpe peut être

considéré comme très antioxydant dans le test KRL puisqu'il présente la même capacité antiradicalaire que celle du thé vert à l'incertitude près.

Les résultats du test KRL viennent confirmer partiellement les premières tendances du test ORAC, puisque là encore, les valeurs d'AO de l'açaï sont très supérieures à celles du MEM mais celle du mésocarpe se révèlent inférieures. De plus, les profils entre les deux extraits des fruits sont similaires avec systématiquement une meilleure AO pour l'extrait acétonique aqueux (Figure 70).

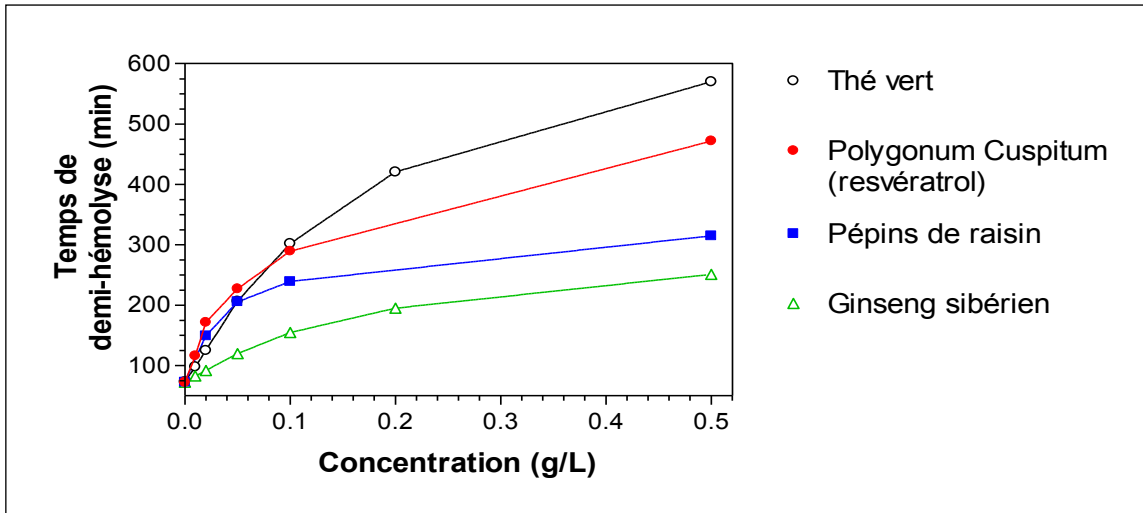


Figure 71 : Pouvoir antioxydant de différentes plantes par le test KRL (tirée d'une présentation de la société Kirial)

L'étude du MEM a été poursuivie par la détermination des teneurs en différentes familles polyphénoliques des extraits retenus. Ces dernières ont systématiquement été comparées à celles mesurées pour l'açaï.

III.4 Dosages des polyphénols totaux et quelques sous-familles des extraits de MEM et comparaison avec l'açaï

Sur la base des calculs effectués pour prédire l'AO du MEM, les teneurs polyphénoliques totales et les quantifications des sous-familles théoriques ont été calculées et comparées aux valeurs expérimentales. Globalement, les résultats sont très voisins les uns des autres, exception faite pour les quantités d'AMT qui s'avèrent être largement supérieures aux valeurs prédictives (Figure 72 & Tableau 30).

Jiang (2000) a montré que l'enzyme polyphenol-oxidase (PPO) du lychee, agissait automatiquement sur un extrait riche en phénols, entraînant instantanément un brunissement de la solution, et un effet bathochrome observé sur les composés nouvellement formés.

Ainsi, l'hypothèse selon laquelle des produits de dégradations colorés, autres que les anthocyanes, ont pu être formés dans les extraits de MEM, conduisant à la possible surestimation des quantités totales monomériques des anthocyanes, est-elle plausible.

De plus, de nombreux auteurs ont observé et étudié des phénomènes de copigmentation dus à des interactions appelées π - π stacking. Ces copigmentations sont intermoléculaires quand le noyau polarisable plan chromophore des anthocyanes colorés et des molécules polyphénoliques autres que les anthocyanes appelées copigments sont liés par des interactions hydrophobes faibles. Elles sont intramoléculaires lorsque le groupement de l'anthocyane est lié de façon covalente au copigment. Cette forme en « sandwich » permet de protéger l'ion flavylum chromophore d'attaque nucléophile de l'eau. Ils ont ainsi pu mettre en évidence des effets hyperchromes et bathochromes suite à cette copigmentation, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des quantités mesurées [**Gomez-Miguez et al., 2006; Gonzalez-Manzano et al., 2009; Pacheco-Palencia et al., 2009**].

Les quantités polyphénoliques totales de l'açaï ont été estimées à $34,0 \pm 3,4$ et $38,7 \pm 4,6$ mg EAG/g MS respectivement pour les extraits à base de méthanol/eau et acétone/eau. La quantité calculée pour l'extrait acétonique est très proche de celle calculée pour le même extrait de MEM.

Ces données permettent d'affirmer, qu'à quantités égales en polyphénols totaux mais à valeurs d'AO plus importantes pour l'extrait d'açaï (ORAC et KRL), ce dernier contiendrait des polyphénols et/ou autres sucres réducteurs dont la capacité antioxydante serait plus importante que ceux présents dans l'extrait de MEM.

C'est pourquoi, la poursuite de ces travaux s'est focalisée sur l'extraction et la quantification d'autres constituants à caractère antioxydant, comme les vitamines E et C dans les deux fruits étudiés. De plus, il nous a semblé important de doser et d'utiliser d'autres méthodes pour la quantification de sous-familles polyphénoliques à caractère antioxydant, les anthocyanes et les tanins.

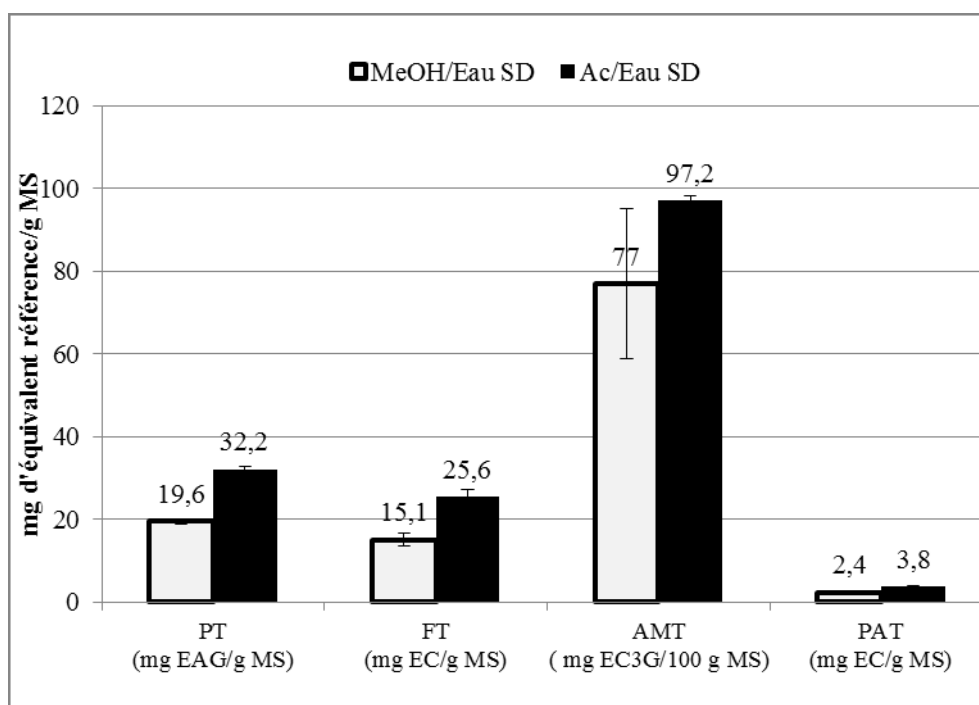


Figure 72 : Étude comparée des teneurs polyphénoliques d'extraits du MEM

Tests AO	Extrait MeOH/Eau SD		Extrait Ac/Eau SD	
	Valeur calculée	Valeur expérimentale	Valeur calculée	Valeur expérimentale
PT (mg EAG/g MS)	27 ± 2	20 ± 1	30 ± 4	32 ± 1
FT (mg EC/g MS)	13 ± 1	15 ± 2	17 ± 1	25,5 ± 2
AMT (mg EC3G/ 100 g MS)	49 ± 5	77 ± 18	37 ± 5	97 ± 1
PAT (mg EC/ g MS)	2 ± 0	2,5 ± 1	2,5 ± 0	4 ± 0

Tableau 30 : Comparaison des teneurs polyphénoliques calculées et expérimentales des extraits de MEM

III.4.1 Analyses qualitatives et quantitatives des anthocyanes majoritaires du MEM et de l'acai par méthode chromatographique

Afin de s'assurer de la présence des anthocyanes dans les extraits de MEM et d'acai, nous avons procédé à des injections connues d'étalons pour chaque échantillon. Avec cette méthode, il est possible d'envisager la présence de molécules dans l'échantillon testé. Deux quantités fixes de molécules référentes ont été choisies et introduites dans l'échantillon de MEM et d'acai.

La quantification de la cyanidine 3-*O*-glucoside et de la cyanidine 3-*O*-rutinoside a été réalisée par étalonnage externe. Une droite d'étalonnage est tracée à partir des aires des pics de chaque étalon pris à différentes concentrations. Avec cette droite, il est ensuite possible de déterminer la concentration des molécules de l'extrait en considérant l'aire sous les pics dont les temps de rétention seraient exactement identiques à ceux des standards. Les spectres UV à 515nm sont présentés à la Figure 74.

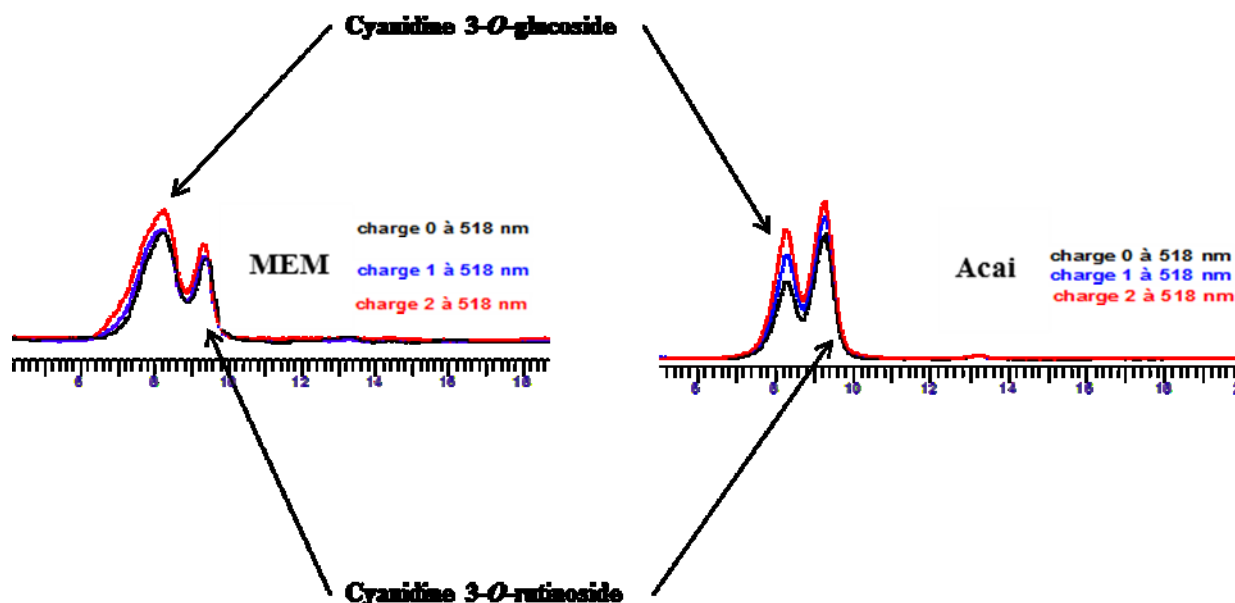


Figure 73 : Chromatogrammes relatifs aux anthocyanes majoritaires dans les extraits de MEM et d'açaï à 515 nm

La cyanidine 3-*O*-glucoside et la cyanidine 3-*O*-rutinoside possèdent des temps de rétention respectivement égaux à 8,4 et 9,3 minutes. On observe qu'à ces temps de rétention, le MEM et l'açaï présentent des pics à la longueur d'onde choisie de 515 nm. On s'aperçoit, que dans le cas du MEM, l'échantillon montre une quantité plus importante de cyanidine 3-*O*-glucoside alors que la cyanidine 3-*O*-rutinoside est majoritairement présente dans l'échantillon d'açaï. La quantification de ces molécules est donnée dans le Tableau 31.

Fruits	mg/ kg of matière fraîche			
	Cyandine 3- <i>O</i> -glucoside	σ	Cyanidine 3- <i>O</i> -rutinoside	σ
Patawa	60,4	3,0	40,1	2,4
Açaï	550,2	22,1	1250,9	62,6

Tableau 31 : Quantification des anthocyanes majoritaires dans les extraits de MEM et d'açaï

Au regard du dosage pH différentiel permettant d'aboutir aux quantités d'anthocyanes monomères totales, il apparaît que l'extrait acétonique contenait environ $680,4 \pm 26,6$ mg d'équivalent cyanidine 3-*O*-glucoside par kilogramme de matière fraîche, soit près de 7 fois plus que ce qui a été dosé par chromatographie. Cela suggère une dégradation substantielle des anthocyanes dans l'extrait ou alors une surestimation des quantités mesurées en considérant des effets de copigmentation.

Les quantités mesurées dans l'extrait de patawa sont très inférieures comparées à celles déterminées dans l'extrait d'açaï. La valeur de la cyanidine 3-*O*-rutinoside est en accord avec les données bibliographiques (Tableau 31). En 2009, l'équipe de **Pacheco-Palencia *et al*** a évalué spectrophotométriquement la cyanidine 3-*O*-rutinoside à $1256 \pm 38,1$ mg/kg et la cyanidine 3-*O*-glucoside à $947 \pm 29,0$ mg/kg.

Les différences quantitatives peuvent être également attribuées aux différentes techniques utilisées dans la détermination de ces molécules, précision et sensibilité de la méthode, mais également à la résolution moyenne des pics dans les deux extraits étudiés.

Les valeurs mesurées des anthocyanes dans l'açaï permettent d'expliquer en grande partie sa meilleure capacité antioxydante par rapport à l'extrait de MEM.

III.4.2 Analyses qualitatives et quantitatives des proanthocyanidines du MEM par phloroglucinolyse

L'interprétation des résultats s'est faite avec les membres de la plate-forme Polyphénols de l'UMR Sciences pour l'œnologie à Montpellier.

III.4.2.1 Analyse qualitative

La superposition des traces UV à 280 nm de trois injections faites dans les conditions standards de l'analyse sont présentées à la Figure 74. Les trois échantillons sont le brut de patawa dilué au dixième ayant servi à analyser le contenu en composés phénoliques (trace bleue), la phloroglucinolyse du brut de patawa réalisée dans des conditions similaires à une dilution au dixième (trace rose) et une phloroglucinolyse réalisée dans des conditions correspondant à une dilution au 15ème (trace verte).

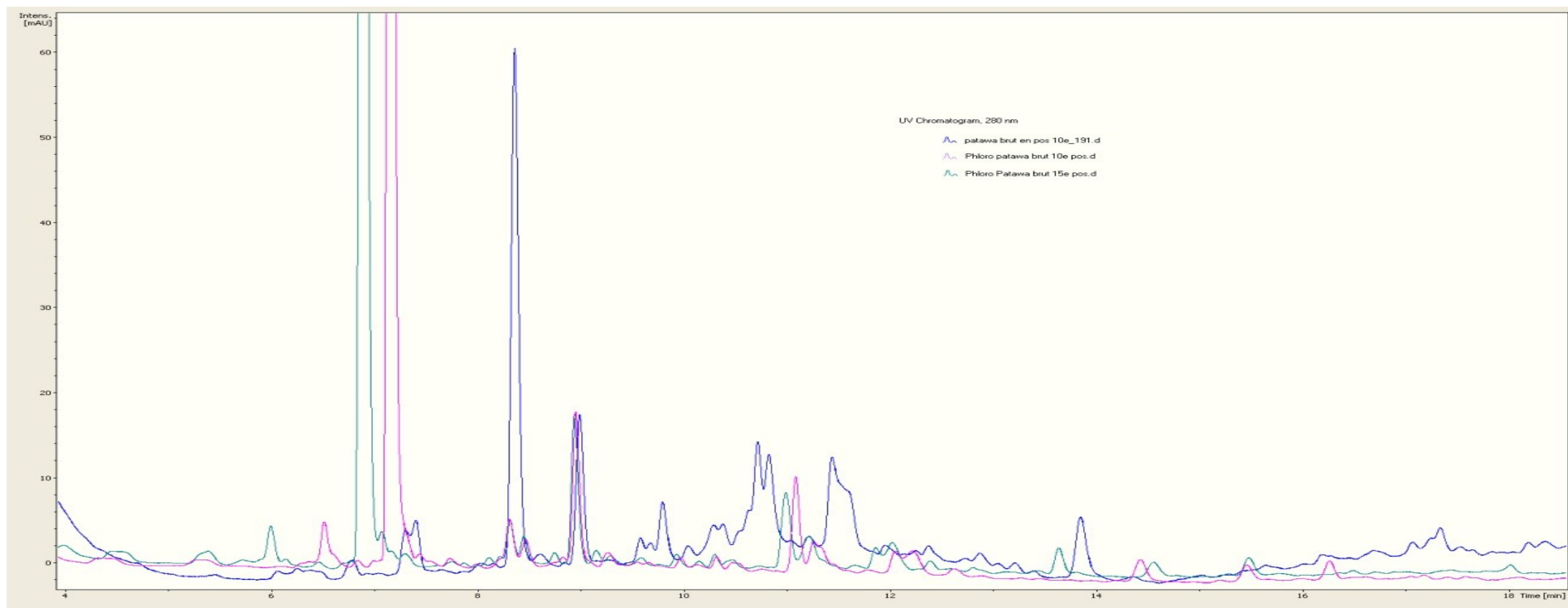


Figure 74 : Chromatogrammes de l'extrait brut de patawa MEM avant et après phloroglucinyse

A partir de la réaction de phloroglucinolyse, de nombreux composés, dont les poids moléculaires sont conciliés dans le Tableau 32, peuvent être formés.

Nom du composé	Poids moléculaire	Ion moléculaire en mode positif
Phloroglucinol	126	127
Epigallocatechinephloro	430	431
Catéchine phloro	414	415
Epicatechinephloro	414	415
Catéchine	290	291
Epicatechine gallate phloro	568	567
Epicatechine	290	291
Epicatechine gallate	442	443
Epigallocatechine	306	307
Epigallocatechinephloro	430	431

Tableau 32 : Composés formés à partir de la réaction de phloroglucinolyse

➤ **Recherche des monomères de catéchine et/ou d'epicatechine :**

Sur le chromatogramme correspondant à l'extrait brut de patawa MEM, la fragmentation du pic à 9 mn (Figure 75) montre la présence d'un dimère révélé par la masse 579 en MS, sélectionnée en fragmentation pour donner la masse 291 (masse de la catéchine) en MS². Un petit pic à 867 peut signifier qu'il s'agirait même d'un trimère, co-élué avec un autre produit à ce moment, pour expliquer les autres événements de fragmentation.

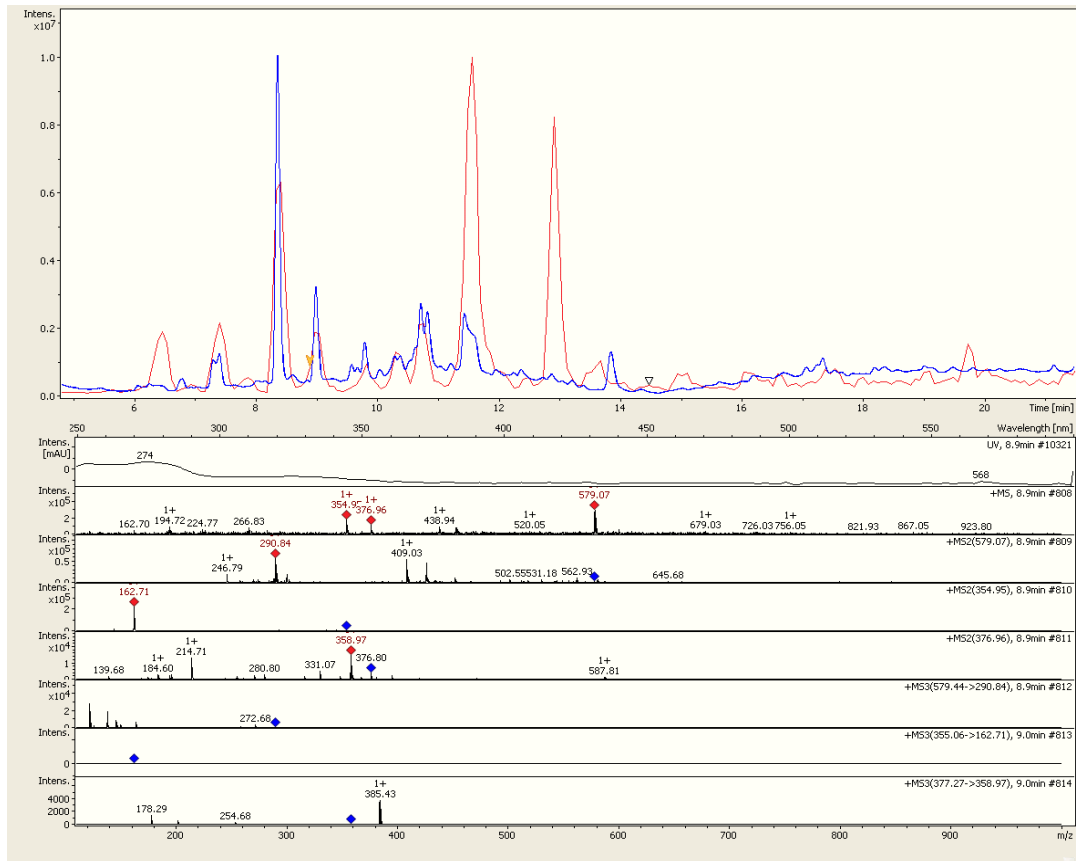


Figure 75 : Spectre de masse du pic à 9mn

L'extraction d'ions (EIC) à la masse 291 à partir du chromatogramme de l'échantillon ayant subi la phloroglucinolyse permet de voir s'il y a des monomères de catéchine ou d'épicatéchine (courbe verte sur la Figure 76).

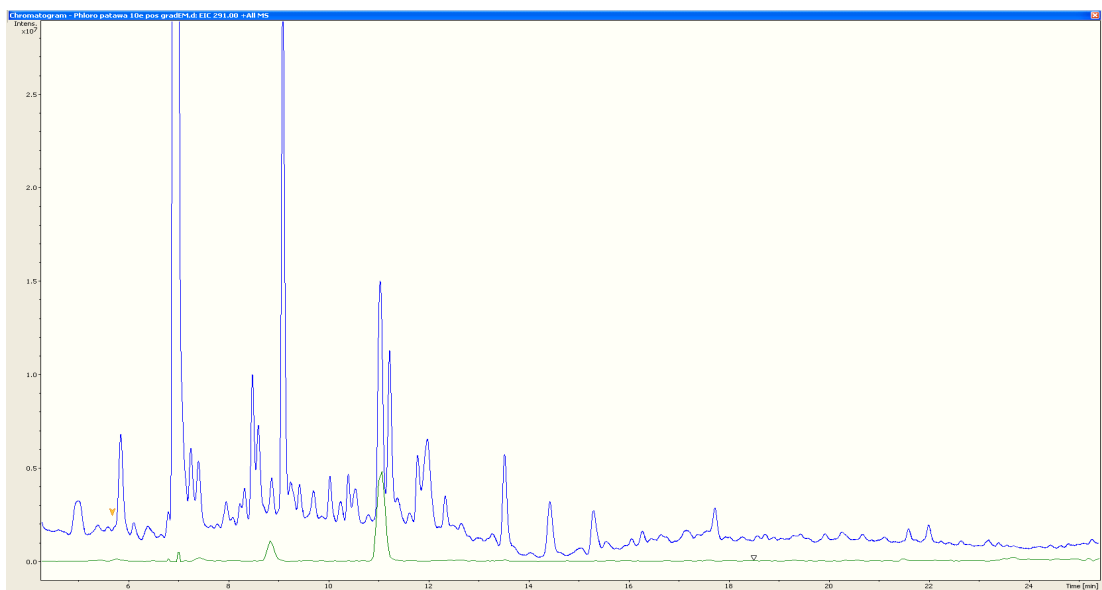


Figure 76 : Extraction d'ions à la masse 291

Il y a bien deux pics : un pour la catéchine (vers 8,6 min), l'autre pour l'épicatéchine (vers 11 minutes). L'ordre d'élution généralement observé pour ces 2 isomères est bien respecté.

➤ **Recherche du monomère épigallocatechine phloro**

De même, l'extraction d'ions à 431 à partir du chromatogramme de l'échantillon ayant subi la phloroglucinyse (courbe grise à la Figure 77) permet de voir s'il y a un fragment correspondant à l'épigallocatechine phloro (le nucléophile phloro accroché à un monomère d'épigallocatechine).

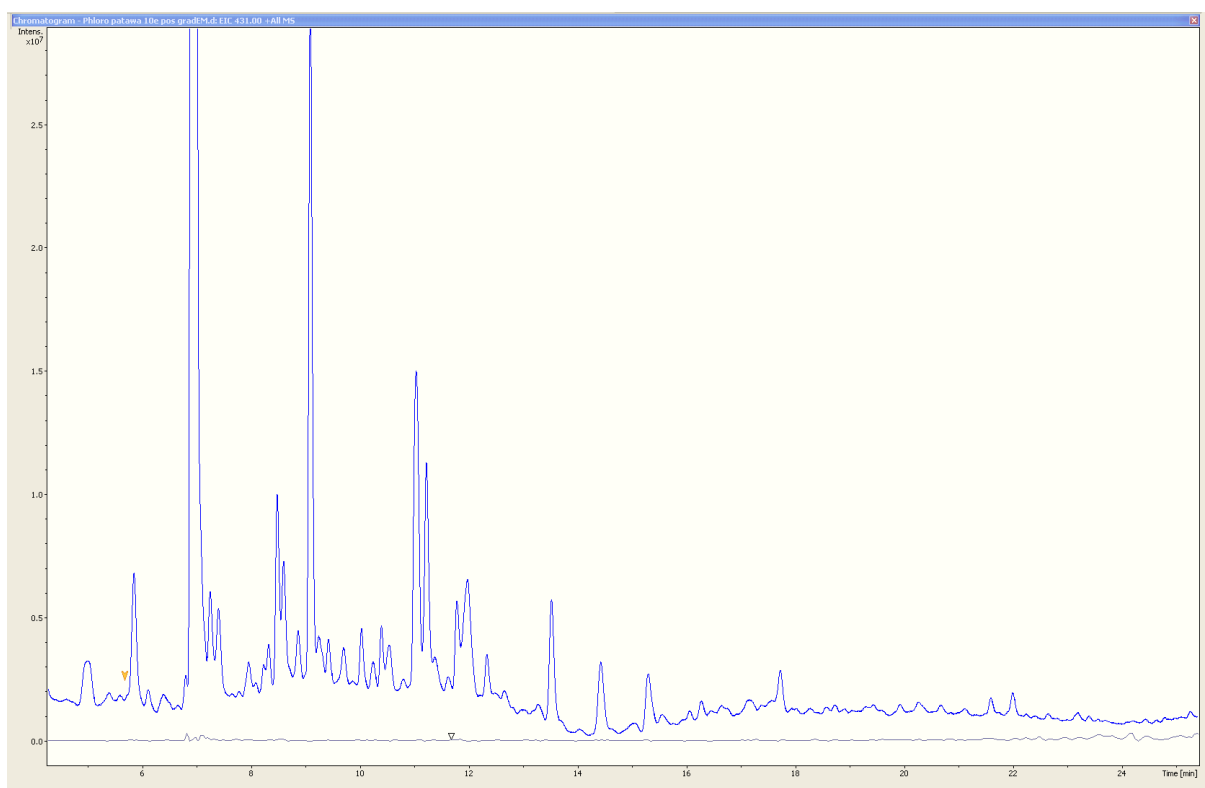


Figure 77 : extraction d'ions à la masse 431

La trace de cette extraction d'ions est plate ce qui semble indiquer qu'il n'y a pas d'épigallocatechine phloro.

➤ **Recherche des monomères catéchine phloro et épicatechine phloro**

L'extraction d'ions à 415 à partir du chromatogramme de l'échantillon ayant subi la phloroglucinyse (courbe jaune à la Figure 78) permet de visualiser la présence de la catéchine phloro et de l'épicatechine phloro.

La fragmentation du pic à 7 mn (Figure 79) montre des pertes de 126 (masse du phloroglucinol entier), laissant un ion à 287 en négatif, 289 en positif, correspondant à la masse de la catéchine moins deux hydrogènes (différence de masse de 2 due à la rupture d'une liaison carbone-carbone du dérivé phloro).

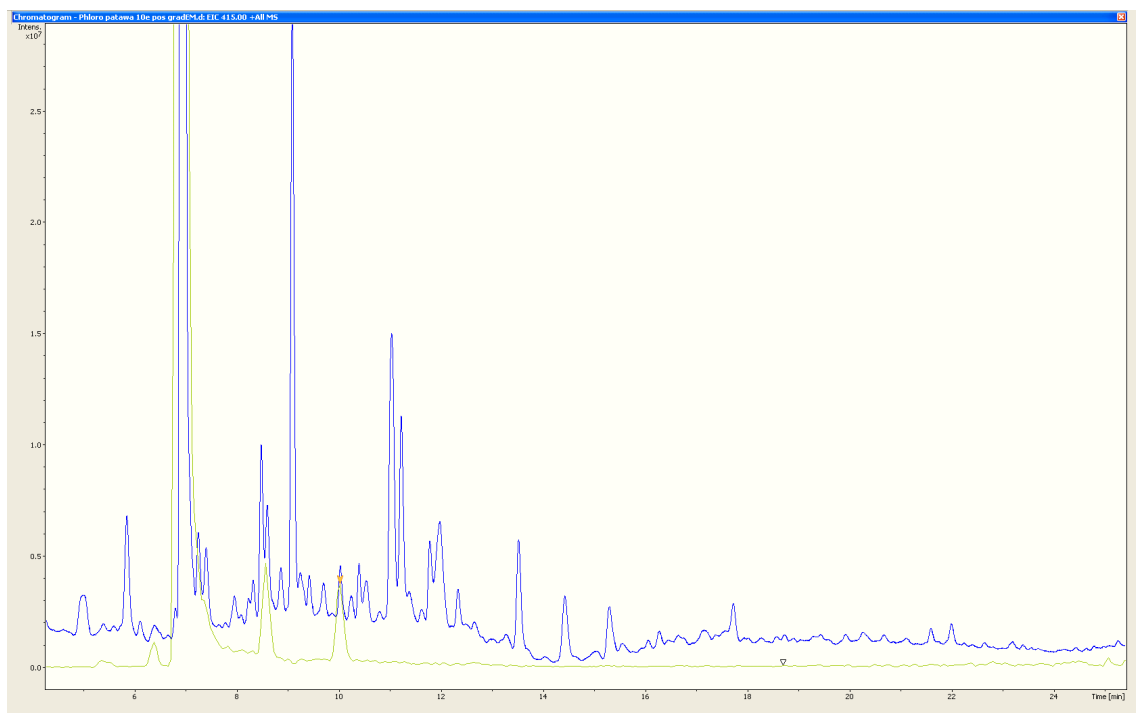


Figure 78 : Extraction d'ion à la masse 415

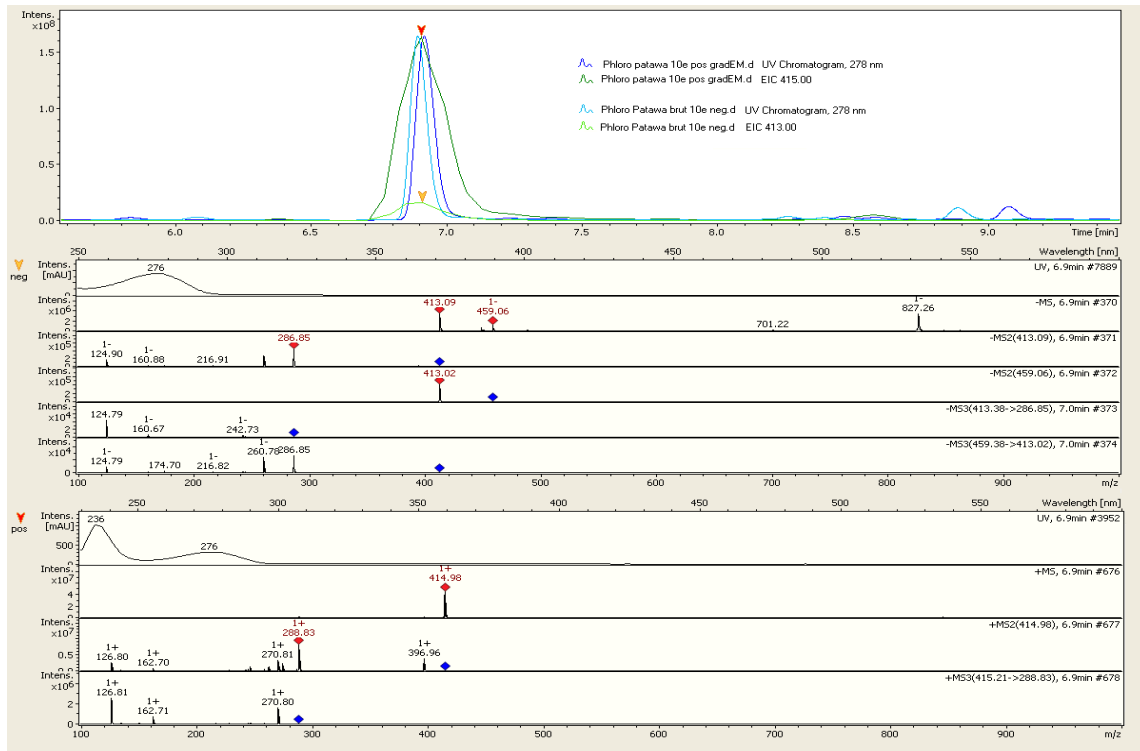


Figure 79 : Fragmentation du pic à 7 minutes

Si on se base sur l'ordre d'élution des On a la catéchine phloro vers 6.5 minutes et l'épicatéchine phloro vers 7 minutes.

Les pics à 8.5 et à 10 minutes n'ont pas été attribués. En effet, le pic à 10 minutes présente le spectre de la Figure 80 :

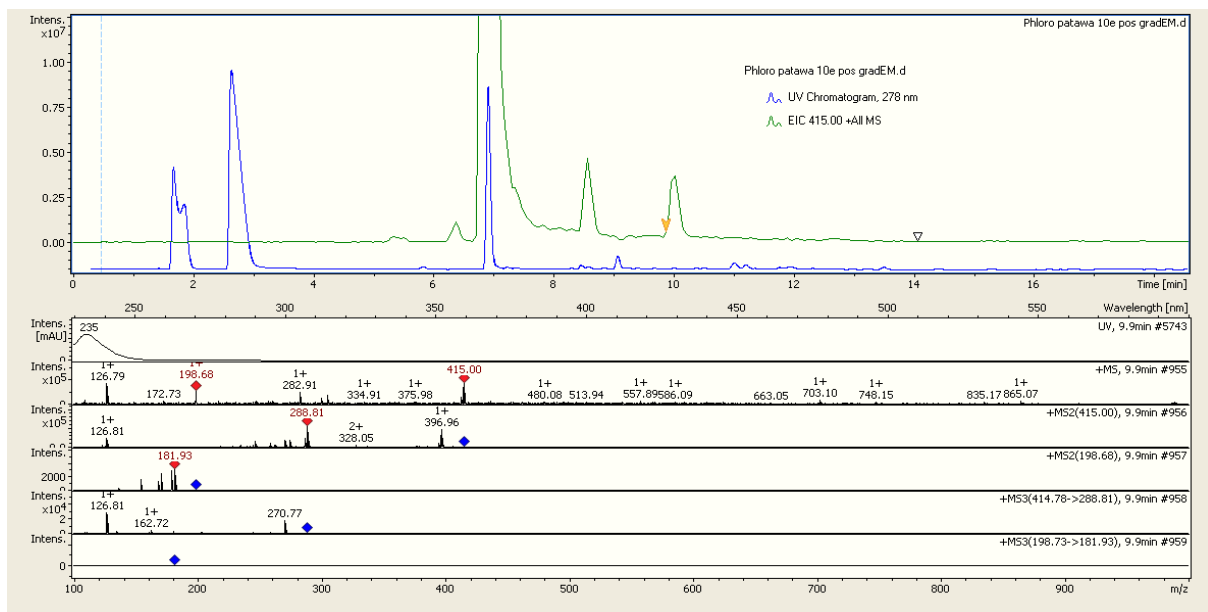


Figure 80 : Spectre du pic à 10 minutes

La fragmentation semble être celle d'un dérivé phloro. L'hypothèse qu'il s'agisse des composés phloro formés en 2 et non en 4 avec la catéchine et l'épicatéchine a été faite, mais

ce composé ouvre le cycle et la masse attendue serait 417. Il pourrait s'agir des isomères (+)- de l'épicatéchine et (-)- de la catéchine ayant formé des dérivés phloro.

➤ **Recherche des monomères épicatechinegallatephloro**

L'extraction d'ions à 567 à partir du chromatogramme de l'échantillon ayant subi la phloroglucinyse (Figure 81) correspond à l'épicatéchine gallate phloro.

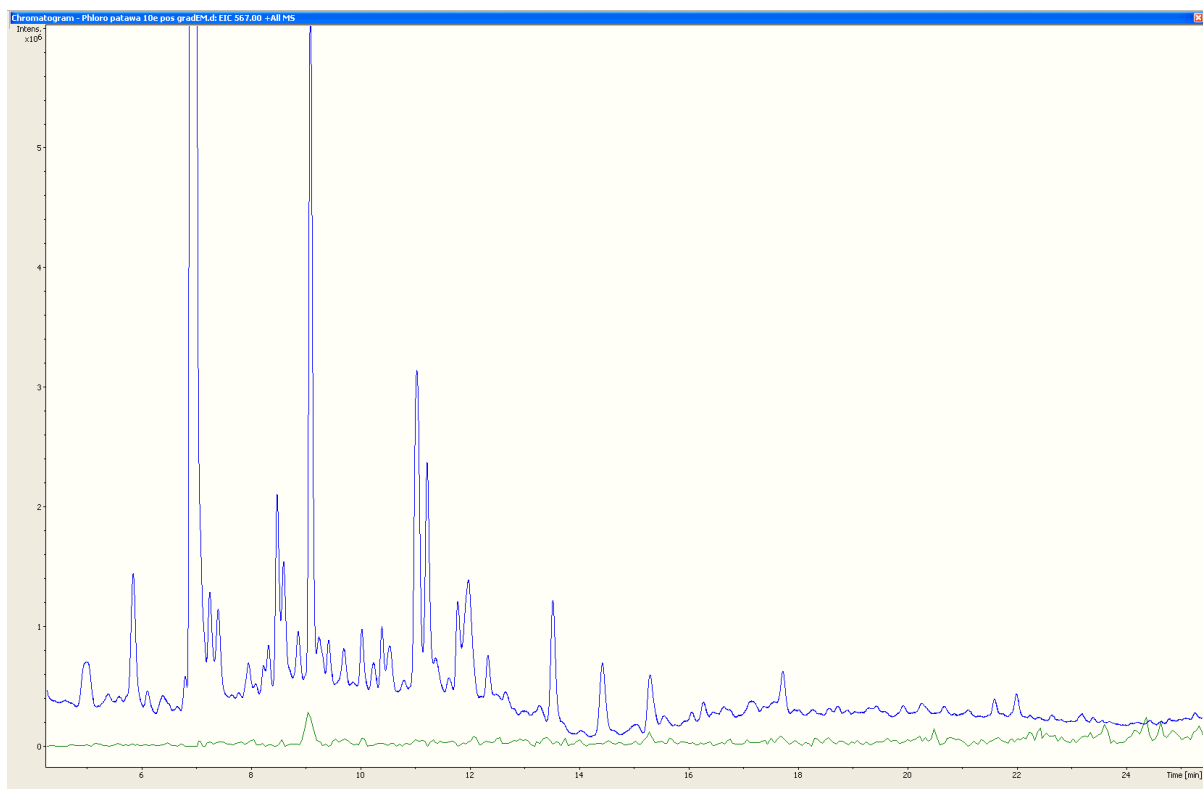


Figure 81 : Extraction d'ions à la masse 567

Le pic vers 9 minutes peut amener à penser à la présence d'épicatéchine gallate phloro, mais en très faible quantité.

➤ **Recherche des monomères épicatechine gallate**

L'extraction d'ions à 443 à partir du chromatogramme de l'échantillon ayant subi la phloroglucinyse (Figure 82) correspond à l'épicatéchine gallate. Il ne semble pas y avoir d'épicatéchine gallate dans l'échantillon.

➤ Recherche des monomères épigallocatechine

L'extraction d'ions à 307 à partir du chromatogramme de l'échantillon ayant subi la phloroglucinolyse (Figure 83) correspond à l'épigallocatechine. Le pic vers 11 minutes semble indiquer la présence d'épigallocatechine, mais en très faible quantité.

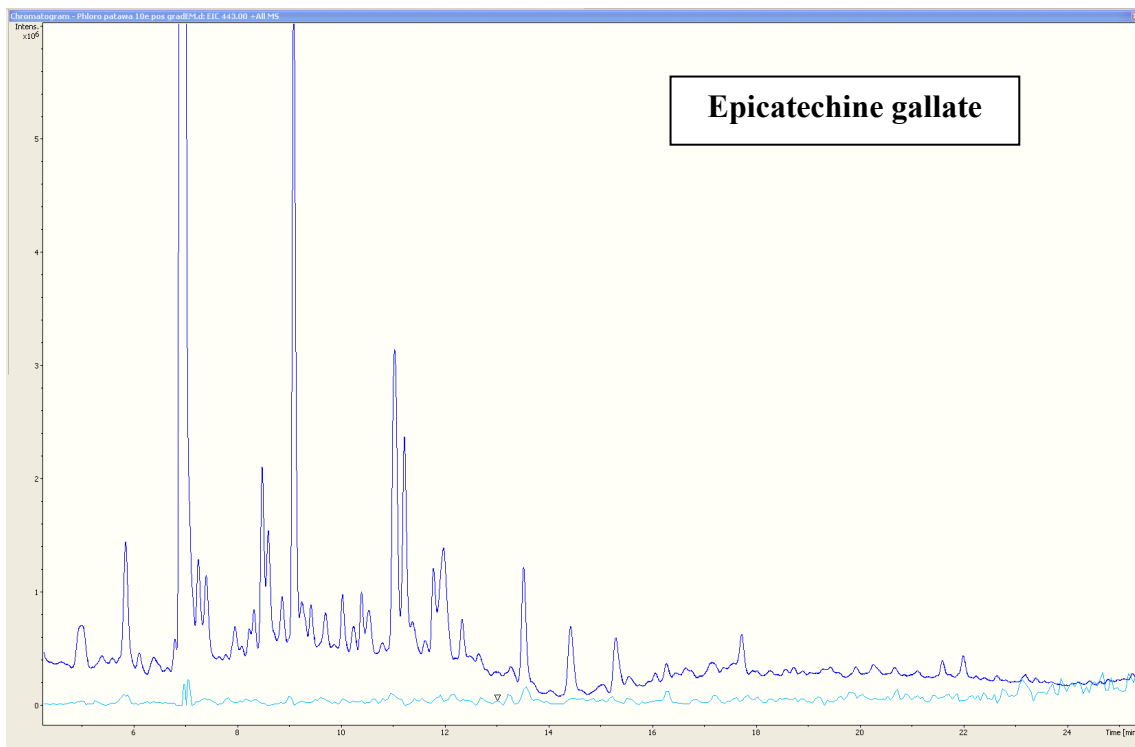


Figure 82 : Extraction d'ions à la masse 443

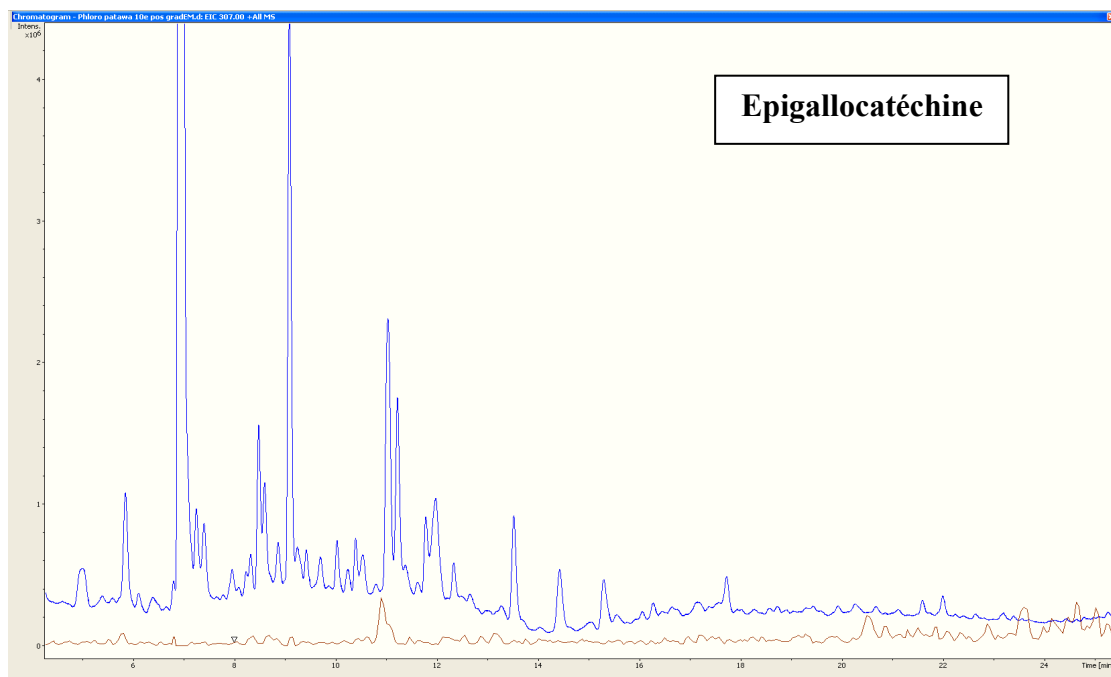


Figure 83 : Extraction d'ions à la masse 307

➤ **Recherche des monomères épicatechine gallate phloro**

Il est possible d'avoir la présence d'épicatechine gallate phloro alors qu'on ne trouve pas d'épicatechine gallate libre. Dans tous les cas, sa quantité est très faible.

La détermination des composés précédents nous permet de définir l'ordre d'élution suivant (Tableau 33) :

Nom du composé	masse	Temps de rétention (minutes)
Catéchine phloro	415	6.5
Epicatechinephloro	415	7
Catéchine	291	8.6
Epicatechine gallate phloro	567	9
Epicatechine	291	11
Epigallocatechine	307	11
Epicatechine gallate	443	n.d.
Epigallocatechinephloro	431	n.d.

Tableau 33 : Temps d'élution des composés déterminés lors du dosage par phloroglucinolyse

Les tanins trouvés correspondent donc plutôt à des polymères de catéchine et d'épicatechine, sans galloylations.

Les masses ayant été recherchées correspondent aux tannins du raisin (tanins condensés de type proanthocyanidines). Si d'autres types de tanins existent (tanins hydrolysables de type gallotanins ou ellagitanins), ou autres types de tanins condensés (prodelphinidines, profisetinidines, proguibourtinidines, prorobinétidines), les masses des monomères correspondant n'ont pas été cherchées.

III.4.2.2 Analyse quantitative

Les aires correspondant aux pics ci-dessus identifiés, étant plus grandes dans le cas de l'extrait brut de patawa dilué au dixième. Il a été conclu que la phloroglucinyse, dans le cas d'une dilution au quinzième n'était pas totale. C'est donc cette première dilution qui a servi pour la suite de l'étude.

Les résultats quantitatifs liés à la phloroglucinyse de l'extrait brut de patawa sont renseignés dans le Tableau 34.

	Extrait de patawa MEM (dilution au 1/15 ^{ème})
Degré de polymérisation moyen	20,22 ± 0,36
Teneurs en proanthocyanidines (mg/g d'extrait sec)	178.14 ± 2,90
Teneurs en proanthocyanidines (mg/g MS)*	17.81 ± 0,30

Tableau 34 : Degré de polymérisation moyen et teneurs en proanthocyanidines du MEM

*Déterminée à partir du rendement d'extraction : voisin de 10 %

On peut donc estimer qu'on se situe aux alentours de 18,0 mg/g de matière sèche de proanthocyanidines, constituées essentiellement d'épicatéchine, avec un DP moyen voisin de 20.

En considérant le taux d'humidité de 30 % évalué lors de la dessiccation du MEM, ce résultat devient 12,6 mg de proanthocyanidines par gramme de matière fraîche. Il peut alors être comparé aux valeurs expérimentales déterminées lors de l'étude de six cultivars différents de raisin *Vitis vinifera* pour laquelle des valeurs s'échelonnant de $4,9 \pm 0,22$ à $17,9 \pm 0,42$ mg /g de matière fraîche ont été trouvées [Bordiga *et al.*, 2011].

Dans le cas de nos travaux, la méthode de quantification des proanthocyanidines par dosage au DMACA permet d'aboutir à une valeur plus faible d'environ $4,0 \pm 1,2$ mg EC / g MS. Les différences observées proviennent vraisemblablement des différentes techniques utilisées, en considérant le fait que la méthode spectrophotométrique est moins sensible que la méthode chromatographique.

Pour compléter ces données, des analyses de quantification des proanthocyanidines de l'açaï devraient être envisagées par la suite.

III.5 Dosages des vitamines E et C du MEM et de l'açaï

Les concentrations vitaminiques E et C ont été évaluées sur de la poudre lyophilisée des deux fruits. Lors de l'extraction en parallèle de la vitamine E, des différences de comportement entre les deux fruits ont été observées. En effet, dans un premier temps, juste avant la réaction de saponification, la couleur du milieu réactionnel était très différente (vert clair pour le MEM et vert foncé pour l'açaï) et enfin, lors des différentes étapes d'extraction en phase liquide-liquide des tocophérols par décantation, le MEM présentait une forte émulsion. Cette dernière ayant été cassée par l'utilisation d'une solution saturée de chlorure de sodium (Figure 84).

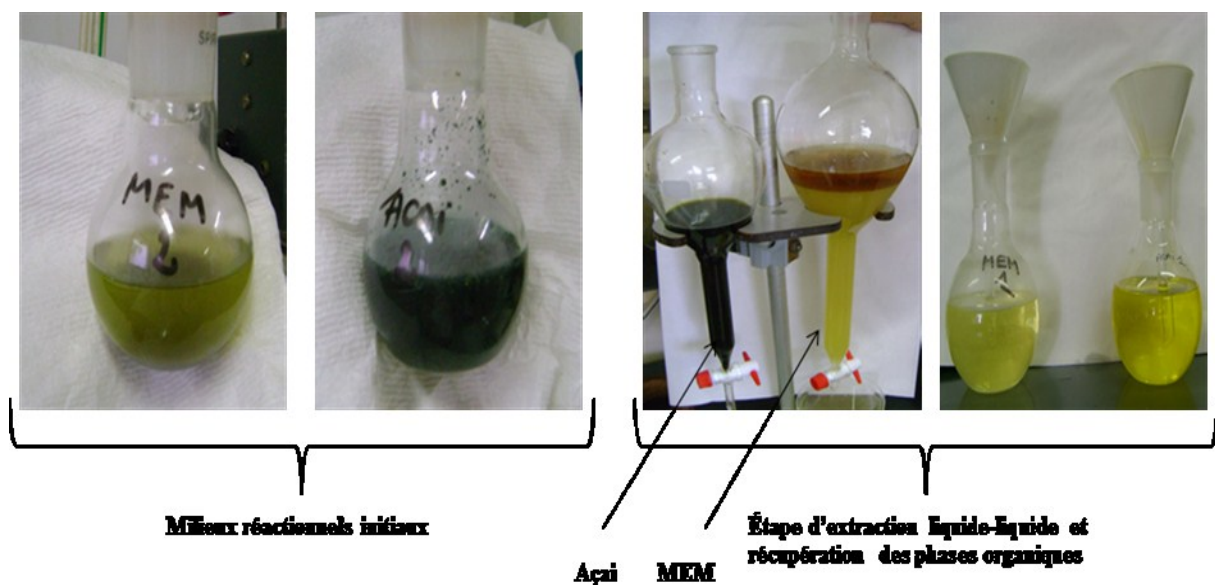


Figure 84: Comportement des deux fruits lors de l'étape d'extraction de la vitamine E

Les résultats des teneurs en vitamines des poudres disséquées de patawa et d'açaï sont présentés dans le Tableau 35.

Fruits	Vitamine E (mg α -T/100g MS)				Vitamine C (mg Vit C/100g MS)	
	Valeur déterminée de l' α - tocopherol	σ	Valeur déterminée des autres tocopherols	σ	Valeur déterminée	σ
Patawa	6,1	0,1	3,5	0,1	ND ^c	/
Acai	13,5	0,7	ND ^c	/	20,1	0,5

Tableau 35 : Quantités vitaminiques (E et C) d'extrait de MEM et d'açaï

c : ND : Non Détecté

Les quantités mesurées d' α -tocophérol sont deux fois plus importantes dans le cas de l'açaï. Cependant, seuls les autres tocophérols (β , γ et δ) ont été détectés dans la poudre de patawa. Ces résultats semblent en accord avec les données bibliographiques. Les quantités d' α -tocophérol du patawa varient entre 5,7 (\pm 0,3) à 7,9 (\pm 0,3) mg d' α -T/100 g MS. La somme des autres tocophérols a été évaluée à 1,6 (\pm 0,1) d' α -T/100 g MS [Da Cruz Rodrigues *et al.*, 2010; Darnet *et al.*, 2011]. Costa *et al* (2010) ont dosé l' α -tocophérol et l'ont évalué à 14,5 (\pm 0,0) /100 g de fruits et n'ont pas non plus détecté les autres formes de tocophérols.

L'açaï contient une quantité non négligeable de vitamine C, alors même que celle-ci n'est pas présente dans le patawa. Ces résultats contredisent certains auteurs qui montrent l'absence de vitamine C dans l'açaï [Hassimotto *et al.*, 2005; De Rosso et Mercadante, 2007].

Toutefois, plusieurs auteurs ont proposé, au travers d'études sur la quantification de la vitamine C de différents fruits exotiques ou non, que celle-ci est directement dépendante du stade de maturation du fruit. Il apparait que cette concentration est maximale lors de la phase de pré-maturation pour finalement diminuer tout au long de la maturation [Vinci *et al.*, 1995; Iordanescu *et al.*, 2012]. Par conséquent, le stade de maturité des baies pourrait être à l'origine de cette différence observée.

Les teneurs plus élevées en vitamine E et C dans l'açaï contribuent à expliquer les bons résultats d'AO observés pour l'extrait acétonique. En effet, la présence de ces micro-constituants engendre des phénomènes de synergie liés à l'AO intervenant entre les molécules polyphénoliques, l' α -tocophérol et la vitamine C. Ces effets synergétiques étant directement associées à la régénération de la vitamine E induite par les polyphénols mais aussi par la vitamine C [Dai *et al.*, 2008].

III.6 Bioguidage et élucidation structurale relatifs à l'extrait acétonique du MEM

III.6.1 Premières analyses qualitatives de l'extrait brut acétone/eau du MEM par HPLC et spectroscopie UV

L'extrait brut sélectionné du MEM a été étudié dans les mêmes conditions que les tissus précédents. Les chromatogrammes à 280, 320, 360 et 520 nm ont été extraits et analysés (Figure 85).

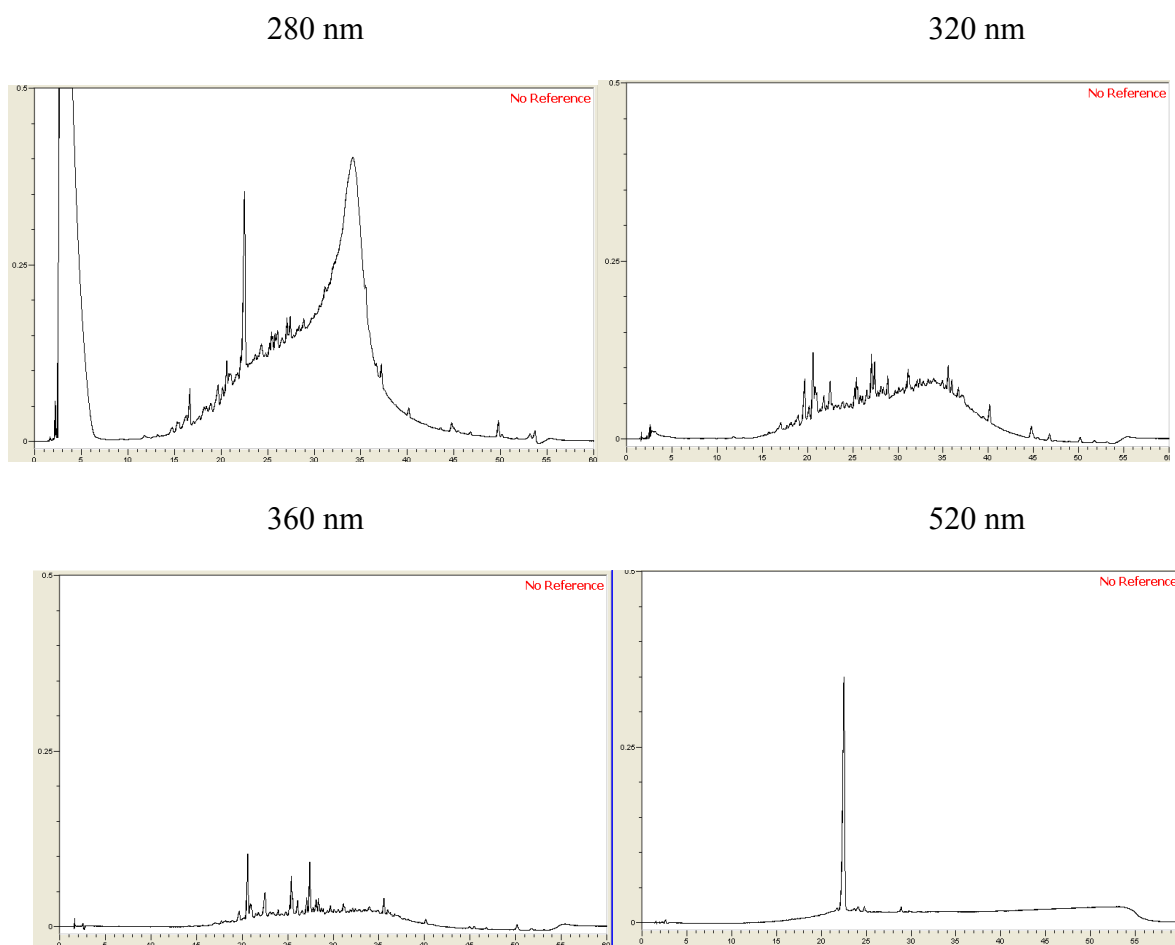


Figure 85 : Chromatogrammes de l'extrait hydroacétonique du mésocarpe à différentes longueurs d'onde

Le chromatogramme à 280 nm présente le même profil que celui du mésocarpe à la même longueur d'onde. On y distingue une bosse et un la présence d'un pic haut et large qui n'est pas visible à 320nm. De nombreux pics sont présents à 320 alors qu'une quantité moins importante est visible à 360 nm. De plus, on retrouve la présence de composés anthocyanes à 520 nm. Les extraits bruts du MEM ont été analysés qualitativement en présence des

mélanges qualitatifs présentés précédemment. Les analyses ont été effectuées sur des extraits de concentration égale à 40g/l (échelle des ordonnées allant de 0 à 500 mAU Figure 86).

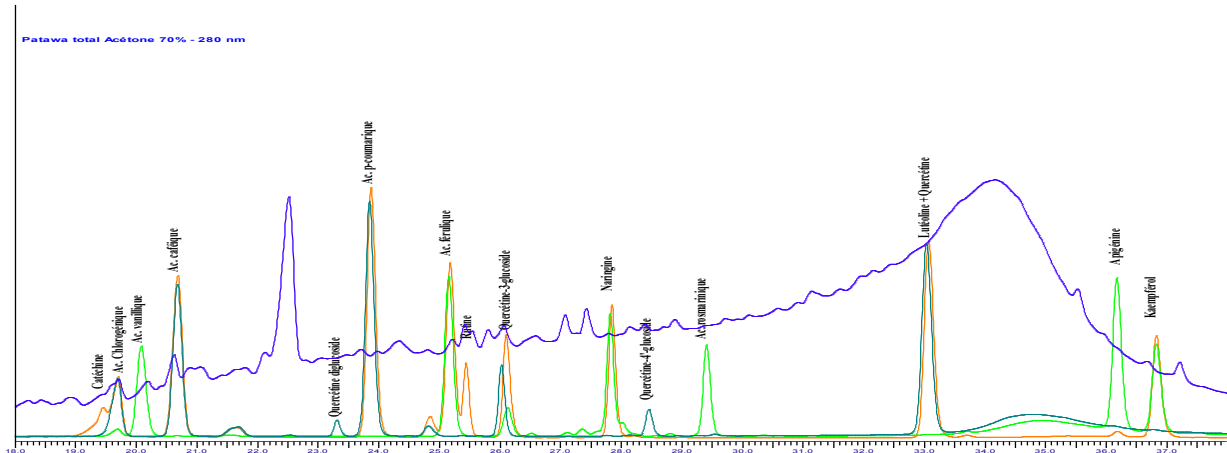


Figure 86 : Superpositions des chromatogrammes de l'extrait brut acétonique du MEM et des mélanges qualitatifs

Composés phénoliques testés	Famille (poly)phénolique	Tr (min)	λ_{max} (nm)	Présence potentielle des composés dans l'extrait brut (comparaison des Tr)	Présence potentielle des composés dans l'extrait brut (comparaison des spectres UV)
Acide gallique	Acide hydroxybenzoïque	9,46	280	non	non
Catéchine	Flavanol	19,45	280	oui	oui
Acide chlorogénique	Acide hydroxycinnamique	19,71	280, 345	oui	oui
Acide vanillique	Acide hydroxybenzoïque	20,09	280	oui	non
Acide caféique	Acide hydroxycinnamique	20,69	280, 345	non	non
Quercétinediglucoside	Flavonol	23,31	280, 345	non	non
Acide p-coumarique	Acide hydroxycinnamique	23,87	280, 345	non	non
Acide férulique	Acide hydroxycinnamique	25,18	280, 345	oui	non
Rutine	Flavonol	25,44	280, 345	oui	oui
Quercétine 3- O-glucoside	Flavonol	26,1	280, 345	oui	oui
Naringine	Flavanone	27,85	280, 345	non	non
Quercétine-4'-glucoside	Flavonol	28,45	280, 345	non	non
Acide rosmarinique	Acide hydroxycinnamique	29,53	280, 345	non	non
Quercétine	Flavonol	33,07	280, 345	non	non
Apigénine	Flavone	36,17	280, 345	non	non
Kaempférol	Flavonol	36,82	280, 345	non	non

Tableau 36 : Étude comparative des temps de rétention et des spectres UV-visibles entre l'extrait brut de MEM et les mélanges qualitatifs

Nous détectons des pics aux temps de rétention de la catéchine, de l'acide chlorogénique, de l'acide vanillique, de l'acide caféique, de l'acide férulique, de la rutine (ou quercétine 3-O-rutinoside) et de la quercétine 3-O-glucoside. L'analyse des spectres UV confirme la présence de rutine, d'acide chlorogénique et de quercétine 3-O-glucoside (Tableau 36).

III.6.2 Comparaison chromatographique de l'épicarpe, du mésocarpe et du MEM

Dès investigations chromatographiques précédentes sur l'épicarpe et le mésocarpe, il est possible d'envisager de comprendre la répartition phytochimique des composés polyphénoliques dans le MEM. En plaçant tous les spectres à la même échelle, à 280 nm, on observe un massif qui s'étend de 15 à 40 minutes et qui provient de l'épicarpe, puis la bosse assez large et haute, chevauchant ce dernier et qui semble appartenir aux tanins s'étalant de 20 à 40 minutes est issue du mésocarpe (Figure 87). Certains pics se situent sous cette bosse et sont issus du mésocarpe. À 320 et 360 nm, on note que les pics majoritaires appartiennent également au tissu supérieur qu'est l'épicarpe tout comme les anthocyanes vues 520 nm (Figure 88, Figure 89 & Figure 90). Finalement, compte tenu des proportions relatives de chaque tissu, la majorité des pics provient de la peau du fruit, excepté pour la présence supposée des proanthocyanidines.

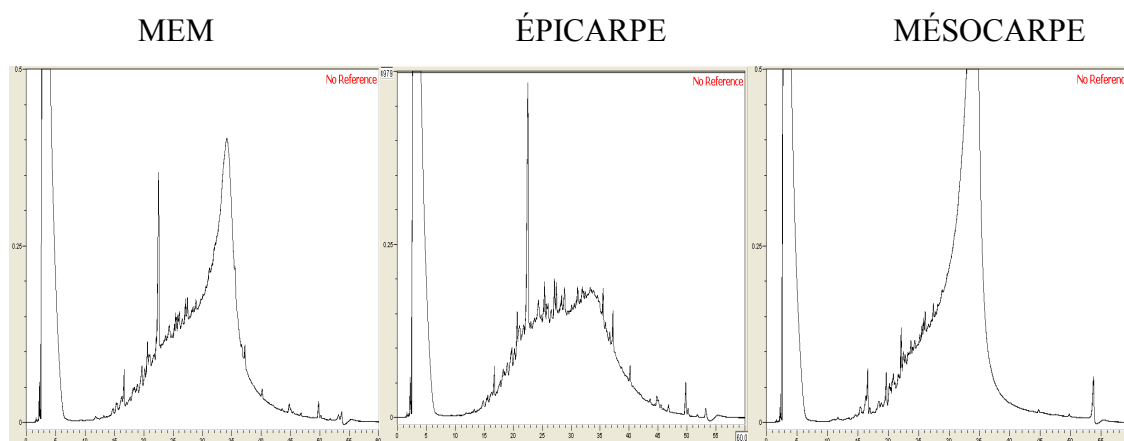


Figure 87 : Superpositions des chromatogrammes de l'épicarpe, du mésocarpe et du MEM à 280 nm

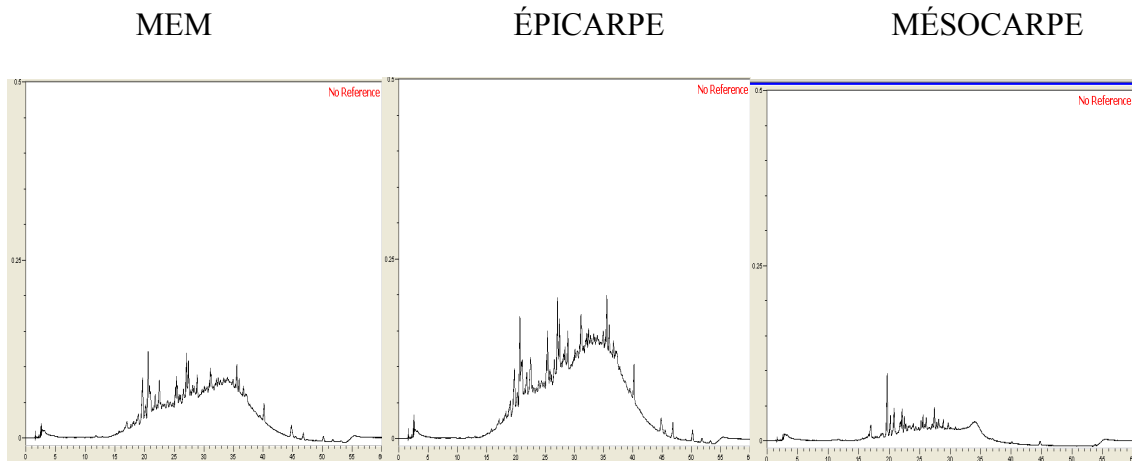


Figure 88 : Comparaison des chromatogrammes du MEM, de l'épicarpe et du mésocarpe à 320 nm

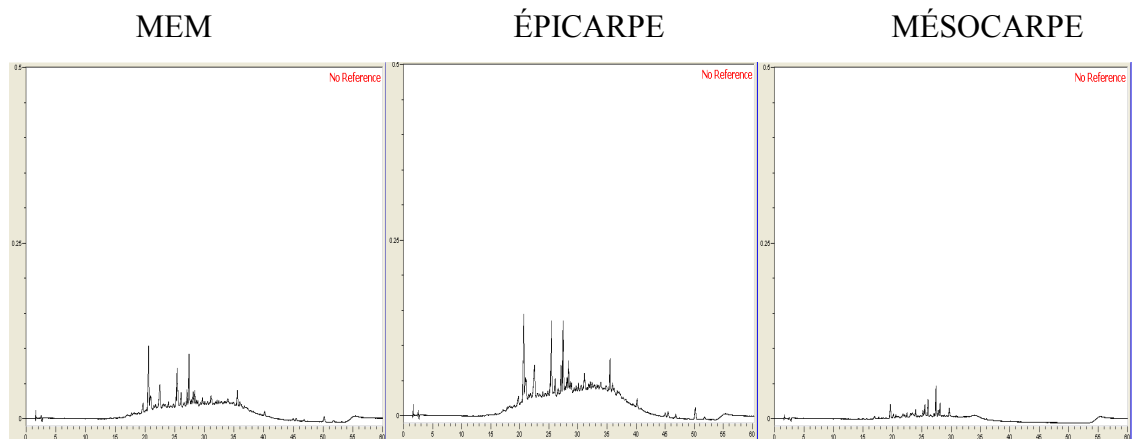


Figure 89 : Comparaison des chromatogrammes du MEM, de l'épicarpe et du mésocarpe à 360 nm

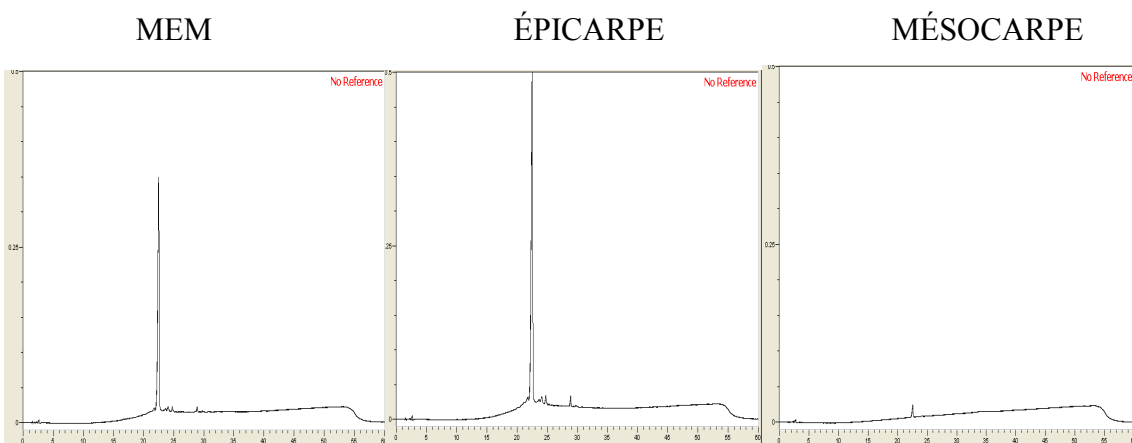


Figure 90 : Comparaison des chromatogrammes du MEM, de l'épicarpe et du mésocarpe à 520 nm

III.6.3 Fractionnement et analyse chromatographique de l'extrait brut de MEM étudié

La purification sur colonne Séphadex LH20 de l'extrait brut de MEM a été effectuée chronologiquement avant celle de l'extrait du mésocarpe. Ainsi, initialement, seuls deux solvants d'éluion ont été testés lors de la mise au point de ce fractionnement (Figure 91).

Six fractions sont obtenues lors de cette étape, et trois ont été analysées chromatographiquement. De gauche à droite sur la Figure 91, les trois premières fractions, notées F11, F12 et F13 ont été éluées avec un mélange Eau/MeOH/TFA (80/20/0,3%, v/v) et les trois dernières, F21, F22 et F23 obtenues avec un mélange Acétone/Eau (70/30, v/v).

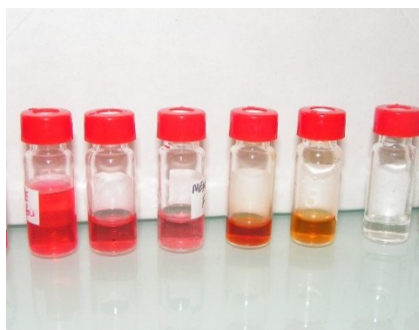


Figure 91 : Fractions obtenues à partir de la purification sur résine Séphadex LH-20 de l'extrait du MEM

Visuellement, on observe que les trois premières fractions possèdent la coloration due à la présence d'anthocyanes en milieu acide, mais également, la coloration des deux premières fractions issues de l'éluant apolaire laisse envisager des phénomènes de copigmentation, précédemment évoqués, entre anthocyanes et autres polyphénols, changeant ainsi la polarité des pigments colorés.

Les fractions F12, F13 et F22 ont été étudiées en priorité à 280, 320, 360 et 520 nm (Figure 92, Figure 93 & Figure 94).

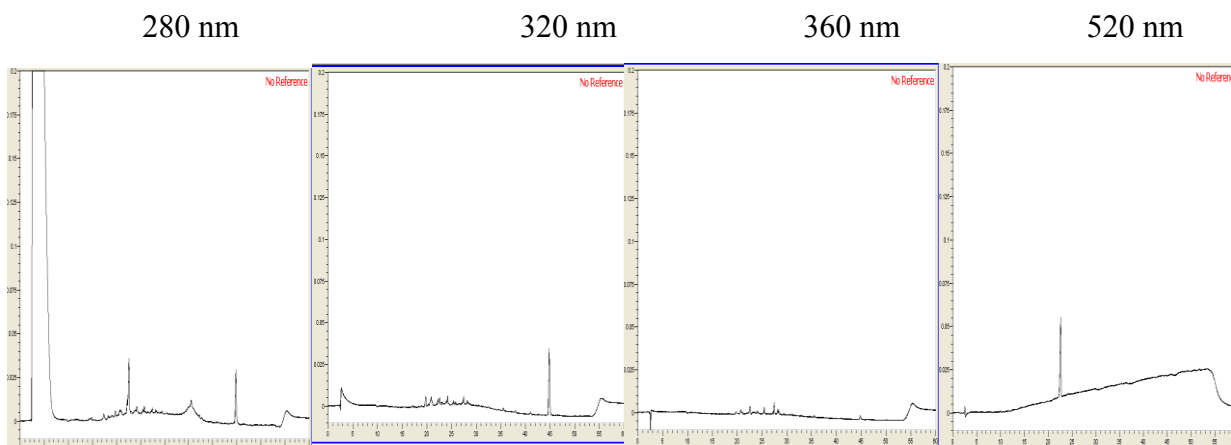


Figure 92 : Chromatogrammes de la fraction F12 de l'extrait d'intérêt du MEM

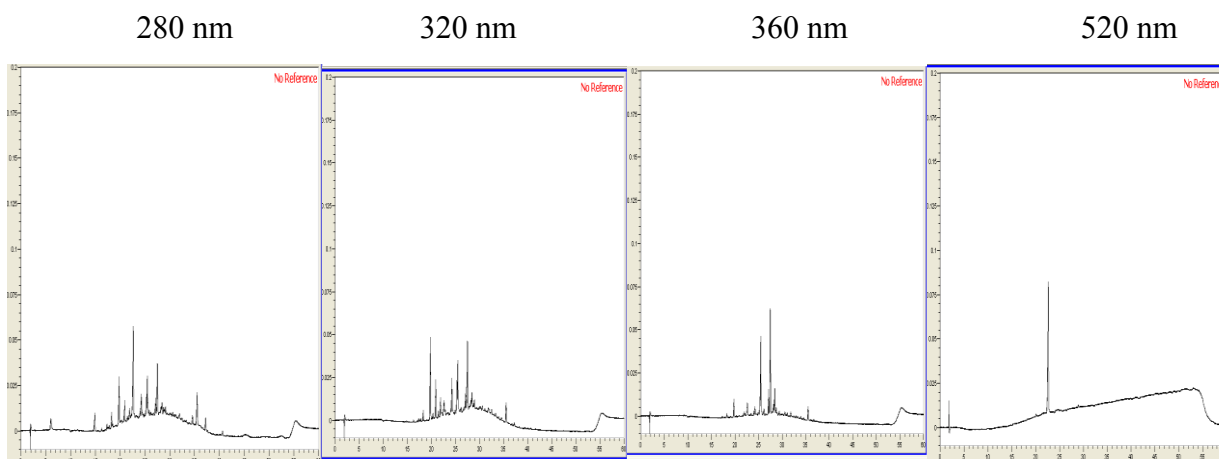


Figure 93 : Chromatogrammes de la fraction F13 de l'extrait d'intérêt du MEM

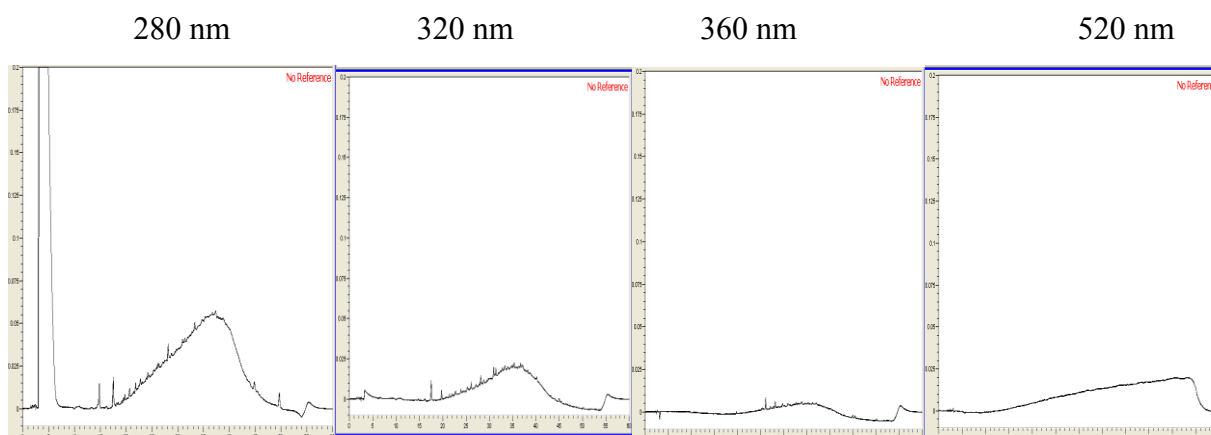


Figure 94 : Chromatogrammes de la fraction F22 de l'extrait d'intérêt du MEM

Les fractions F12 et F13 sont éluées avec le même solvant, elles possèdent donc, à priori, les molécules de même nature. La fraction F12 présente une assez bonne résolution avec la présence de deux pics majoritaire, dont l'un est observé à 320 nm ainsi que plusieurs autres composés et l'autre à 520 nm. Comme évoqué précédemment, il peut s'agir de plusieurs types de composés, comme des acides phénoliques, hydroxycinnamiques et/ou des stilbènes. La fraction apolaire F22 semble être majoritairement constituée de composés polymériques avec un massif assez prononcé à 280 et 320 nm s'étalant sur plus de la moitié du spectre. La nature polymérique de ces composés est cohérente avec le solvant l'élué utilisé. **Malien- Aubert et al (2002)** expliquent que le degré de polymérisation des procyanidines influe sur l'absorbance de certaines molécules anthocyanes comme la malvidine 3-*O*-glucoside. Ce phénomène de copigmentation déjà évoqué pourrait expliquer l'absence de pic à cette longueur d'onde, en dépit de la couleur observée de cette dernière fraction.

III.6.4 Activité antioxydante *in vitro* biologique des fractions purifiées de l'extrait d'intérêt du MEM

Les fractions du MEM ont été testées à la même concentration que celles de l'extrait brut dans le test KRL, tout comme l'étude des fractions du mésocarpe. Ainsi, les mêmes calculs ont-ils été effectués pour chaque résultat d'AO afin d'évaluer la contribution de celle-ci par rapport à l'extrait initial.

Il apparaît que toutes les fractions possèdent la même AO par rapport à l'extrait brut, et que cette contribution n'est que d'environ 2 %, malgré la nature différente des composés présents dans les fractions de polarité différente. Cela suggère, qu'à priori, les molécules polyphénoliques, ainsi que les tocophérols présents dans l'extrait de MEM, agiraient en synergie pour aboutir à une AO plus importante dans l'extrait initial. Cette hypothèse reste à approfondir en dosant toutes les fractions recueillies.

Guerra et al. (2005) sont parvenus à des observations et conclusions similaires en étudiant des fractions constituées d'un seul composé, et issues d'un extrait d'éther de coriandre. Ils ont ainsi pu montrer que l'AO de chaque fraction était toute inférieure à l'AO de l'extrait brut initial grâce aux effets synergiques intervenant entre les molécules, et en particulier dans ce cas grâce à la présence de caroténoïdes.

III.6.5 Détermination massique de quelques molécules de l'extrait brut étudié du MEM

Les travaux effectués sur cette partie ont été réalisés sur un système chromatographique UPLC, et avec des conditions de gradient différentes de celles utilisées précédemment (notamment par le choix du méthanol au lieu de l'acétonitrile). Les molécules séparées sont ensuite détectées par deux systèmes : un spectrophotomètre à barrettes de diodes suivi d'un spectrophotomètre de masse comportant une trappe ionique (ESI).

Ces deux derniers outils vont nous permettre de faire une étude multi paramétrée en tenant compte des spectres caractéristiques des molécules, des temps de rétention, des ions moléculaires dits « parent » et aussi des ions dits « fils » issus de la fragmentation de ces premiers.

L'analyse des composés en spectrométrie de masse a été conduite selon les deux modes d'ionisation possibles (mode positif et mode négatif). C'est dans le mode négatif que la majorité des composés ont présenté une meilleure réponse, et ont ainsi fait l'objet d'une tentative d'élucidation [Sun *et al.*, 1998].

Le spectre UV à 280 nm (Figure 95) présente une dérive de la ligne de base qui pourrait laisser penser à deux bosses de tanins qui seraient toutefois mieux séparées que précédemment car plus étalés.

Le **pic 1** (Tr= 6,8 min), le **pic 5** (Tr=9 min) et le **pic 6** (Tr = 9,6 min) présentent un spectre d'absorption identique présentant deux maxima à 290 nm et 325 nm ; soit dans la zone caractéristiques des acides hydroxycinnamiques [Robbins, 2003]. De plus, ces molécules partagent le même ion moléculaire $[M-H]^- = 353$ et un même ion fils d'un $m/z = 191$ en MS^2 . Soit, lors de la fragmentation, une perte de masse égale à 162 ; cette perte est classiquement attribuée à la perte d'un hexose ou d'un acide quinique. Il s'agirait donc d'un acide hydroxycinnamique glycosilé ou d'un acide chlorogénique. Le $m/z = 191$ est caractéristique de l'acide caféique, il s'agirait donc soit d'un acide caféique glycosilé soit d'un acide chlorogénique de type cafféoylquinique. Afin de trancher sur ces deux possibilités nous avons analysé ces molécules en ionisation positive. Celles-ci présentent toutes un ion moléculaire avec $m/z = 355$ confirmant le m/z obtenu en ionisation négative pour l'ion parent et en MS^2 un ion fils de 163 différents de l'ion fils obtenu en ionisation négative avec un $m/z = 191$. La

fragmentation a donc provoqué, dans ce cas, une perte d'un m/z de 192 soit la masse d'un acide caféique. De même, le fragment fils présente un m/z de 163, soit la masse d'un glucose ou d'un acide quinique additionné d'un proton. Toutefois, il est probable que lors d'une fragmentation, le sucre s'ionise [Jin *et al.*, 2008]. De ce fait, le fait de trouver un fragment à 163 nous permet de penser que nous sommes en présence d'un acide quinique. Ces éléments permettent de justifier la présence **d'acides chlorogéniques de type cafféoylquinique**.

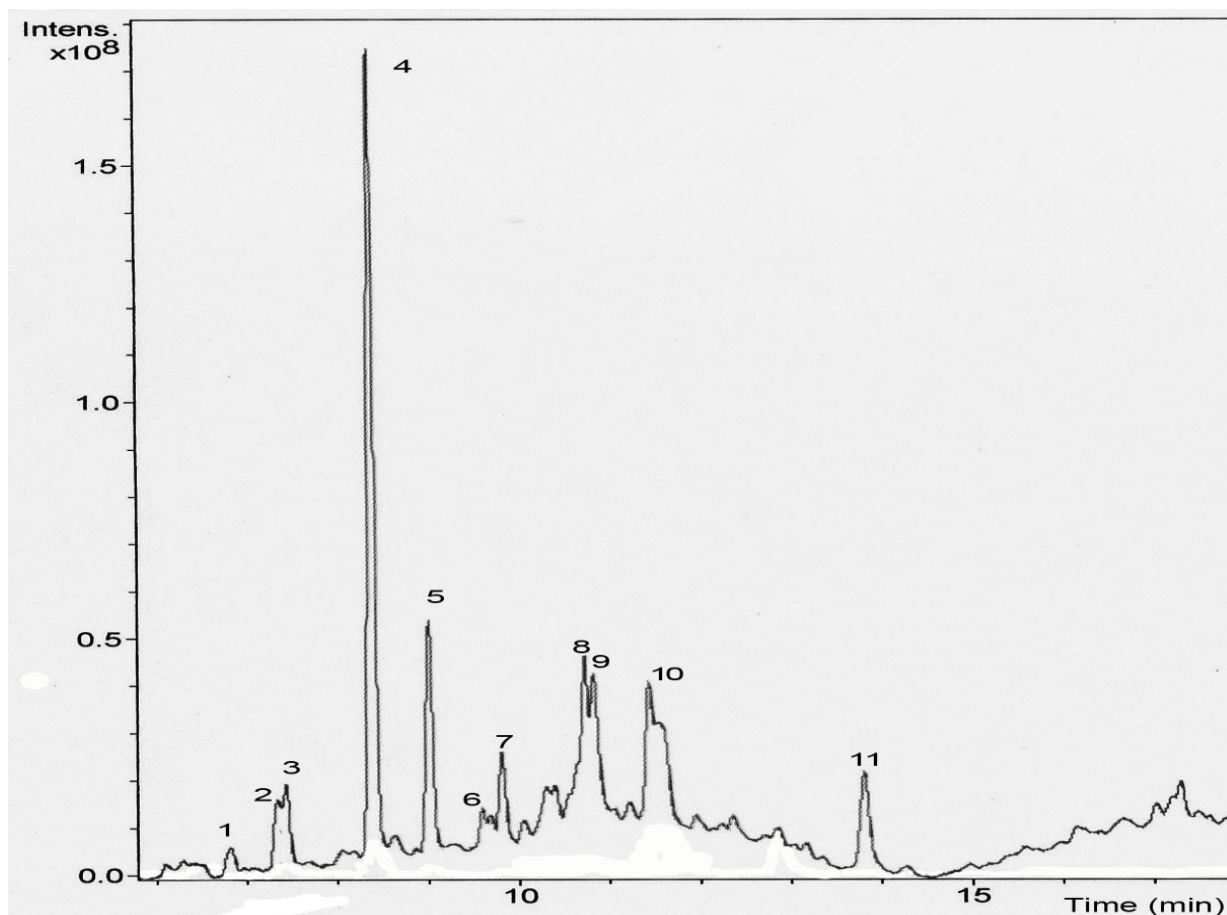


Figure 95 : Spectre UV de l'extrait hydroacétonique du MEM à 280 nm

Afin de différencier les acides, car plusieurs isomères peuvent exister en fonction du site de liaison entre acide quinique et l'acide caféique, nous nous sommes basés sur la publication de Clifford *et al.* (2003) qui permet de différencier les différents isomères, en tenant compte de la présence ou de l'absence d'ion fils minoritaires et de leurs abondances. Ainsi, semblerait-il que le pic 1 correspondrait à l'isomère : **acide 3-O-cafféoylquinique (3-CQA)** puisqu'un des

pics fils minoritaires d'un $m/z = 179$ présente une abondance correspondant approximativement à 50% du pic fils majoritaire à $m/z = 191$.

Le pic 5 correspondrait à l'isomère : **acide 5-O-cafféoylquinique (5-CQA)** puisqu'un des pics fils minoritaires d'un $m/z = 179$ présente une abondance faible correspondant à moins de 5 % du pic fils majoritaire.

Le pic 6 correspondrait à l'isomère : **acide 4-O-cafféoylquinique (4-CQA)**. Dans ce cas, le pic fil majoritaire présente un $m/z = 173$ [Clifford *et al.*, 2003].

Le pic 2 ($Tr = 7,3$ min), et **le pic 3** ($Tr = 7,4$ min), présentent tous deux un maximum d'absorption à 260 nm, caractéristique des acides hydroxybenzoïques. De même, lors de l'ionisation en mode négatif, un pic moléculaire d'un $m/z = 359$ est produit. Celui-ci est confirmé par la présence en ionisation positive d'un pic à 361 même si ce dernier est faible. En MS², une perte de $m/z = 162$ donne naissance à un ion fil de $m/z = 197$, celle-ci correspond à la perte d'un hexoside. Le $m/z = 197$ correspondrait au 2,3,4-trihydroxybenzoate d'éthyle, l'acide syringique ou encore le gallate d'éthyle. En MS³, le fragment de $m/z = 197$, après fragmentation donne deux fragments : de $m/z = 182$ et de $m/z = 153$ correspondant à une perte respectivement de 15 et de 44, ce qui correspondrait respectivement à la perte d'un CH₃ et d'un CO₂. Ces deux groupements ne sont présents que dans l'acide syringique. Les pics 2 et 3 devraient donc être des **hexosides d'acide syringique**. Nous avons donc ici à faire vraisemblablement à deux isomères de position.

Le pic 4 ($Tr = 8,4$ min), présente un pic d'absorption maximal à 325 nm et un épaulement à environ 300 nm, longueur d'onde caractéristique des acides hydroxycinnamiques et plus particulièrement des stilbènes [Stecher *et al.*, 2001]. De même, lors de l'ionisation en mode négatif, un pic moléculaire d'un $m/z = 567$ et un second d'un $m/z = 603$. Ce dernier étant dû à la présence d'un adduit formiate (différence de 46 entre les deux ions) puisque celui-ci redonne lors de sa fragmentation en MS² le pic moléculaire d'un $m/z = 567$. En partant de l'hypothèse, basée sur les données spectroscopiques selon laquelle, la molécule recherchée serait un stilbène nous avons recherché l'ion $[M+36-H]$ [Hu *et al.*, 2009], soit l'ion $m/z = 603$ caractéristique des stilbènes glycosylés. Celui-ci est présent bien que faible, représentant environ 10 % du pic moléculaire à 567. La fragmentation en MS² de ce dernier ion donne deux ions fils ; l'un minoritaire d'un $m/z = 243$ et l'autre majoritaire d'un $m/z = 405$. Ce dernier, lors de sa fragmentation en MS³ donne un pic d'un $m/z = 243$. Ces pertes successives

correspondent à la perte de 2×162 soit la perte supposée de deux hexoses. L'aglycone, présentant un $m/z = 243$, pourrait ressembler à un dérivé du resvératrol (hydroxylation) dont la masse caractéristique serait égale à $m/z = 227 + 16 = 243$. Le pic 4 devrait donc correspondre à un dérivé **dihexoside d'un resvératrolhydroxylé**. L'absence de maximum d'absorption à 280 nm nous permettent de penser que nous aurions affaire à l'isomère (*E*) de ce stilbène [Hu *et al.*, 2008].

Le pic 7 ($T_r = 9,9$ min), présente trois maxima d'absorption à 283 nm, 303 nm et 315 nm. L'allure et les maximums d'absorption sont caractéristiques de stilbène et, plus particulièrement, des isomères (*Z*), dû à la présence d'un maximum d'absorption à 280 nm [Hu *et al.*, 2008]. De même, lors de l'ionisation en mode négatif, on observe un pic moléculaire minoritaire d'un $m/z = 551$, et un second majoritaire d'un $m/z = 597$. Ce dernier étant dû à la présence d'un adduit formiate (différence de 46 entre les deux ions) puisque celui-ci redonne en MS^2 l'ion minoritaire d'un $m/z = 551$. En partant de l'hypothèse basée sur les données spectroscopique, selon laquelle la molécule recherchée serait un stilbène, nous avons recherché l'ion $[M+36-H]^-$ soit l'ion d'un $m/z = 587$ caractéristique des stilbènes glycosylés. Celui-ci est bien présent. La fragmentation en MS^2 de l'ion d'un $m/z = 597$ donne trois ions fils ; l'un d'un $m/z = 551$, le second d'un $m/z = 399$ et le dernier minoritaires d'un $m/z = 227$. Lors de la fragmentation de l'ion moléculaire d'un $m/z = 399$ en MS^3 , on obtient un pic d'un $m/z = 227$. Ces pertes successives correspondent à la perte de 2×162 soit la perte supposée de deux hexoses. L'aglycone, présentant un $m/z = 227$ dériverait d'un stilbène équivalent au resvératrol. Il est à noter que les fragments obtenus dans ce cas, en MS ($m/z = 553$), MS^2 ($m/z = 391$) et MS^3 ($m/z = 227$) confirment ces résultats. Le pic 7 devrait correspondre donc à un **dihexoside de (*Z*) resvératrol**.

Le pic 8 ($T_r = 10,7$ min) et **le pic 9** ($T_r = 10,8$ min), présentent, respectivement, trois maxima d'absorption à 286 nm, 303 nm et 324 nm et pour le second, 283 nm, 306 nm et 322 nm. L'allure et les maxima d'absorption sont caractéristiques de stilbènes et, plus particulièrement, des isomères (*Z*), en raison de la présence d'un maximum d'absorption à 280 nm [Hu *et al.*, 2008]. Ces deux composés présentent un même ion moléculaire d'un $m/z = 627$, des ions fils, en MS^2 , présentant respectivement un $m/z = 581$ montrant encore une fois la présence d'un adduit formiate et d'un $m/z = 419$. La présence de l'ion $[M+36-H]^-$ a été investigué, soit l'ion d'un $m/z = 617$, caractéristique des stilbènes glycosylés. Celui-ci est bien présent dans les deux cas. En MS^3 , la fragmentation de ce dernier donne un ion d'un $m/z =$

257. De même que précédemment, ces pertes correspondent à la perte de 2×162 , soit la perte supposée de deux hexoses. L'aglycone, dans ce cas, présenterait un $m/z = 257$ qui dériverait d'une molécule équivalente à un resvératrol méthoxylé ($227 + 16 + 12 + 3$). De même que précédemment, les fragments de MS, MS^2 et MS^3 , en ionisation positive, confirment les résultats observés. Les pics 8 et 9 devraient correspondre à deux isomères d'une molécule équivalente à un **dihexoside d'un resveratrol méthoxylé**.

Le pic 10 ($Tr = 11,55$ min), à l'instar d'autres pics, relève d'une co-élution. Celle-ci se trouve être fort problématique puisque trois molécules majoritaires présentent des temps de rétention très proches : 11,47 mn; 11,55 mn et 11,61 mn. Seule une molécule a été clairement identifiée au temps de rétention 11,5 mn, son signal empêchant l'analyse des deux autres molécules. Pour ces dernières ($Tr = 11,47$ et 11, 61 min), l'allure et les maxima d'absorption (respectivement 281 nm, 305 nm et 320 nm, et, pour le second, 283 nm et 325 nm) sont caractéristiques de stilbènes, et plus particulièrement des isomères (Z), dû à la présence d'un maximum d'absorption à 280 nm [Hu *et al.*, 2008]. Le composant à $Tr = 11,55$ min présente deux maxima à 279 nm et 516 nm, caractéristiques des anthocyanes. Dans ce cas, l'analyse est conduite principalement en mode d'ionisation positif. Un pic moléculaire d'un $m/z = 595$ est observé. Celui-ci se fragmente, en MS^2 , en deux ions fils. Le premier, minoritaire, présente un $m/z = 449$ et le second, majoritaire, un $m/z = 287$. Ce qui correspond respectivement à une perte de 162 et de 308 par rapport à l'ion moléculaire. La différence entre les deux ions fils nous donne une masse de 146 soit la masse d'un désoxyhexoside méthylé tel que le rhamnose. L'aglycone d'un $m/z = 287$ correspondrait à une cyanidine. Le pic 10 devrait correspondre à la **cyanidine rutinoside**. On pourrait penser à la cyanidine-3-O-rutinoside, présente chez de nombreux végétaux, et récemment isolée chez un palmier du même genre (*Oenocarpus bacaba* Mart.) [Abadio Finco *et al.*, 2012]. Toutefois, les nombreuses co-élutions observées dans l'extrait n'ont pas permis d'identifier la cyanidine 3-O-glucoside, dont la présence a été envisagée précédemment.

Le pic 11 ($Tr = 13,9$ min), présente trois maxima d'absorption à 286 nm, 305 nm et 322 nm. Ces derniers et l'allure du spectre sont caractéristiques de la famille des stilbènes, et, plus particulièrement, des isomères (Z), dû à la présence d'un maximum d'absorption à 280 nm [Hu *et al.*, 2008]. De même, lors de l'ionisation en mode négatif, on observe un pic moléculaire d'un $m/z = 243$. Sa fragmentation en MS^2 donne trois ions fils d'un m/z chacun de 225 ; 199 ; 175. Ces derniers fragment sont caractéristiques de la fragmentation du trans-

resvératrol comme le confirme les travaux de **Huang *et al* (2010)** . Le pic 11 correspondrait à une molécule équivalente au **resvératrol trans**.

L'ensemble de ces analyses révèle la présence importante de stilbènes et, dans un moindre mesure, d'acides chlorogéniques. Toutefois, elles constituent, pour la plupart, des hypothèses qu'il conviendra d'approfondir au moyen de méthodes d'analyses plus élaborées.

III.7 Conclusion

Les études séparées de l'épicarpe et du mésocarpe ont permis d'aboutir aux conditions optimales d'extraction des composés bioactifs et de l'AO mesurée par le test DPPH du MEM.

Les AO des extraits sélectionnés de MEM ont été comparées à celles des extraits d'açaï et de thé vert élaborés dans les mêmes conditions ainsi qu'à celle du mésocarpe du fruit du patawa. Sur les deux tests AO sélectionnés, le KRL et l'ORAC, le thé vert et le mésocarpe s'avèrent être plus antioxydants, avec une valeur intéressante pour l'açaï vis-à-vis de l'ORAC. On peut alors envisager que les anthocyanes et les vitamines, molécules les plus abondantes dans l'extrait d'açaï, réagiraient préférentiellement dans le test biologique dynamique global et le test biochimique [**Abadio Finco *et al.*, 2012**]. Les résultats très intéressants d'AO *in vitro* obtenus dans le cas de l'étude du mésocarpe devraient être poursuivis plus en détail, notamment sur la purification par fractionnement ainsi que l'élucidation des composés majoritaires.

La constitution du MEM est sans nul doute à l'origine de sa relative capacité antioxydante. Ainsi, compte tenu de la taille des tanins condensés présents, ces molécules ne sont-elles pas biodisponibles, et ne passent-elles pas la barrière intestinale. Par conséquent, nous pouvons envisager que ceux-ci ne passent pas, non plus, la membrane cellulaire, et ne seraient pas totalement dosés dans les tests KRL et ORAC. Ces tests mettent en lumière en partie la biodisponibilité.

La détermination des familles polyphénoliques a également montré des effets de copigmentation dans l'extrait étudié. De plus, la quantification de certaines familles polyphénoliques, telles que les anthocyanes et les tanins, ont permis d'orienter nos recherches sur l'origine de l'activité AO de ce fruit. En effet, il apparaît que le MEM soit très peu pourvu

en anthocyanes, comparé à l'açaï, mais qu'il possède une quantité équivalente en tanins par rapport au raisin, connu pour son astringence dû à la présence de ces composés.

La démarche qui a consisté à séparer les différentes composantes de ce fruit a permis de d'expliquer la provenance de quelques familles polyphénoliques. Ainsi, apparaît-il que les anthocyanes proviennent de l'épicarpe, et que les proanthocyanidines sont majoritairement issus du mésocarpe.

Le fractionnement de l'extrait de MEM a mis en évidence de possibles effets de synergie dans l'extrait brut, lesquels semblent disparaître lors de l'étape de purification. Cet argument permet de justifier des bénéfices et de l'efficacité des polyphénols lorsque ceux-ci sont présents dans un mélange plutôt qu'isolés.

Ces travaux ont mis en exergue le rôle de quelques familles de polyphénols dans l'activité antioxydante du fruit du patawa, avec la confirmation massive de la présence de certains composés comme l'acide chlorogénique, qui semble provenir des deux tissus, ainsi que de la cyanidine rutinoside. L'analyse spectrométrique a également mis en évidence l'existence de nombreux dérivés du resvératrol. La présence de ces composés permet de justifier le pouvoir antioxydant de ce fruit. Le prolongement de ces travaux pourrait se faire en tentant de mettre en évidence les potentielles activités biologiques de ces extraits, de déterminer avec certitude les molécules présentes et responsables de ces activités, et, enfin, de tenter de comprendre les mécanismes fonctionnels mise en jeu. Une attention particulière devra être portée sur le mésocarpe dont la valorisation pourra être forte intéressante compte tenu de la forte activité mise en évidence.

Conclusion générale & perspectives

CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette thèse s'articule autour de la connaissance de l'activité antioxydante, et de la composition phytochimique d'une espèce de palmier très commune en Amazonie, en particulier en Guyane française, et, à ce jour, encore très peu connue scientifiquement : l'*Oenocarpus bataua* Mart.

Si le choix de séparer les tissus végétaux reposait, dans un premier temps, sur l'hypothèse d'une différenciation entre les capacités antioxydantes de l'épicarpe et du mésocarpe en vue d'une éventuelle utilisation industrielle, il a aussi permis de d'évaluer le comportement de chaque tissu vis-à-vis de tests antioxydants, de mettre en relief la relation qui les lie à leur composition polyphénolique, et d'optimiser les conditions d'extraction des biomolécules actives du fruit entier.

La recherche des conditions optimales d'extraction de molécules actives, en jouant sur des paramètres tels que la nature et la polarité du solvant, l'acidité du milieu, et la présence, ou non, d'une étape de délipidation, a constitué une partie importante de ces travaux. La multiplication des tests antioxydants chimiques a été favorisée dans le but d'évaluer, le plus correctement possible, la capacité antioxydante des extraits sélectionnés. Un autre test d'activité antioxydante plus complet, le test biologique KRL, a été utilisé afin d'apporter un complément d'information permettant d'évaluer l'action antioxydante potentielle des extraits vis-à-vis d'un système cellulaire bien plus complexe que les systèmes étudiés dans les tests chimiques en tube. Les résultats obtenus renforcent notre hypothèse de départ selon laquelle ce fruit de palmier habituellement consommé par les populations locales pourrait s'avérer bénéfique pour leur santé de par la présence de molécules bioactives tels que les polyphénols. L'étape d'extraction des polyphénols a été complétée par le dosage de quelques familles et sous familles de composés phénoliques. Des purifications ont été opérées pour certaines parties du fruit, et des analyses chromatographiques suivies de la détermination structurale ont pu être effectuées sur quasiment chaque partie étudiée.

Ainsi, au cours de l'étude de l'épicarpe du patawa, deux extraits ont-ils été conservés : les extraits Méthanol/eau et Acétone/eau sans délipidation. La comparaison des résultats des tests d'activité antioxydante a démontré que ce dernier permettait de libérer une quantité plus importante de polyphénols, de flavonoïdes et de proanthocyanidines, engendrant une activité antioxydante plus élevée, qu'elle soit mesurée par le biais des tests chimiques, DPPH, TEAC,

FRAP et ORAC ou du test biologique KRL. Les investigations chromatographiques de l'extrait le plus antioxydant sous-entendent une présence de nombreux polyphénols, parmi lesquels pourraient être présents des acides hydroxycinnamiques, des stilbènes, des flavonols et des anthocyanes.

Les extraits antioxydants du mésocarpe sélectionnés ont été élaborés grâce aux mêmes solvants que l'épicarpe, mais l'étude de ce tissu a nécessité une étape de délipidation. Il a pu être démontré que le mésocarpe renfermait une activité antioxydante très intéressante (bien supérieure à celle de l'épicarpe), parfois comparable à celle du Trolox[®], et supérieure à celle de nombreux autres fruits (comme la goyave, ...). Un résultat très important qui ressort de cette étude est issu de la comparaison des quantités de polyphénols des deux extraits, cette quantité identique aboutit à une même activité antioxydante lors de l'emploi des tests chimiques alors que l'extrait hydroacétonique présente une activité AO largement supérieure lors du test KRL, laissant suggérer une composition différente en polyphénols entre les deux extraits; en nature et en quantité de sous familles qui serait à l'origine de cette action différenciée notamment par leur meilleure capacité à traverser la membrane. Nos résultats suggèrent aussi que les extraits hydroacétoniques pourraient renfermer d'autres molécules, comme par exemple les vitamines, dont l'action AO passe par des mécanismes différents *in vivo*. La présence de la vitamine E dans le MEM pourrait l'expliquer. Les investigations chromatographiques ont mis en évidence la possible présence d'acide chlorogénique dans ce tissu, comme dans le cas de l'épicarpe, acide phénolique largement répandu dans les fruits. Cette information serait à confirmer par l'étude par spectrométrie de masse de cet extrait.

Les conditions d'analyse des capacités antioxydantes d'extrait du fruit global (MEM), dont l'intérêt réside en grande partie dans sa facilité de dépulpage, sont directement issues des études des tissus séparés. Quatre extraits ont été retenus, utilisant l'un ou l'autre, des deux solvants précédents en délipidant, ou non. L'extrait élaboré avec de l'Ac/eau sans délipidation a démontré les résultats les plus prometteurs. De plus, il est apparu qu'il était possible de prédire les valeurs d'AO du fruit entier, sans l'endocarpe, par les seules connaissances des propriétés antioxydantes de chaque tissu, et des proportions relatives de ces derniers. Dans ce cas précis, ces valeurs prédictives découlaient de l'addition des valeurs d'AO de l'épicarpe et du mésocarpe. Des études comparatives de capacité antioxydante ont donc été menées entre l'extrait sélectionné du MEM, l'extrait d'intérêt du mésocarpe, et des extraits d'*Euterpe oleracea* Mart. dit açai, et de thé vert. Il en ressort que le thé vert, suivi du mésocarpe et de

l'açaï, qui est considéré comme l'espèce référente dans notre étude, ont démontré un pouvoir supérieur à celui de l'extrait de patawa au regard du test KRL, jugé le plus pertinent. La présence de molécules anthocyaniques observées lors de l'étude chromatographique de l'épicarpe, et celle des tanins visibles dans les spectres UV du mésocarpe nous ont conduits à quantifier plus spécifiquement ces composés dans l'extrait de MEM. Ces mesures ont montré une quantité très inférieure d'anthocyanes présentes dans le MEM comparativement à l'extrait d'açaï. De plus, le degré de polymérisation des tanins condensés a été évalué à environ 20, et les unités monomères de ceux-ci comme étant constitués essentiellement d'épicatéchine. Pour affiner les investigations sur les molécules possédant un potentiel AO dans l'extrait étudié, une analyse structurale par spectrométrie de masse a été menée sur l'extrait AO du MEM, et celle-ci a démontré la présence de plusieurs molécules polyphénoliques possédant un caractère AO, comme de nombreux dérivés d'acides chlorogéniques, des stilbènes et une anthocyane.

PERSPECTIVES

L'un des principaux écueils rencontrés lors de la recherche d'activité biologique sur des ressources végétales réside dans la pertinence du choix de la méthode d'extraction de molécules potentiellement bioactives. La méthode d'extraction par sonication est une méthode la plus efficace, mais, actuellement, de nombreuses recherches se tournent vers d'autres méthodes nouvelles dont l'efficacité serait supérieure, parmi lesquelles on peut citer, par exemple, la méthode d'extraction par microonde qui semble moins destructive vis-à-vis des polyphénols [Sharma *et al.*, 2008; Biesaga, 2011].

Lors de la quantification de la vitamine C dans le MEM et dans l'açaï, nous avons pu émettre l'hypothèse, sur la base de travaux issus de la littérature, que les concentrations de cette dernière et d'autres microconstituants dépendaient fortement du stade de maturité du fruit. Ces observations pourraient ouvrir de nouvelles perspectives de travail, qui consisteraient à étudier la capacité antioxydante en fonction du degré de maturité de la ressource étudiée. Ces études postérieures pourraient donner des informations aux consommateurs de jus de patawa quant à sa composition phytochimique lorsque celui-ci est consommé. De même l'évaluation de leur présence dans l'extrait hydroacétonique du mésocarpe pourrait nous aider à mieux comprendre son action dans le test cellulaire

De ces études, il sera ensuite envisageable d'étudier la biodisponibilité d'un extrait de jus de fruit enrichi en polyphénols, car il est généralement admis que les études *in vivo* sont difficilement prévisibles sur la base unique de résultats obtenus *in vitro*.

Le choix de distinguer les différentes composantes tissulaires a eu pour conséquence de mettre en évidence une activité antioxydante nettement meilleure dans le cas du mésocarpe, comparée à l'açai. Dès lors que la responsabilité des molécules sur le pouvoir antioxydant pourra être établie avec certitude, par le biais de méthodes de purification et d'analyses beaucoup plus approfondies, pour le MEM, l'épicarpe et en particulier pour le mésocarpe, tissu le plus AO, il sera possible d'envisager une valorisation industrielle de ce tissu, visant l'utilisation de ressources naturelles dans le domaine de la cosmétique, de l'agro-alimentaire et de la pharmaceutique.

Le prolongement de ces travaux de thèse pourrait se faire en tentant de mettre en évidence les potentielles activités biologiques de ces extraits, de déterminer avec certitude les molécules présentes et responsables de ces activités, et, enfin, de tenter de comprendre les mécanismes fonctionnels mis en jeu.

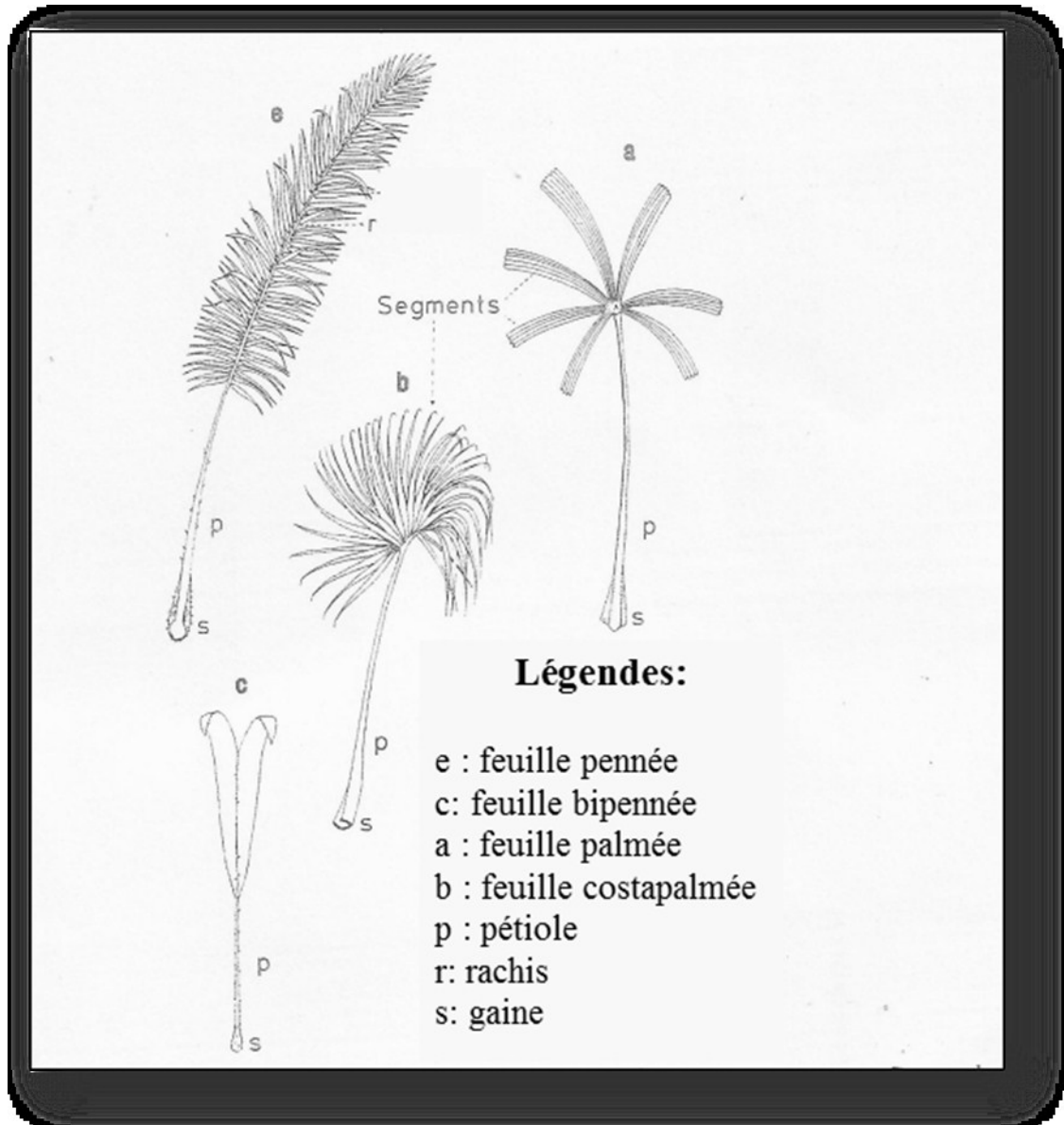
Annexes

Sous-famille	Tribus	Sous-tribus	Genres
CORYPHOIDEAE	CORYPHEAE	Thrinacinae	Chelyocarpus
			Itaya
CALAMOIDEAE	LEPIDOCARYEAE		Lepidocarym
			Mauritia
			Mauritiella
	CALAMEAE		Raphia
CEROXYLOIDEAE	HYOPHORBEAE		Chamaedorea
			Wendlandiella
ARECOIDEAE	IRIARTEEAE	Iriarteinae	Dictyocaryum
			Iriarteia
			Iriartella
		Socratea	
		Wettiniinae	Catoblastus
			Wettinia
	ARECEAE	Manicariinae	Manicaria
		Leopoldiniinae	Leopoldinia
		Euterpeinae	Euterpe
			Prestoea
			Oenocarpus
		Hyopspathe	
	Roystoneinae	Roystonea (introduit)	
	COCOEAE	Buttinae	Cocos (introduit)
			Syagrus
		Attaleinae	Attalea
			Maximiliana
			Orbignya
			Scheelea
		Elaeidinae	Barcella
			Elaeis
		Bactridinae	Acrocomia
			Aiphanes
Astrocaryum			
Bactris			
Desmoncus			
GEONOMEAE	Asterogyne		
	Geonoma		
	Pholidostachys		
	Ammandra		
PHYTELEPHANTOIDEAE			Aphandra
			Phytelephas

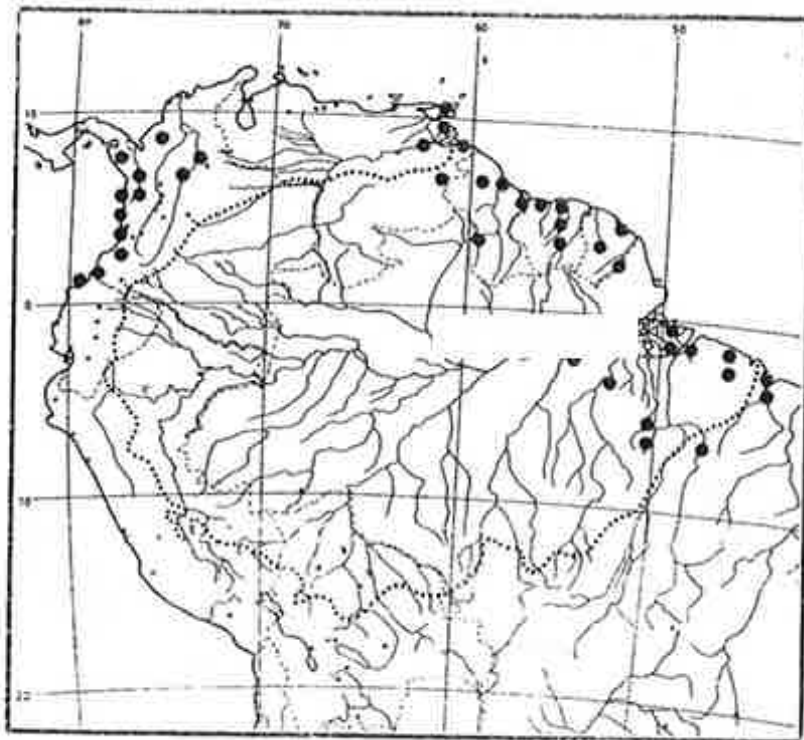
Annexe 1 : Classification des palmiers amazoniens

<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq). Lodd. exMart.	<i>Desmoncus</i>
<i>Asterogyne guianensis</i> Granv. & Henderson*	— <i>orthacanthos</i> Mart.
<i>Astrocaryum</i>	— <i>phoenicocarpus</i> Barb. Rodr.
— <i>gynacanthum</i> Mart.	— <i>polyacanthos</i> Mart. var. <i>polyacanthos</i>
— <i>jauari</i> Mart.	— sp. nov. ?*
— <i>minus</i> Trail	<i>Elaeis</i> aff. <i>oleifera</i> (Kunth) Cortés
— <i>murumuru</i> Mart.	
— <i>paramaca</i> Mart.	<i>Euterpe oleracea</i> Mart.
— <i>rodriguesii</i> Trail	
— <i>sciophilum</i> (Miq.) Pulle	<i>Geonoma</i>
<i>Attalea</i>	— <i>aspidiifolia</i> Sprucevar. <i>fusca</i> Henderson
— <i>attaleoides</i> (Barb. Rodr.) Wess. Boer	— <i>baculifera</i> (Poit.) Kunth
— <i>camopiensis</i> (Glassman) Zona*	— <i>deversa</i> (Poit.) Kunth
— <i>dahlgreniana</i> (Bondar) Wess. Boer	— <i>euspatha</i> Burret
— <i>degranvillei</i> (Glassman) Zona*	— <i>leptospadix</i> Trail
— <i>guianensis</i> (Glassman) Zona*	— <i>maxima</i> (Poit.) Kunth var. <i>ambigua</i> (Spruce)
— <i>maripa</i> (Aubl.) Mart.	Henderson
— <i>maripensis</i> (Glassman) Zona*	— <i>maxima</i> (Poit.) Kunthvar. <i>maxima</i>
— <i>microcarpa</i> Mart.	— <i>oldemanii</i> Granv.
<i>Bactris</i>	— <i>poiteauana</i> Kunth
— <i>acanthocarpa</i> Mart var. <i>intermedia</i> Henderson	— <i>stricta</i> (Poit.) Kunth subsp. <i>arundinacea</i> Henderson
— <i>acanthocarpoides</i> Barb. Rodr.	— <i>stricta</i> (Poit.) Kunthsubsp. <i>stricta</i>
— <i>aubletiana</i> Trail*	— <i>stricta</i> (Poit.) Kunthsubsp. <i>pliniana</i> Henderson*
— <i>brongniartii</i> Mart.	— <i>umbraculiformis</i> Wessels Boer
— <i>campestris</i> Poepp. ex Mart.	— <i>undata</i> Klotzsch subsp. <i>tumucensis</i> Henderson*
— <i>constanciae</i> Barb. Rodr.	<i>Hyospathe elegans</i> Mart.
— <i>cuspidata</i> Mart.	
— <i>elegans</i> Barb. Rodr. & Trail	<i>Manicaria saccifera</i> J. Gaerth
— <i>gastoniana</i> Barb. Rodr.	
— <i>hirta</i> Mart. var. <i>hirta</i>	<i>Mauritia flexuosa</i> L f.
— <i>hirta</i> Mart. var. <i>pectinata</i> (Mart.) Govaerts	
— <i>major</i> N.J. Jacq. var. <i>infesta</i> (Mart.) Drude	<i>Mauritiella armata</i> Burret
— <i>major</i> N.J. Jacq. var. <i>major</i>	<i>Oenocarpus</i>
— <i>maraja</i> Mart. var. <i>juuensis</i> (Trail) Henderson	— <i>bacaba</i> Mart.
— <i>maraja</i> Mart. var. <i>trichospatha</i> (Trail) Henderson	— <i>bataua</i> Mart. var. <i>bataua</i>
— <i>nancibaensis</i> Granv.*	— <i>bataua</i> Mart. var. <i>oligocarpa</i> Henderson
— <i>oligocarpa</i> Barb. Rodr.	— <i>mapora</i> H. Karst
— <i>pliniana</i> Granv. & Henderson	<i>Socratea exorrhiza</i> H. Wendl
— <i>rhapidacantha</i> Wessels Boer	<i>Syagrus</i>
— <i>simplicifrons</i> Mart.	— <i>inajai</i> Beccari
<i>Chamaedorea</i> cf. <i>pauciflora</i> art	— <i>stratincola</i> Wessels Boer

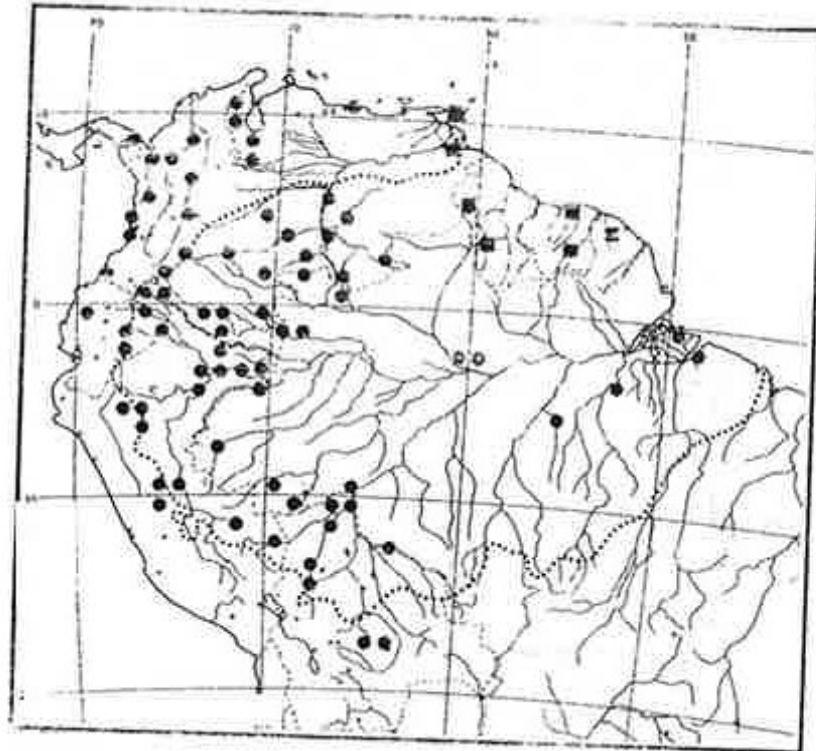
Annexe 2 : Liste des palmiers indigènes et endémiques (*) de Guyane française



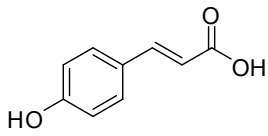
Annexe 3 : Différents types de feuilles de palmiers amazoniens



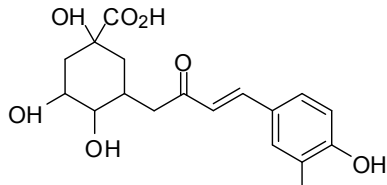
Annexe 4 : Répartition géographique dans le bassin amazonien de l'*Euterpe oleracea*



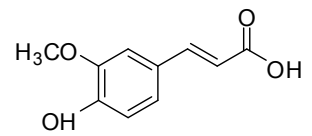
Annexe 5 : Répartition géographique dans le bassin amazonien de l'*Oenocarpus bataua*



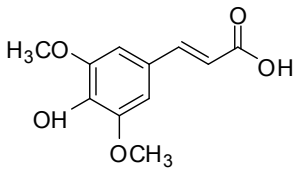
Acide p-coumarique



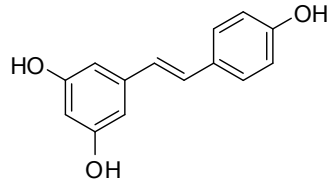
acide chlorogénique



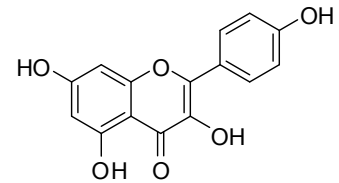
Acide férulique



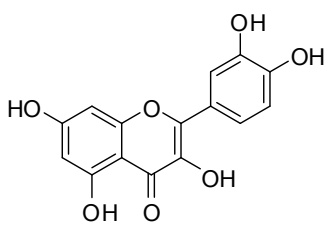
Acide sinapique



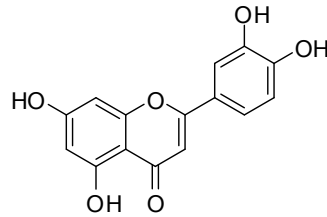
trans- resvératrol



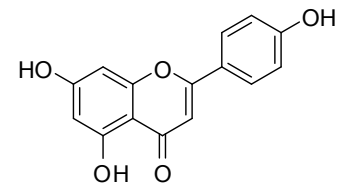
Kaempférol



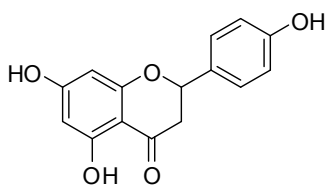
Quercétine



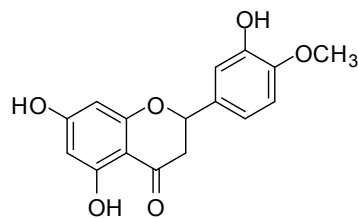
Lutéoline



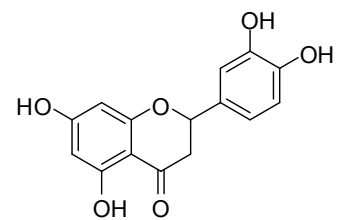
Apigénine



Naringénine



Hespéridine



Eriodictyol

Annexe 6 : Structures chimiques de quelques polyphénols

Références bibliographiques

- Abad-Garcia, B., L. A. Berrueta, S. Garmon-Lobato, B. Gallo et F. Vicente (2009). "A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1216**(28): 5398-5415.
- Abadio Finco, F. D. B., D. R. Kammerer, R. Carle, W. H. Tseng, S. Böser et L. Graeve (2012). "Antioxidant activity and characterization of phenolic compounds from bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) Fruit by HPLC-DAD-MS n." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(31): 7665-7673.
- Ajila, C. M., L. Jaganmohan Rao et U. J. S. Prasada Rao (2010). "Characterization of bioactive compounds from raw and ripe *Mangifera indica* L. peel extracts." *Food and Chemical Toxicology* **48**(12): 3406-3411.
- Apel, K. et H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction." *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373-399.
- Araujo, F. R. et M. A. Lopes (2012). "Diversity of use and local knowledge of palms (Arecaceae) in eastern Amazonia." *Biodiversity and Conservation* **21**(2): 487-501.
- Arimboor, R. et C. Arumughan (2011). "Sea buckthorn (*hippophae rhamnoides*) proanthocyanidins inhibit in vitro enzymatic hydrolysis of protein." *Journal of Food Science* **76**(6): T130-T137.
- Arts, M. J. T. J., G. R. M. M. Haenen, H. P. Voss et A. Bast (2004). "Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay." *Food and Chemical Toxicology* **42**(1): 45-49.
- Assis, S. A. D., F. P. Fernandes, A. B. G. Martins et O. M. M. D. F. Oliveira (2008). "Acerola: Importance, culture conditions, production and biochemical aspects." *Fruits* **63**(2): 93-101.
- Awika, J. M., L. W. Rooney, X. Wu, R. L. Prior et L. Cisneros-Zevallos (2003). "Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(23): 6657-6662.
- Balick, M. J. et S. N. Gershoff (1981). "Nutritional evaluation of the *Jessenia bataua* palm: Source of high quality protein and oil from tropical America." *Economic Botany* **35**(3): 261-271.
- Benavente-Garcia, O. et J. Castillo (2008). "Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(15): 6185-6205.
- Benzie, I. F. F. et J. J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay." *Analytical Biochemistry* **239**(1): 70-76.

- Béreau, D. (2001). "Huiles et fractions insaponifiables de huit espèces de palmiers amazoniens " **Doctorat**: 156.
- Bettaieb Rebey, I., S. Bourgo, I. Ben Slimen Debez, I. Jabri Karoui, I. Hamrouni Sellami, K. Msaada, F. Limam et B. Marzouk (2011). "Effects of Extraction Solvents and Provenances on Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Cumin (*Cuminum cyminum* L.) Seeds." *Food and Bioprocess Technology*: 1-10.
- Biesaga, M. (2011). "Influence of extraction methods on stability of flavonoids." *Journal of Chromatography A* **1218**(18): 2505-2512.
- Blache, D. et M. Prost (1992). "Free radical attack: Biological test for human resistance capability. In Proceedings of the IX College Park Colloquium on Chemical Evolution: A Lunar-Based Chemical Analysis Laboratory (LBCAL 1989).": pp. 82-98.
- Bordiga, M., F. Travaglia, M. Locatelli, J. D. Coisson et M. Arlorio (2011). "Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv." *Food Chemistry* **127**(1): 180-187.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier et C. Berset (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT - Food Science and Technology* **28**(1): 25-30.
- Bravo, L. (1998). "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutrition Reviews* **56**(11): 317-333.
- Burns, J., P. T. Gardner, D. Matthews, G. G. Duthie, M. E. J. Lean et A. Crozier (2001). "Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(12): 5797-5808.
- Campos, M. T. et C. Ehringhaus (2003). "Plant Virtues are in the Eyes of the Beholders: A Comparison of Known Palm Uses among Indigenous and Folk Communities of Southwestern Amazonia." *Economic Botany* **57**(3): 324-344.
- Cao, G. et R. L. Prior (1998). "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum." *Clinical Chemistry* **44**(6): 1309-1315.
- Carli, M., F. Coelho Costa, Silva. O, J.-L. Bélot et A. Bertaud (2008). "Guide technique pour une utilisation énergétique des huiles végétales." *Cirad*.
- Carlson, M. et R. D. Thompson (1998). "Liquid Chromatographic Determination of Methylxanthines and Catechins in Herbal Preparations Containing Guarana." *Journal of AOAC International* **81**(4): 691-701.
- Castaneda-Ovando, A., M. d. L. Pacheco-Hernandez, M. E. Paez-Hernández, J. A. Rodriguez et C. A. Galan-Vidal (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." *Food Chemistry* **113**(4): 859-871.
- Cheng, S. S., J. Y. Liu, E. H. Chang et S. T. Chang (2008). "Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi." *Bioresource Technology* **99**(11): 5145-5149.

- Chin, Y. W., H. B. Chai, W. J. Keller et A. D. Kinghorn (2008). "Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Acai) with antioxidant and cytoprotective activities." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(17): 7759-7764.
- Choe, E. et D. B. Min (2005). "Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods." *Journal of Food Science* **70**(9): R142-R159.
- Chun, O. K., D. O. Kim, H. Y. Moon, H. G. Kang et C. Y. Lee (2003). "Contribution of Individual Polyphenolics to Total Antioxidant Capacity of Plums." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(25): 7240-7245.
- CIFOR, C. f. I. F. R. (2004). "Beef exports fuel loss of Amazonian Forest." *CIFOR News Online* **Number 36**.
- Clifford, M. N. (2000). "Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**(7): 1033-1043.
- Clifford, M. N., K. L. Johnston, S. Knight et N. Kuhnert (2003). "Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(10): 2900-2911.
- CNAC (1999). "Centre national des arts culinaires, Produits du terroir et recettes traditionnelles." 207-222.
- Conforti, F., S. Sosa, M. Marrelli, F. Menichini, G. A. Statti, D. Uzunov, A. Tubaro et R. D. Loggia (2008). "In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants." *Journal of Ethnopharmacology* **116**(1): 144-151.
- Costa, A. S. G., M. A. Nunes, I. M. C. Almeida, M. R. Carvalho, M. F. Barroso, R. C. Alves et M. B. P. P. Oliveira (2012). "Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds." *LWT - Food Science and Technology* **49**(2): 324-328.
- Costa, P. A. D., C. A. Ballus, J. Teixeira-Filho et H. T. Godoy (2010). "Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits." *Food Research International* **43**(6): 1603-1606.
- Counet, C., D. Callemien et S. Collin (2006). "Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid." *Food Chemistry* **98**(4): 649-657.
- Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." *Clinical Microbiology Reviews* **12**(4): 564-582.
- Cushnie, T. P. T. et A. J. Lamb (2005). "Antimicrobial activity of flavonoids." *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**(5): 343-356.
- Da Cruz Rodrigues, A. M., S. Darnet et L. H. M. Da Silva (2010). "Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*mauritia flexuosa*), patawa (*oenocarpus bataua*), tucuma

- (astrocaryum vulgare), mari (poraqueiba paraensis) and Inaja (Maximiliana Maripa) fruits." *Journal of the Brazilian Chemical Society* **21**(10): 2000-2004.
- Da Silva, J. M. C., A. B. Rylands et G. A. B. Da Fonseca (2005). "The fate of the Amazonian areas of endemism." *Conservation Biology* **19**(3): 689-694.
- Daglia, M. (2012). "Polyphenols as antimicrobial agents." *Current Opinion in Biotechnology* **23**(2): 174-181.
- Dai, F., W. F. Chen et B. Zhou (2008). "Antioxidant synergism of green tea polyphenols with alpha-tocopherol and l-ascorbic acid in SDS micelles." *Biochimie* **90**(10): 1499-1505.
- Darnet, S., J. L. Serra, A. M. da Cruz Rodrigues et L. H. Meller da Silva (2011). "A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (Euterpe oleracea)." *Food Research International* **44**(7): 2107-2111.
- Darnet, S. H., L. H. M. da Silva, A. M. C. Rodrigues et R. T. Lins (2011). "Nutritional composition, fatty acid and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*) and patawa (*Oenocarpus bataua*) fruit pulp from the amazon region." *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* **31**(2): 488-491.
- De Granville, J. J. (1988). "Les palmiers de la Guyane française." *Revue Bois et forêts des Tropiques, Orstom* **220**.
- De Granville, J. J. (2007). "A new species of *Bactris* (Palmae) from French Guiana." *Brittonia* **59**(4): 354-356.
- de Mejia, E. G., M. V. Ramirez-Mares et S. Puangpraphant (2009). "Bioactive components of tea: Cancer, inflammation and behavior." *Brain, Behavior, and Immunity* **23**(6): 721-731.
- de Pascual-Teresa, S., D. A. Moreno et C. Garcia-Viguera (2010). "Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence." *International Journal of Molecular Sciences* **11**(4): 1679-1703.
- De Rosso, V. V. et A. Z. Mercadante (2007). "The high ascorbic acid content is the main cause of the low stability of anthocyanin extracts from acerola." *Food Chemistry* **103**(3): 935-943.
- DebMandal, M. et S. Mandal (2011). "Coconut (*Cocos nucifera* L.: Arecaceae): In health promotion and disease prevention." *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **4**(3): 241-247.
- Del Pozo-Insfran, D., S. S. Percival et S. T. Talcott (2006). "Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(4): 1222-1229.

- Delattre, J., J.-L. Beaudoux et D. Bonnefont- Rousselot (2005a). "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 1- 23.
- Delattre, J., J.-L. Beaudoux et D. Bonnefont- Rousselot (2005b). "Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques." 45-60.
- Delattre, J., J.-L. Beaudoux et D. Bonnefont- Rousselot (2005c). "Radicaux libres et stress antioxydant, aspects biologiques et pathologiques." 60-80.
- Delattre, J., J.-L. Beaudoux et D. Bonnefont- Rousselot (2005d). "Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques." 87-108.
- Dreher, D. et A. F. Junod (1996). "Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development." *European Journal of Cancer* **32**(1): 30-38.
- Droulers, M. (2004). "L'Amazonie vers un développement durable." *Armand Colin*: 7-25.
- El Gharras, H. (2009). "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." *International Journal of Food Science and Technology* **44**(12): 2512-2518.
- Evans, P. et B. Halliwell (1999). "Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria." *Annals of the New York Academy of Sciences* **884**: 19-40.
- Favacho, H. A. S., B. R. Oliveira, K. C. Santos, B. J. L. Medeiros, P. J. C. Sousa, F. F. Perazzo et J. C. T. Carvalho (2011). "Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Euterpe oleracea oil." *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **21**(1): 105-114.
- Freeman, B. L., D. L. Eggett et T. L. Parker (2010). "Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges." *Journal of Food Science* **75**(6): C570-C576.
- Fukushima, Y., T. Ohie, Y. Yonekawa, K. Yonemoto, H. Aizawa, Y. Mori, M. Watanabe, M. Takeuchi, M. Hasegawa, C. Taguchi et K. Kondo (2009). "Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(4): 1253-1259.
- Gallori, S., A. R. Bilia, M. C. Bergonzi, W. L. R. Barbosa et F. F. Vincieri (2004). "Polyphenolic constituents of fruit pulp of Euterpe oleracea Mart. (açai palm)." *Chromatographia* **59**(11-12): 739-743.
- Giusti, M. M. et R. E. Wrolstad (2001). "Anthocyanins: characterization and measurement with UV-visible spectroscopy." *Current protocols in food analytical chemistry* **New York: John Wiley & Sons**: Unit. F1.2.1-13.
- Gomez-Miguez, M., S. Gonzalez-Manzano, M. Teresa Escribano-Bailon, F. J. Heredia et C. Santos-Buelga (2006). "Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(15): 5422-5429.

- Gonzalez-Manzano, S., M. Duenas, J. C. Rivas-Gonzalo, M. T. Escribano-Bailon et C. Santos-Buelga (2009). "Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine." *Food Chemistry* **114**(2): 649-656.
- Gonzalez-Montelongo, R., M. Gloria Lobo et M. Gonzalez (2010). "Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds." *Food Chemistry* **119**(3): 1030-1039.
- Grenand, P., C. Moretti et H. Jacquemin (1987). "Pharmacopées traditionnelles en Guyane." *Orstom* **108**: 572.
- Hallgas, B., T. Patonay, A. Kiss-Szikszai, Z. Dobos, F. Hollosy, D. Eros, L. Orfi, G. Kéri et M. Idei (2004). "Comparison of measured and calculated lipophilicity of substituted aurones and related compounds." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **801**(2): 229-235.
- Han, X., T. Shen et H. Lou (2007). "Dietary polyphenols and their biological significance." *International Journal of Molecular Sciences* **8**(9): 950-988.
- Hassimotto, N. M. A., M. I. Genovese et F. M. Lajolo (2005). "Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(8): 2928-2935.
- Heal, G. (2003). "Bundling biodiversity." *Journal of the European Economic Association* **1**(2-3): 553-560.
- Heinrich, M., T. Dhanji et I. Casselman (2011). "Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) - A phytochemical and pharmacological assessment of the species' health claims." *Phytochemistry Letters* **4**(1): 10-21.
- Henderson, A. (1995a). "The palms of Amazon." *New York botanical garden, Oxford University Press*: 105-110.
- Henderson, A. (1995b). "The palms of Amazon." *New York botanical garden, Oxford University Press*: 113-120.
- Hennebelle, T. (2006). "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants." *Chimie Organique et Macromoléculaire Docotrat*: 303.
- Heo, H. J., Y. J. Kim, D. Chung et D. O. Kim (2007). "Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system." *Food Chemistry* **104**(1): 87-92.
- Hernandez, P. B. N., G. Fregapane et M. D. S. Moya (2009). "Bioactive compounds, volatiles and antioxidant activity of virgin seje oils (*Jessenia bataua*) from the Amazonas." *Journal of Food Lipids* **16**(4): 629-644.

- Hidalgo, M., C. Sanchez-Moreno et S. de Pascual-Teresa (2010). "Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity." *Food Chemistry* **121**(3): 691-696.
- Hogan, S., H. Chung, L. Zhang, J. Li, Y. Lee, Y. Dai et K. Zhou (2010). "Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai." *Food Chemistry* **118**(2): 208-214.
- Hogen-Esch, T. E. et J. Smid (1966). "Studies of contact and solvent-separated ion pairs of carbanions. I. Effect of temperature, counterion, and solvent." *Journal of the American Chemical Society* **88**(2): 307-318.
- Honzel, D., S. G. Carter, K. A. Redman, A. G. Schauss, J. R. Endres et G. S. Jensen (2008). "Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: Generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(18): 8319-8325.
- Hu, Y., S. Ma, J. Li, S. Yu, J. Qu, J. Liu et D. Du (2008). "Targeted isolation and structure elucidation of stilbene glycosides from the bark of *Lysidice brevicalyx* Wei guided by biological and chemical screening." *Journal of Natural Products* **71**(11): 1800-1805.
- Hu, Y., J. Qu, Y. Liu, S. Yu, J. Li, J. Zhang et D. Du (2009). "Structural characterization of trace stilbene glycosides in *Lysidice brevicalyx* Wei using liquid chromatography/diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **878**(1): 1-7.
- Huang, D., B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan et E. K. Deemer (2002). "Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(7): 1815-1821.
- Iordanescu, O., E. Alexa, M. Roxana et P. Mariana-Atena (2012). "Bioactive compounds and antioxidant properties at different maturity stages of apple cultivars from Romania." *Journal of Food, Agriculture and Environment* **10**(1): 147-151.
- Jensen, G. S., X. Wu, K. M. Patterson, J. Barnes, S. G. Carter, L. Scherwitz, R. Beaman, J. R. Endres et A. G. Schauss (2008). "In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(18): 8326-8333.
- Jin, Y., X. L. Zhang, H. Shi, Y. S. Xiao, Y. X. Ke, X. Y. Xue, F. F. Zhang et X. M. Liang (2008). "Characterization of C-glycosyl quinochalones in *Carthamus tinctorius* L. by ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**(8): 1275-1287.
- Kahn, F. (1997). "Les palmiers de l'Eldorado."

- Kahn, F. et J. J. De Granville (1992). "Palms in forest ecosystems of amazonia." *Ecological studies*, Springer - Verlag.
- Kaiser, S., P. Di Mascio, M. E. Murphy et H. Sies (1990). "Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **277**(1): 101-108.
- Kang, J., Z. Li, T. Wu, G. S. Jensen, A. G. Schauss et X. Wu (2010). "Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.)." *Food Chemistry* **122**(3): 610-617.
- Kang, J., C. Xie, Z. Li, S. Nagarajan, A. G. Schauss, T. Wu et X. Wu (2011). "Flavonoids from acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities." *Food Chemistry* **128**(1): 152-157.
- Kang, S. A., Y. J. Jang et H. Park (1998). "In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: Dependence on released metals from the damaged tissue." *Free Radical Research* **28**(1): 93-107.
- Karasawa, K., Y. Uzuhashi, M. Hirota et H. Otani (2011). "A matured fruit extract of date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) Stimulates the cellular immune system in mice." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(20): 11287-11293.
- Kennedy, J. A. et G. P. Jones (2001). "Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(4): 1740-1746.
- Khan, M. T. H., A. Ather, K. D. Thompson et R. Gambari (2005). "Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses." *Antiviral Research* **67**(2): 107-119.
- Kim, J. M., S. M. Chang, I. H. Kim, Y. E. Kim, J. H. Hwang, K. S. Kim et W. S. Kim (2007). "Design of optimal solvent for extraction of bio-active ingredients from mulberry leaves." *Biochemical Engineering Journal* **37**(3): 271-278.
- Korkina, L., C. De Luca et S. Pastore (2012). Plant polyphenols and human skin: Friends or foes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1259**: 77-86.
- Kuskoski, E. M., A. G. Asuero, M. T. Morales et R. Fett (2006). "Wild fruits and pulps of frozen fruits: Antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins." *Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: Atividade antioxidante, polifenos e antocianinas* **36**(4): 1283-1287.
- Lantto, T. A., H. J. D. Dorman, A. N. Shikov, O. N. Pozharitskaya, V. G. Makarov, V. P. Tikhonov, R. Hiltunen et A. Raasmaja (2009). "Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract." *Food Chemistry* **112**(4): 936-943.
- Leopoldini, M., N. Russo et M. Toscano (2011). "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants." *Food Chemistry* **125**(2): 288-306.

- Li, H. B., C. C. Wong, K. W. Cheng et F. Chen (2008). "Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants." *LWT - Food Science and Technology* **41**(3): 385-390.
- Liang, Y. et Y. Xu (2001). "Effect of pH on cream particle formation and solids extraction yield of black tea." *Food Chemistry* **74**(2): 155-160.
- Lichtenthäler, R., R. B. Rodrigues, J. G. S. Maia, M. Papagiannopoulos, H. Fabricius et F. Marx (2005). "Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) fruits." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **56**(1): 53-64.
- Lopez, M., F. Martinez, C. Del Valle, M. Ferrit et R. Luque (2003). "Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method." *Talanta* **60**(2-3): 609-616.
- Macia, M. J., P. J. Armesilla, R. Camara-Leret, N. Paniagua-Zambrana, S. Villalba, H. Balslev et M. Pardo-de-Santayana (2011). "Palm Uses in Northwestern South America: A Quantitative Review." *Botanical Review* **77**(4): 462-570.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy et L. Jimenez (2004). "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition* **79**(5): 727-747.
- Manzi, M. et O. T. Coomes (2009). "Managing Amazonian palms for community use: A case of aguaje palm (*Mauritia flexuosa*) in Peru." *Forest Ecology and Management* **257**(2): 510-517.
- Masella, R., R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi et C. Giovannini (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." *Journal of Nutritional Biochemistry* **16**(10): 577-586.
- Mates, J. M., C. Pérez-Gomez et I. N. De Castro (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." *Clinical Biochemistry* **32**(8): 595-603.
- Matheus, M. E., S. B. d. O. Fernandes, C. S. Silveira, V. P. Rodrigues, F. d. S. Menezes et P. D. Fernandes (2006). "Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression." *Journal of Ethnopharmacology* **107**(2): 291-296.
- McCall, M. R. et B. Frei (1999). "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?" *Free Radical Biology and Medicine* **26**(7-8): 1034-1053.
- Mena, S., A. Ortega et J. M. Estrela (2009). "Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **674**(1-2): 36-44.
- Merken, H. M. et G. R. Beecher (2000). "Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(3): 577-599.

- Mertens-Talcott, S. U., J. Rios, P. Jilma-Stohlawetz, L. A. Pacheco-Palencia, B. Meibohm, S. T. Talcott et H. Derendorf (2008). "Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich açai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(17): 7796-7802.
- Moore, H. E. (1973). "The major groups of palms and their distribution." *Gentes herbanium* **11**(2): 27-141.
- Moreira, L. L., T. Dias, L. G. Dias, M. Rogao, J. P. Da Silva et L. M. Estevinho (2011). "Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach." *Food and Chemical Toxicology* **49**(2): 520-526.
- Moure, A., J. M. Cruz, D. Franco, J. Manuel Dominguez, J. Sineiro, H. Dominguez, M. J. Nunez et J. Carlos Parajo (2001). "Natural antioxidants from residual sources." *Food Chemistry* **72**(2): 145-171.
- Moure, A., D. Franco, J. Sineiro, H. Dominguez, M. J. Nunez et J. M. Lema (2000). "Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(9): 3890-3897.
- Musialik, M., R. Kuzmiec, T. S. Pawlowski et G. Litwinienko (2009). "Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids." *Journal of Organic Chemistry* **74**(7): 2699-2709.
- Nassiri-Asl, M. et H. Hosseinzadeh (2009). "Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds." *Phytotherapy Research* **23**(9): 1197-1204.
- Osman, A. M., K. K. Y. Wong, S. J. Hill et A. Fernyhough (2006). "Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340**(2): 597-603.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill et R. L. Prior (2001). "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(10): 4619-4626.
- Ou, B., D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan et E. K. Deemer (2002). "Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(11): 3122-3128.
- Ozcelik, B., J. H. Lee et D. B. Min (2003). "Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl." *Journal of Food Science* **68**(2): 487-490.
- Pacheco-Palencia, L. A., C. E. Duncan et S. T. Talcott (2009). "Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*." *Food Chemistry* **115**(4): 1199-1205.

- Pacheco-Palencia, L. A., S. Mertens-Talcott et S. T. Talcott (2008). "Chemical composition, antioxidant properties, and thermal stability of a phytochemical enriched oil from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(12): 4631-4636.
- Pacheco-Palencia, L. A., S. T. Talcott, S. Safe et S. Mertens-Talcott (2008). "Absorption and biological activity of phytochemical-rich extracts from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and oil in vitro." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(10): 3593-3600.
- Packer, L., K. Kraemer et G. Rimbach (2001). "Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications." *Nutrition* **17**(10): 888-895.
- Palma, M. et C. G. Barroso (2002). "Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products." *Analytica Chimica Acta* **458**(1): 119-130.
- Panfili, G., A. Fratianni et M. Irano (2003). "Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(14): 3940-3944.
- Perumalla, A. V. S. et N. S. Hettiarachchy (2011). "Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality." *Food Research International* **44**(4): 827-839.
- Pinelo, M., L. Manzocco, M. J. Nunez et M. C. Nicoli (2004). "Solvent effect on quercetin antioxidant capacity." *Food Chemistry* **88**(2): 201-207.
- Plotkin, M. J. et M. J. Balick (1984). "Medicinal uses of South American palms." *Journal of Ethnopharmacology* **10**(2): 157-179.
- PNR, G. (2006). "Etude de la biodiversité comme facteur de développement des régions ultrapériphériques de l'Europe." *Biotope*.
- Prieur, C., J. Rigaud, V. Cheynier et M. Moutounet (1994). "Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds." *Phytochemistry* **36**(3): 781-784.
- Prior, R. L., X. Wu et K. Schaich (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(10): 4290-4302.
- Prost, M. (1989). "Utilisation des générateurs de radicaux libres dans le domaines des dosages biologiques."
- Pulido, R., L. Bravo et F. Saura-Calixto (2000). "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(8): 3396-3402.
- Quideau, S., D. Deffieux, C. Douat-Casassus et L. Pouységou (2011). "Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis." *Angewandte Chemie - International Edition* **50**(3): 586-621.

- Razavi, S. M., S. Zahri, G. Zarrini, H. Nazemiyeh et S. Mohammadi (2009). "Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid." *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **35**(3): 376-378.
- Retsky, K. L., K. Chen, J. Zeind et B. Frei (1999). "Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation." *Free Radical Biology and Medicine* **26**(1-2): 90-98.
- Ribeiro, J. C., L. M. G. Antunes, A. F. Aissa, J. D. C. Darin, V. V. De Rosso, A. Z. Mercadante et M. D. L. P. Bianchi (2010). "Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **695**(1-2): 22-28.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller et G. Paganga (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." *Free Radical Biology and Medicine* **20**(7): 933-956.
- Robbins, R. J. (2003). "Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(10): 2866-2887.
- Rocha, A. P. M., L. C. R. M. Carvalho, M. A. V. Sousa, S. V. F. Madeira, P. J. C. Sousa, T. Tano, V. B. Schini-Kerth, A. C. Resende et R. Soares de Moura (2007). "Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (Açai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat." *Vascular Pharmacology* **46**(2): 97-104.
- Rodrigues, R. B., H. C. De Menezes, L. M. C. Cabral, M. Dornier et M. Reynes (2001). "An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu-camu (*Myrciaria dubia*)." *Fruits* **56**(05): 345-354.
- Rodrigues, R. B., R. Lichtenthaler, B. F. Zimmermann, M. Papagiannopoulos, H. Fabricius, F. Marx, J. G. S. Maia et O. Almeida (2006). "Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seeds and identification of their polyphenolic compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(12): 4162-4167.
- Roulier, G. (2005). "Fabuleuse Amazonie, Ses plantes et huiles essentielles." *Environnement et Santé durables*: 96.
- Rufino, M. D. S. M., J. Pérez-Jiménez, S. Arranz, R. E. Alves, E. S. de Brito, M. S. P. Oliveira et F. Saura-Calixto (2011). "Açai (*Euterpe oleracea*) 'BRS Para': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil." *Food Research International* **44**(7): 2100-2106.
- Sartori-Thiel, A. (2003). "Activités anti-microbiennes d'extraits végétaux enrichis en polyphénols." *Science et Agronomie ED 380 Doctorat*: 177.
- Schauss, A. G., X. Wu, R. L. Prior, B. Ou, D. Huang, J. Owens, A. Agarwal, G. S. Jensen, A. N. Hart et E. Shanbrom (2006). "Antioxidant capacity and other bioactivities of the

- freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(22): 8604-8610.
- Schroeter, H., C. Boyd, J. P. E. Spencer, R. J. Williams, E. Cadenas et C. Rice-Evans (2002). "MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide." *Neurobiology of Aging* **23**(5): 861-880.
- Schultes, R. et R. Raffauf (1990). "The healing forest. Medicinal and toxic plants of Norhtwestern Amazonia." *Dioscorde Press (Portland, Oregon)*: 484.
- Schwartz, H., V. Ollilainen, V. Piironen et A. M. Lampi (2008). "Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats." *Journal of Food Composition and Analysis* **21**(2): 152-161.
- Seeram, N. P., M. Aviram, Y. Zhang, S. M. Henning, L. Feng, M. Dreher et D. Heber (2008). "Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(4): 1415-1422.
- Seon Hwa, L., T. Oe et I. A. Blair (2001). "Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins." *Science* **292**(5524): 2083-2086.
- Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey et M. Pessarakli (2012). "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions." *Journal of Botany* **2012**: 1-26.
- Sharma, U. K., K. Sharma, N. Sharma, A. Sharma, H. P. Singh et A. K. Sinha (2008). "Microwave-assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(2): 374-379.
- Simic, M., T. Kundakovic et N. Kovacevic (2003). "Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts." *Fitoterapia* **74**(6): 613-616.
- Smirnoff, N. (2005). "Antioxidants and reactivities oxygen species in plants."
- Smith, A. R., S. V. Shenvi, M. Widlansky, J. H. Suh et T. M. Hagen (2004). "Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress." *Current Medicinal Chemistry* **11**(9): 1135-1146.
- Stecher, G., C. W. Huck, M. Popp et G. K. Bonn (2001). "Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **371**(1): 73-80.
- Sumaya Martinez, M. T. (2004). "Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives et effet de la glycation." *Microbiologie Doctorat*: 188.

- Sun, B., J. M. Ricardo-da-Silva et I. Spranger (1998). "Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**(10): 4267-4274.
- Tarascou, I., J. P. Mazauric, E. Meudec, J. M. Souquet, D. Cunningham, S. Nojeim, V. Cheynier et H. Fulcrand (2011). "Characterisation of genuine and derived cranberry proanthocyanidins by LC-ESI-MS." *Food Chemistry* **128**(3): 802-810.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos et D. Hawkins Byrne (2006). "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts." *Journal of Food Composition and Analysis* **19**(6-7): 669-675.
- Trabelsi, N., W. Megdiche, R. Ksouri, H. Falleh, S. Oueslati, B. Soumaya, H. Hajlaoui et C. Abdelly (2010). "Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves." *LWT - Food Science and Technology* **43**(4): 632-639.
- Udenigwe, C. C., V. R. Ramprasath, R. E. Aluko et P. J. H. Jones (2008). "Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy." *Nutrition Reviews* **66**(8): 445-454.
- Valko, M., M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes et J. Telser (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence." *Molecular and Cellular Biochemistry* **266**(1-2): 37-56.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic et M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chemico-Biological Interactions* **160**(1): 1-40.
- Van Den Berg, R., G. R. M. M. Haenen, H. Van Den Berg et A. Bast (1999). "Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures." *Food Chemistry* **66**(4): 511-517.
- Vinci, G., F. Botrè, G. Mele et G. Ruggieri (1995). "Ascorbic acid in exotic fruits: A liquid chromatographic investigation." *Food Chemistry* **53**(2): 211-214.
- Vuong, Q. V., J. B. Golding, C. E. Stathopoulos, M. H. Nguyen et P. D. Roach (2011). "Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water." *Journal of Separation Science* **34**(21): 3099-3106.
- Wallace, T. C. et M. M. Giusti (2010). "Extraction and normal-phase HPLC-fluorescence-electrospray MS characterization and quantification of procyanidins in cranberry extracts." *Journal of Food Science* **75**(8): C690-C696.
- Wardman, P. et L. P. Candeias (1996). "Fenton chemistry: An introduction." *Radiation Research* **145**(5): 523-531.
- Xia, E. Q., G. F. Deng, Y. J. Guo et H. B. Li (2011). "Biological activities of polyphenols from grapes." *International Journal of Molecular Sciences* **11**(2): 622-646.

- Yoshida, H., G. Kajimoto et S. Emura (1993). "Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **70**(10): 989-995.
- Yu, Z. et R. A. Dahlgren (2000). "Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage." *Journal of Chemical Ecology* **26**(9): 2119-2140.
- Zanatta, C. F., M. Mitjans, V. Urgatondo, P. A. Rocha-Filho et M. P. Vinardell (2010). "Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines." *Food and Chemical Toxicology* **48**(1): 70-75.
- Zhou, H. C., Y. M. Lin, Y. Y. Li, M. Li, S. D. Wei, W. M. Chai et N. F. Y. Tam (2011). "Antioxidant properties of polymeric proanthocyanidins from fruit stones and pericarps of *Litchi chinensis* Sonn." *Food Research International* **44**(2): 613-620.