

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences alimentaires

Spécialité : Biochimie de la Nutrition

Intitulé du thème :

Effet de l'extrait aqueux de l'*Eruca vesicaria.Sativa*
sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*
soumise à un stress oxydatif

Présenté par : **Mr Bekafila Mokhtar**

Mr Bekaddour Mohamed

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury: **Mr DIAF Mustafa**

(M.C.A/ UDL/SBA)

Examineur : **Mme Chenni Fatima Zohra**

(M.C.A/ UDL/SBA)

Promoteur : **Mr Zairi Mohamed**

(M.C.B/ UDL/SBA)

Année universitaire 2019 - 2020

Session : « Juin »

Remerciements

Avant tout, nous adressons nos remerciements à ALLAH, le Tout-Puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné durant toutes ces longues années d'études et pour la réalisation de ce travail que nous espérons d'être utile.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Monsieur Zairi Mohamed, professeur à la Faculté de des sciences de la nature et de la vie de Sidi-Bel-Abbès. Nous tenons vivement à lui exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour notre sujet de recherche. Nous le remercions de nous avoir fait confiance et d'avoir été présent aussi souvent que possible malgré ses tâches administratives. Nous tenons à remercier Monsieur le Docteur : Diaf Musataf, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Qu'il trouve ici nos sincères impressions de gratitude et de respect.

Nous tenons également à remercier ainsi docteur Chenni Fatima Zohra de nous faire l'honneur d'examiner notre travail.

Dédicaces

Nous dédions ce modeste travail à :

Nos familles :BEKALFA et BEKADDOUR, tout particulièrement nos parents pour leur soutien, leur amour et leur sagesse qui nous ont permis d'aboutir au grade de Master et de devenir les personnes que nous sommes. Tous les mots que nous pourrions utiliser seraient insuffisants pour vous témoigner l'amour que nous vous porter.

Nos frères, nos sœurs pour leur présence de tous les instants, leur sympathie et leurs encouragements qu'ils nous ont apporté.

Nos amis pour tous les moments inoubliables que nous avons passé ensemble, que ce travail soit d'expression de notre grand amour. Nous vous souhaitons une vie pleine du succès et de joie.

Et finalement ce travail est dédié à l'âme de mon père HAJ Tayeb BEKALFA et notre professeur BENALI Mohamed (الله يرحمهم).

Table des matières

Introduction générale	2
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE I : <i>Eruca vesicaria sativa</i>	5
1. Histoire de la roquette	6
2. Culture de la roquette	6
3. Etude botanique.....	6
3.1. Description.....	6
3.2. Le genre d' <i>Eruca</i>	6
3.3. Botanique	6
4. Taxonomie.....	8
4.1. Place de la plante dans la systématique.....	8
4.2. Noms communs.....	9
5. Chimie de l' <i>Eruca vesicaria sativa</i>	10
6. Usages et propriétés thérapeutiques de la roquette.....	11
7. Toxicité.....	11
CHAPITRE II : La Levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1. La Levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.1 Taxonomie et morphologie.....	12
1.2 Physiologie et métabolisme.....	12
1.2.1. Métabolisme oxydatif.....	13
1.2.2. Métabolisme fermentaire.....	14
1.2.3. Métabolisme oxydo-réductif ou Métabolisme Respiro-fermentaire.....	14
2. Notion de stress chez les microorganismes.....	15
2.1. Effet du SO ₂	16
2.2. Effet de l'éthanol.....	17
CHAPITRE III : les radicaux libres et antioxydants	18
1. Généralités sur l'oxydation.....	18
2. les radicaux libres.....	18
2.1. Définition.....	18
2.2. Radicaux libres et stress oxydant.....	19

2.3. Classification des radicaux libres.....	19
2.3.1. Le radical superoxyde (O ₂ [°]).....	19
2.3.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	19
2.3.3. Le radical hydroxyle	20
2.3.4. Le radical peroxydinitrite.....	20
2.3.5. Le monoxyde d'azote.....	21
2.3.6. L'oxygène singulet.....	21
3. L'oxydation in vivo.....	22
3.1. Physiologie de l'oxydation.....	22
3.2. Physiopathologie de l'oxydation.....	22
4. les antioxydants.....	22
4.1. Définition.....	22
4.2. Classification des antioxydants.....	23
5. Effet biologiques des antioxydants.....	27
PARTIE EXPERIMENTALE	28
Objectif du travail	29
MATERIAL ET METHODES	29
1. Echantillonnage.....	29
2. Préparation des extraits.....	30
2.1. Extraction.....	30
2.1.1 Préparation de l'extrait aqueux par macération.....	30
2.1.2. Préparation de l'extrait aqueux sous reflux.....	30
2.1.3. Préparation de l'extrait eau méthanol.....	31
3. Matériel biologique.....	32
3.1. Caractéristiques de la souche étudiée.....	32
3.2. Milieux de culture.....	33
4. Dosage des Polyphénols.....	33
5. Dosage des flavonoïdes.....	34

6. Activité antioxydante.....	35
6.1. Test DPPH.....	35
6.2. Pouvoir antioxydant (capacité antioxydante totale).....	35
7. Activité microbienne	36
7.1. Réponse membranaire suite au stress éthanolique chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
7.2. Le comportement de Levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vis-à-vis d'un xénobiotique.....	36
7.3. Traitement de la levure avec du H ₂ O ₂ en présence du glutathion et d'extrait aqueux de la roquette.....	36
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	37
1. Dosage des polyphénols totaux.....	37
2. Dosage des flavonoïdes.....	37
3. Activité antioxydante.....	38
3.1. Test DPPH.....	38
3.2. Pouvoir oxydant.....	39
4. Activité microbienne.....	40
4.1. Réponse membranaire suite au stress éthanolique chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
4.2. Le comportement de Levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vis-à-vis d'un xénobiotique.....	40
4.3. Traitement de la levure avec du H ₂ O ₂ en présence du glutathion et d'extrait aqueux de la roquette.....	41
CONCLUSION GENERALE.....	43
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	44

Liste des figures

Figure 1 : les fleurs de la roquette.....	07
Figure 2 : les tiges et les feuilles de la roquette.....	08
Figure 3 : Schéma de la glycolyse (A) et du cycle de Krebs (B).....	13
Figure 4 : structure chimique de L'HBA et l'BHT.....	23
Figure 05 : les différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	25
Figure 6 : Situation géographique des régions de récolte.....	29
Figure 07 : Extraction sous reflux de feuille de la roquette.....	31
Figure 8 : Montage de l'extraction liquide/liquide.....	32
Figure 9 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	38

Liste des tableaux

Tableau I : Classification botanique de <i>l'Eruca vesicaria sativa</i>	09
Tableau II : Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Saccharomyces</i>	33

Liste des abréviations

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

DO : Densité optique.

DPPH: 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle.

FeCl₃: Chlorure de fer.

Fe²⁺: Fer ferreux.

Fe³⁺: Fer ferrique.

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power.

HCl : Acide chlorhydrique.

K₃Fe (CN) ₆ : Ferricyanure de potassium.

min : Minute.

Mg²⁺ : Magnésium.

mg: Milligramme.

ml: millilitre.

nm: Nanomètre.

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

BAAS: Voie de la biosynthèse des acides aminés soufrés

NADH: Nicotinamide adénine dinucleotide

PBS: Tampon phosphate salin

PCR: *Polymérase Chain réaction* (Réaction de polymérisation en chaîne)

ROS : Reactive oxygen species.

V/V : Volume par Volume.

µg: Microgramme.

EOR : espèces oxygénées réactives

UV : lumière Ultra-violette

ROS : substances réactives d'oxygène

ha : Hectare

O₂⁻ : Anion Superoxyde

OH°: Radical hydroxyl

NO° : Radical nitrosyl

EOA : espèces oxygénées activées

SOD : superoxyde dismutase

ADN : acide désoxyribonucléique **NO** : monoxyde d'azote

BHA : butylhydroxyanisole

BHT : butylhydroxytoluène

HCL : acide chlorhydrique

EAG : équivalent d'acide gallique

CEQ : équivalent de catéchine

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

EC₅₀ (CI₅₀) : concentration inhibitrice à 50 %

I% : pourcentage d'inhibition

CAT : capacité antioxydante totale (*Total antioxidant capacity*)

EAA : équivalents d'acide ascorbique

DMSO : diméthyl sulfoxyde

CMI : concentration minimale inhibitrice



Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Le stress oxydatif est généralement définie comme un déséquilibre entre les oxydants et les réducteurs (antioxydants) au niveau cellulaire ou un individu. Le dommage oxydatif est le résultat d'un tel déséquilibre et comprend la modification oxydative des macromolécules cellulaires, la mort cellulaire par apoptose ou nécrose, ainsi que des lésions tissulaires structurel. Le déséquilibre peut résulter d'un manque de capacité antioxydante due aux perturbations dans la production, la distribution, ou par une surabondance de ROS d'un stress environnemental ou comportemental. Si non régulé correctement, les dommages ROS excès des acides gras polyinsaturés présents dans les membranes cellulaires, les nucléotides dans l'ADN, et les obligations de sulfhydriles en protéines. Presque tous les systèmes d'organes peuvent être trouvés pour avoir un stress oxydatif. Certains systèmes d'organes sont prédisposés à des niveaux plus élevés de stress oxydatif.les systèmes d'organes les plus sensibles aux dommages sont le système pulmonaire (exposés à des niveaux élevés d'oxygène), le cerveau (expositions intense activité métabolique a encore des niveaux inférieurs d'antioxydants endogènes), l'œil (constamment exposés à la lumière UV dommageables), le système circulatoire (victime de la fluctuation des niveaux d'oxyde nitrique et de l'oxygène) et les systèmes de reproduction (au risque de l'activité métabolique intense de spermatozoïdes). Le dommage oxydatif provoque une contrainte nette sur les fonctions normales de l'organisme et peut entraîner de nombreuses maladies spécifiques. Il semble également contribuer au déclin général dans les fonctions du corps optimales qui est communément admis de se produire à la suite de processus de vieillissement. (1)

L'une des tendances importantes dans l'industrie agroalimentaire d'aujourd'hui est la recherche d'antioxydants d'origine végétale qui peuvent montrer une activité antioxydante équivalente ou supérieure à celui des antioxydants endogènes ou synthétiques. Ainsi, beaucoup d'efforts sont consacrés à la recherche de sources d'antioxydants naturels alternatifs et bon marché, ainsi que pour le développement de techniques d'extractions efficaces et sélectifs. (2)

les antioxydants d'origine végétale comme les polyphénols se trouvent dans de nombreux végétaux supérieurs notamment la roquette (*Eruca Sativa .Sp*)

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance de cette plante médicinale et de mettre en valeur sa composante chimique et son activité antioxydante.

La présente étude comprend une revue de la bibliographie avec une présentation de la roquette et des antioxydants suivi d'une partie pratique avec études de l'effet antioxydant de l'extrait aqueux des feuilles de cette plante.



PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : *Eruca vesicaria sativa***1. Histoire de la roquette :**

Apparu dans la langue en 1538, le terme « roquette » vient de l'italien *rochetta*, dérivé de *ruca* qui, selon les uns, signifie « chou » et, selon les autres, « chenille ». (01)

Sous le nom de « roquette », on regroupe quelques espèces de plantes de la famille des brassicacées (ou crucifères) qui se caractérisent par une étonnante saveur de « noisette moutardée ». Les graines, d'ailleurs, servent à la préparation de la moutarde forte. De 10 cm à 20 cm de long, les feuilles sont étroites et, chez certaines espèces, le rebord est dentelé, comme les feuilles de pissenlit, mais en plus arrondi. Originaires du bassin méditerranéen, les roquettes se sont rapidement disséminées vers l'est jusqu'en Inde. Elles ont été consommées depuis la haute Antiquité, et peut-être bien avant, par les divers peuples qui ont habité ces régions. (01)

Les Égyptiens, les Grecs et les Romains attribuaient à la roquette de nombreuses vertus médicinales, dont celle d'être aphrodisiaque. Dans l'Antiquité, elle était consacrée à Priape, dieu des jardins, de la fécondité et de la reproduction dont l'emblème était le phallus. On la plantait au pied de sa statue et on recommandait aux maris « paresseux » de consommer ses feuilles crues et ses graines. Consommée depuis l'Antiquité, les Romains l'avaient consacrée à Priape et la recommandaient aux maris peu portés sur la « chose ». Cette réputation s'est perpétuée au Moyen Âge, les autorités religieuses interdisant sa culture dans les jardins des monastères. (01)

Cet interdit s'est plus ou moins étendu à la population en général, si bien que, pendant longtemps, les Européens ne l'ont employée que de façon marginale dans leur alimentation. Quant à la réputation d'aphrodisiaque, elle a encore cours, mais la science ne s'est pas prononcée sur la chose. (02)

Ce genre n'est pas mentionné distinctement par IBN AL-BAYTAR, mais on peut considérer qu'il a été assimilé aux moutards et aux navets sauvages c'est à dire qu'il n'a pas été distingué des genres voisins (*Brassica*, *Sinapis*, *Eruca*), en raison de la ressemblance de l'aspect général

et des propriétés. Quant à ABDEREZAQ GECLERC, il mentionne une espèce appelé el -lôrra qui peut très bien être un diplotaxe ou une roquette. (03)

2. Culture de la roquette

La roquette a été cultivée dans presque toute l'Europe et en Amérique, mais c'est surtout dans le sud de notre continent, en Asie mineure et la région méditerranéenne.

La plante s'accommode de divers supports de culture mais donne de meilleurs résultats sur un sol à texture fine riche en matières organiques. Cette espèce étant adaptée aux températures fraîches, le début de printemps est le meilleur moment pour la semer (03)

Cette espèce est cosmopolite ; les sous-espèces spontanées poussent abondamment après les crues. Les variétés potagères sont cultivées spécialement dans les oasis du Sahara marocain et algérien (Tafilalet, Touât, In salah, etc.).(03)

3. Etude botanique

3.1. Description

Espèces végétales sauvages plus ou moins connus liés à la famille représentent pratiquement sources génétiques inexploitées et illimitées de traits agronomiques et économiques. Cette famille comprend 338 genres et 3709 espèces. (04)

3.2. Le genre d'*Eruca*

Eruca est un genre de la tribu des Brassicacées, il est composé de quatre espèces, sont originaires de la région méditerranéenne. Le taxon le plus cultivé est *E. vesicaria spp. Sativa* (Souvent appelée *E. sativa*). Subspecies sativa (n = 11), est une plante herbacée annuelle qui a été cultivée depuis l'antiquité comme un légume à feuilles (Rocket ou roquette). (05)

3.3. Botanique

Roquette est une plante herbacée annuelle d'une hauteur allant jusqu'à 80 cm. Les feuilles basales sont en rosette, lyrées-pennatifides (celle qui sont consommées en salade), et les feuilles caulinaires sont lobulées ou dentelées. Les fleurs ont des pétales blancs ou légèrement jaunes. Les siliques peuvent atteindre 40 mm ; elles sont érigées, prenant sur la tige, avec une partie valvaire subcylindrique et une face ensiforme, aussi longue que les valves. Les graines, de 1.5 à 2.5 mm, sont brunes. (05)

La plante fleurit de février à juin sous sa forme sauvage et jusqu'en plein été sous sa forme cultivée. Elle est allogame, avec un système complexe d'auto-incompatibilité, principalement gamétophytique mais avec quelques allèles agissant sporophytiquement. On a démontré l'existence d'androsterilité génique (05)



Figure 01 : les fleurs de la roquette. (06)



Figure 02 : les tiges et les feuilles de la roquette. (06)

4. Taxonomie

4.1. Place de la plante dans la systématique

Le **Tableau I** montre la classification botanique de *l'Eruca vesicaria sativa* :

Tableau I : Classification botanique de *l'Eruca vesicaria sativa*. (05)

Règne	Plante
Sous-règne	Tracheobionta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Capparales
Famille	<i>Brassicaceae</i>
Genre	<i>Eruca</i>
Espèce	<i>Eruca vesicaria</i>

4.2. Noms communs

Noms communs

Langue	Nom
Arabe	jerjir : en algérie
Arabe	kerkaz : au Maroc. (03)
Français	roquette
Italienne	ruchetta
Anglais	roquet
<u>Suisse</u>	rucola

5. Chimie de l'*Eruca vesicaria sativa*

La roquette est très riche en matières antioxydantes :

- Flavonoïdes

Les feuilles et les graines de la roquette contiennent des flavonoïdes, particulièrement de la quercétine. On ne connaît pas leur concentration exacte, car peu d'études ont été faites à leur sujet. (07)

Néanmoins, la consommation d'aliments contenant de la quercétine serait associée à une diminution des risques de cancers en raison de ses propriétés antioxydantes . (08)

- Caroténoïdes

La roquette renferme aussi de petites quantités de lutéine et de bêta-carotène, deux types de caroténoïdes. Comparativement à différentes laitues (de culture hydroponique), la roquette contiendrait de 2 à 5 fois plus de lutéine et jusqu'à 3 fois plus de bêta-carotène. Comme les caroténoïdes possèdent eux aussi des propriétés antioxydantes, la consommation d'aliments qui en contiennent serait également liée à un risque moindre de souffrir de certains cancers. (09)

- Glucosinolates

La roquette, comme la majorité des légumes de la famille des brassicacées (crucifères) dont elle fait partie (brocoli, chou-fleur, chou, radis, etc.), renferme des glucosinolates (09)(10)

Les graines et les graines germées de roquette contiendraient plus de glucosinolates que les feuilles (11)

Toutefois, les études portant sur les quantités de glucosinolates de la roquette sont limitées. Les glucosinolates ont la capacité de se transformer en molécules actives (les isothiocyanates) lorsque l'aliment qui en contient est haché, mastiqué ou au contact de la flore bactérienne intestinale. (12)

Plusieurs de ces molécules contribueraient à limiter le développement du cancer.

6. Usages et propriétés thérapeutiques de la roquette

Eruca vesicaria est utilisée comme plante médicinale contre les infections oculaires et pour soigner les problèmes digestifs et rénaux. Elle est considérée comme un excellent stomachique et stimulant, et elle est également utilisée comme diurétique et antiscorbutique. Les feuilles sont utilisées comme rubéfiant de la peau. La roquette a toujours été considérée comme un puissant aphrodisiaque et les gens l'utilisent toujours à cette fin en région méditerranéenne. Son huile peut être utilisée pour les massages et pour adoucir la peau, la roquette peut provoquer des réactions de brûlure.(05),(13)

7. Toxicité

Des intoxications de bétail nous ont été signalées dans le Tafilalet où on donne les feuilles de roquette cultivée comme fourrage. Leur ingestion en excès expose aux mêmes dangers que pour les diplotaxes.(03)

CHAPITRE II : La Levure *Saccharomyces cerevisiae*

1. La Levure *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1 Taxonomie et morphologie

Les levures *Saccharomyces* appartiennent au règne des champignons, à la division (embranchement) des *Ascomycota* (Ascomycètes), la sous-division des *Saccharomycotina*, la classe des *Saccharomycètes*, l'ordre des *Saccharomycetales* et la famille des *Saccharomycetaceae*. Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, ayant une forme sphérique ou ovale, largement étudiées en biologie cellulaire et moléculaire. Leur état physiologique et leur morphologie peuvent varier selon les conditions de l'environnement. Lorsqu'elles se trouvent dans des conditions favorables de culture (température, aération, pH, etc.) elles peuvent se diviser activement par bourgeonnement. (14)

La taille d'une levure peut varier entre 1 et 9 µm en longueur et de 1 à 5 µm en largeur. Les levures sont utilisées pour la fabrication du pain depuis plus de 3000 ans. Mais ce n'est qu'entre 1857 et 1863 que Louis Pasteur démontre le rôle de la levure en tant que micro-organisme responsable de la fermentation alcoolique (FA). Cet organisme représente un système expérimental qui procure de nombreux avantages, entre autre la petite taille de son génome, ses hautes capacités de recombinaison alliées à un système génétique bien défini et la facilité à le manipuler en laboratoire. Ceci a permis à cette levure de devenir un des organismes modèles eucaryotes les mieux connus et les plus étudiés. (14)

1.2 Physiologie et métabolisme

La composition biochimique de *S. cerevisiae* repose essentiellement sur les protéines, les lipides, les hydrates de carbone et les acides nucléiques. *S. cerevisiae* utilise plusieurs éléments, en faibles quantités, indispensables à son métabolisme tels que l'azote, le soufre, le phosphore, certains acides aminés, des vitamines et des oligo-éléments affectant ainsi les capacités fermentaires et la croissance de la levure. (15)

Le phosphore : Il est assimilé préférentiellement en utilisant l'orthophosphate sous forme d'ion monovalent. Il est impliqué dans le maintien de l'intégrité membranaire et la synthèse des lipides et des hydrates de carbone. (15)

L'azote. Afin d'être assimilé par les levures, l'azote doit être présent dans le milieu de culture. Les ions ammonium, les acides aminés et certains peptides de faible poids moléculaire peuvent être incorporés dans la cellule de la levure et y être métabolisés.

L'ion ammonium et le glutamate sont les composés azotés les plus facilement assimilables par la levure (14)

Le soufre est assimilé généralement sous forme inorganique SO_4^{2-} . Le comportement métabolique de la levure peut être purement oxydatif, fermentaire, ou oxydo-réductif. Il dépend de la nature de la source carbonée et les conditions de culture (14).

1.2.1. Métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif permet la multiplication par bourgeonnement, ce métabolisme est l'un des métabolismes les plus énergétiques, avec un rendement cellulaire important. Il repose sur la production d'une biomasse et de dioxyde de carbone grâce à l'oxydation complète du glucose via les voies métaboliques de la glycolyse. (voire figure 3A), du cycle de Krebs (voire figure 3B) et de la phosphorylation oxydative.

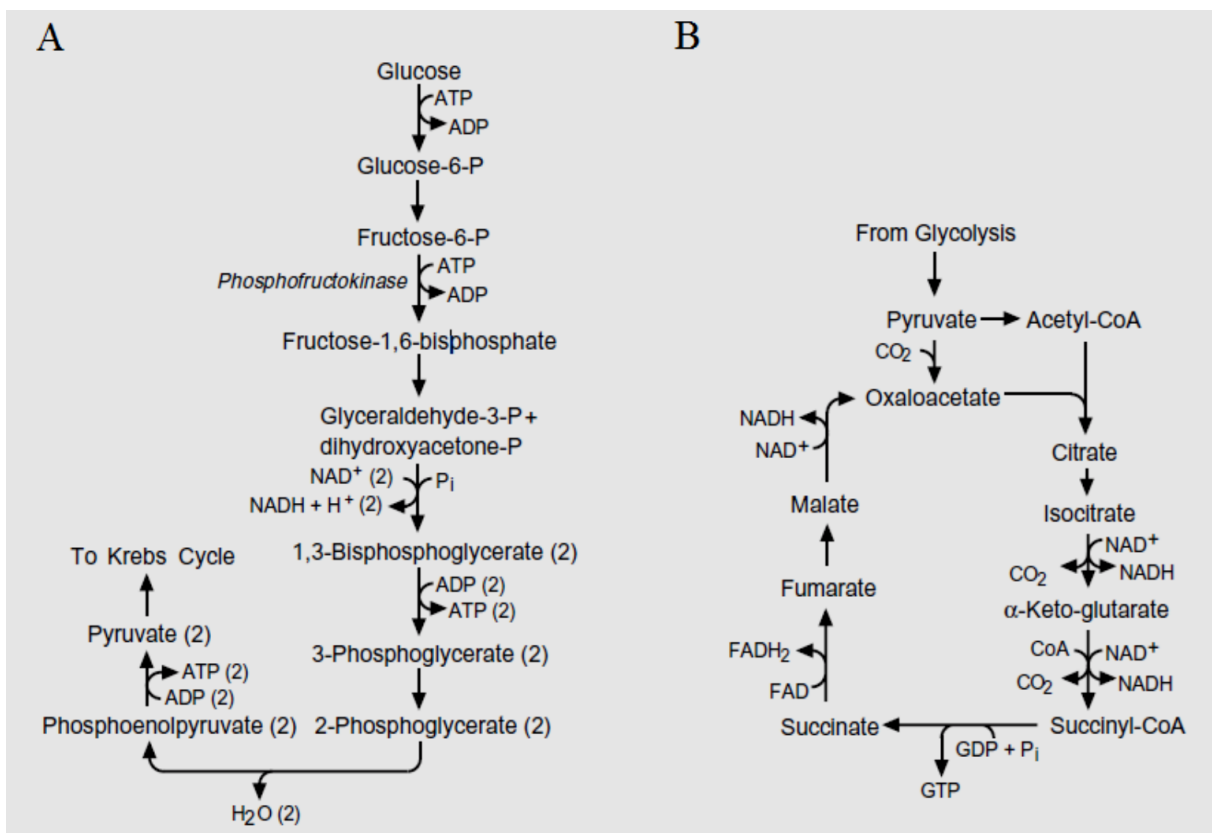


Figure 03 : Schéma de la glycolyse (A) et du cycle de Krebs (B). (16)

Il nécessite la présence d'oxygène et des concentrations en limitation de substrat (150 mg.L⁻¹ environ) L'équation suivante présente le bilan énergétique théorique maximal de cette voie métabolique :



1.2.2. Métabolisme fermentaire

Ce métabolisme se caractérise généralement par un ensemble de réactions qui se produisent en absence d'oxygène comme accepteur final d'électron. Dans ces conditions, le pouvoir cellulaire à réoxyder les coenzymes réduits (NADH et FADH₂) est fortement diminué. (15) De plus dans cette situation, la biochimie cellulaire est modifiée de telle sorte que le pyruvate est réduit en acétaldéhyde puis en éthanol (fermentation), dont la dernière étape nécessite la présence du NADH.

De plus, la formation de l'éthanol permet à la cellule de réoxyder le NADH qui a été produit durant la glycolyse. Cependant en condition anaérobie, le cycle de Krebs n'est pas complètement fonctionnel, car l'activité de la succinate déshydrogénase nécessite la présence d'un coenzyme strictement respiratoire; le FAD. (17)

Par contre, certaines enzymes du cycle de Krebs reste toujours actives (Camarasa et al., 2003). Cette portion active du cycle de Krebs (de l'oxaloacétate au succinate) génère le NADH qui sera réoxydé par la formation de glycérol à partir de la dihydroxyacétone. De plus, l'acide succinique est formé non par voie oxydative mais par la voie réductrice du cycle de Krebs en anaérobiose : oxaloacétate _ malate _ fumarate _ succinate.

1.2.3. Métabolisme oxydo-réductif ou Métabolisme Respiro-fermentaire

En présence d'oxygène la levure *S. cerevisiae* a la particularité de présenter un métabolisme mixte : fermentation (production fermentaire d'éthanol) et respiration (production oxydative de biomasse).

Cependant en aérobie, le métabolisme de la levure *S. cerevisiae* est purement oxydatif lorsque l'apport en glucose est faible. Dans ces conditions, la biomasse et le CO₂ sont les seuls produits synthétisés par la levure; le rendement en biomasse est alors maximum et égal à 0,5 g de biomasse par g de glucose. (18)

Par contre le métabolisme cellulaire devient oxydo-réductif une fois que l'apport de glucose dépasse un certain seuil. Dans ce cas-là, les produits synthétisés sont la biomasse, le CO₂, le glycérol, l'acétate, l'éthanol et le rendement en biomasse est fortement réduit. De plus, le NADH générée à partir de la glycolyse est réoxydé par la production d'éthanol (fermentation)

plutôt que par les voies combinées au métabolisme oxydatif (glycolyse, cycle de Krebs et phosphorylation oxydative) (14).

Cette bascule métabolique est appelée transition respiro-fermentaire ou effet Crabtree qui est très important car cet effet Crabtree permet de réaliser la fermentation en présence d'une faible concentration d'oxygène.

Certaines levures sont fortement Crabtree positives et leur production d'éthanol dépend de la concentration en glucose; chez certaines, comme *S. cerevisiae*, la synthèse d'éthanol débute au-delà de 2.5 g.L⁻¹ de glucose tandis que chez d'autres, il faut 20 à 50 g.L⁻¹ de glucose.

Les levures Crabtree négatives sont les levures pour lesquelles la présence de glucose n'arrête pas la respiration.

Le transport du glucose est l'un des facteurs qui distinguent les levures Crabtree positives et des Crabtree négatives. En excès de glucose dans le milieu, le comportement des levures est différent : i) chez les levures Crabtree positives, le transport est facilité ce qui implique un afflux important de glucose, ii) les levures Crabtree négatives utilisent un symport-H⁺ pour réguler l'entrée du glucose.

2. Notion de stress chez les microorganismes

Les microorganismes, comme tous les êtres vivants, répondent naturellement aux variations des facteurs environnementaux en faisant face à ces conditions désavantageuses pour leur survie. Lorsque les conditions environnementales menacent la survie des microorganismes ou les empêchent de vivre dans des conditions optimales, les cellules sont qualifiées de stressées . (19)

La notion de stress en biotechnologie est difficile à définir. Graumlich et Stevenson, (1979) définissent le stress comme une force ou une influence hostile qui tend à empêcher un système de fonctionner normalement.

Le déclenchement de mécanismes cellulaires complexes suite à un stress génère une réponse adaptative qui aboutit à un état de tolérance, et par conséquent à une survie dans des conditions qui sont normalement létales. Ces variations peuvent être multiples et peuvent provoquer différentes «réponses dynamiques» à différents niveaux : macroscopique, microscopique et moléculaire chez le microorganisme, comme par exemple une modification du métabolisme cellulaire. D'autres réponses peuvent être mises en place : la modification de la capacité de croissance, de certaines fonctions physiologiques, de rendements et de productivités.

Cependant, entre l'état non stressé et la mort, un certain nombre d'états physiologiques différents peuvent exister. Ces adaptations physiologiques mises en oeuvre nécessitent un temps de réponse plus ou moins long qui dépend entre autre, de l'intensité et de la rapidité de la variation subie (conditions sub-létales). Le passage d'un état physiologique à un autre est conditionné par le degré de stress imposé par les conditions environnementales. Ce degré varie d'un individu à un autre (14)

Généralement la réponse de la levure face à un stress est également mise en oeuvre de façon dynamique avec une capacité ou non d'adaptation aux conditions environnementales en fonction du temps (Attfield, 1997; Henson, 2003; Lacroix et Yildirim, 2007; Sonnleitner, 1998). Lors de la présence d'éléments tels que l'éthanol ou le SO₂ dans le milieu de culture, la levure répond en essayant de prévenir la dénaturation de l'intégrité cellulaire et la perte d'activité, en réponse passive ou active. La réponse active est généralement considérée comme une modification métabolique consommant de l'énergie (modifications de la synthèse des molécules intracellulaires et/ou de la composition lipidique de la membrane plasmique, de la morphologie de la cellule et de la composition intracellulaire). Par contre, la réponse passive dépend seulement de la vitesse de la perturbation physique entre le milieu intra et extracellulaire.

Les réponses des levures aux perturbations peuvent engendrer des dommages irréversibles dans la cellule et même sa mort. (14)

Dans le domaine de l'oenologie, un certain nombre de paramètres peuvent influencer le métabolisme et les capacités dynamiques des différents microorganismes du vin et spécifiquement la levure *S. cerevisiae*. Ces paramètres oenologiques peuvent influencer le comportement de *S. cerevisiae* en affectant ses capacités de croissance et de production. (14)

2.1. Effet du SO₂

Le dioxyde de soufre (SO₂) est un composé antimicrobien et l'additif le plus utilisé en vinification comme conservateur. Le SO₂ a bien amélioré les processus de fermentation en inhibant la croissance des bactéries et des levures indésirables. L'action antiseptique du SO₂ semble être spécifique pour la vinification : la plupart des bactéries et levures indésirables sont plus sensibles au SO₂ que la levure *S. cerevisiae*. (20)

Pendant le stockage, le SO₂ bloque le développement de tous les microorganismes (re-fermentation des vins doux, fermentation malo-lactique involontaire). Le dioxyde de soufre est fongistatique aux pH élevés et à faibles concentrations, et il est un fongicide aux faibles pH et à des concentrations élevées. La dose de SO₂ à utiliser dépend à la fois de la population initiale, de la population finale acceptée et de la vitesse de destruction souhaitée; mais

l'efficacité précise dépend largement de facteurs difficilement calculables en fonction de la nature de la souche et son stade de développement.(20)

2.2. Effet de l'éthanol

L'éthanol, excrété par les levures dans le milieu de culture au cours de la fermentation alcoolique, est l'un des principaux facteurs influant sur la croissance des levures. La présence d'éthanol en concentrations élevées dans le milieu de fermentation est à l'origine des modifications de perméabilité et de fluidité membranaires ; donnant ainsi lieu à des désordres métaboliques importants. Ceci explique la diminution de la croissance spécifique ainsi que l'augmentation de la mort cellulaire.

Généralement des concentrations de l'ordre de 1–2% (v/v) sont suffisantes pour diminuer la croissance cellulaire qui peut être arrêtée par une concentration de 10% (v/v) d'éthanol (Roehr, 2001). Selon Bai et al. (2004), une inhibition totale de la croissance cellulaire et de la vitesse de production est observée à une concentration de 13% (v/v) d'éthanol dans le milieu.
(20)

CHAPITRE III : les radicaux libres et antioxydants**1. Généralités sur l'oxydation**

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère les électrons d'une substance vers un agent oxydant. (21)

L'oxygène, molécule indispensable à la vie, est susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA). Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisque, vers le milieu des années 50, Gerschman et Hartman avaient déjà évoqué la toxicité de l'oxygène et la «free radical theory» pour expliquer le processus de vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains, un système enzymatique antioxydant, le superoxyde dismutase (SOD), capable d'éliminer l'anion superoxyde, démontrant ainsi pour la première fois, que notre organisme produit des EOA. Cette découverte sera le point de départ, dans le monde entier, de nombreuses recherches sur le stress oxydant, les antioxydants, et l'oxydation. (22)

2. les radicaux libres :**2.1. Définition**

Un radical libre est une entité (atome, molécule ou ion) possédant un ou plusieurs électrons non appariés, dit célibataires, sur sa couche externe, ce qui la rend instable. Les atomes, pour être stables, doivent en effet disposer d'un nombre pair d'électrons, ces derniers gravitant deux par deux autour du noyau. Ces électrons sont dit « appariés ». Dans le cas des réactions d'oxydation (association d'oxygène et d'une substance oxydable), il arrive qu'un atome perde ou gagne un électron, rendant un de ses électrons (voire plusieurs) « célibataire » : il devient ainsi instable. C'est ce qu'on appelle un radical libre. (23)

En biologie, les radicaux libres sont des dérivés réactifs de l'oxygène. Ils sont produits naturellement par notre organisme, principalement par nos cellules, lors de la transformation des nutriments en énergie (métabolisme), mais ils peuvent aussi provenir de sources extérieures comme le tabac, l'exposition aux UV, la pollution, le stress. (23)

Très instables et très réactifs (leur durée de vie est de l'ordre du millionième de seconde), les radicaux libres cherchent à retrouver une stabilité en attirant les électrons de particules

voisines, transformant celles-ci en radicaux libres à leur tour dans une réaction en chaîne. Ainsi, pour récupérer l'électron qui leur manque, ils attirent les électrons des cellules, globules et protéines. (23)

Ces radicaux libres agressent nos cellules en se combinant à elles. A plus grande échelle, ils attaquent la peau, les organes et l'acide désoxyribonucléique (ADN) et seraient responsables du vieillissement de l'organisme, de l'affaiblissement de notre système immunitaire et d'un certain nombre de maladies graves. (23)

2.2. Radicaux libres et stress oxydant

Les radicaux libres, lorsqu'ils sont produits en faible quantité, sont très bien gérés par notre organisme qui dispose de moyens pour s'en protéger : les antioxydants (la vitamine C, le glutathion ou la coenzyme Q10 par exemple). Ceux-ci neutralisent les molécules nocives, les empêchant ainsi de détériorer la cellule. En situation normale, il y a équilibre entre la production de radicaux libres et celle des antioxydants. (23)

Par contre, lorsque les radicaux libres sont produits en trop grande quantité, notre organisme ne parvient plus à y faire face. L'équilibre entre antioxydants et radicaux libres est rompu. Les molécules instables en excès vont s'équilibrer en obtenant un électron d'une molécule voisine, c'est-à-dire en l'oxydant. Celle-ci devient instable à son tour, se transformant en radical libre. (23)

Cette réaction en chaîne modifie la structure des molécules et les détériore. On parle de stress oxydatif ou stress oxydant. Les cellules « rouillent » en quelque sorte. Les mitochondries elles-mêmes sont directement attaquées, puis la cellule entière incluant l'ADN. Si le nombre de cellules détruites dépasse celui que notre organisme peut fabriquer, les cellules mortes s'accumulent et, sur le long terme, détériorent nos organes voire causent leur mort. La détérioration de l'ADN cause la création de cellules défectueuses à l'origine de problèmes divers comme le cancer. (23)

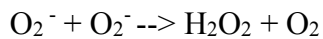
2.3. Classification des radicaux libres

2.3.1. Le radical superoxyde (O_2°) :

Ce radical est réactif parce qu'il lui manque un électron pour se stabiliser, c'est pour cela qu'il porte aussi le nom d'anion superoxyde. Pour retrouver cet électron, il peut par exemple le capturer d'une molécule voisine. Celle-ci, abîmée, oxydée ne peut plus remplir sa fonction. Elle devient à son tour radical libre et va devoir récupérer un électron ailleurs, propageant cette réaction dans tous les constituants cellulaires et endommageant : protéines, ADN, graisses...

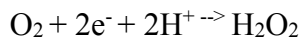
Le radical superoxyde est éliminé ou du moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par des enzymes antioxydantes appelées SOD. Comme leur nom l'indique, elles « dismutent » le radical superoxyde. Elles ont besoin de cuivre, zinc ou manganèse pour agir.

Ces enzymes vont transformer deux superoxydes en peroxyde d'hydrogène, beaucoup moins réactif que son prédécesseur. (24)

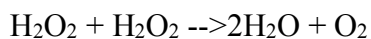


2.3.2. Le peroxyde d'hydrogène: l'intermédiaire

Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé n'est pas un radical mais une molécule, c'est-à-dire qu'il ne possède pas d'électron célibataire. C'est un intermédiaire réduit de l'oxygène, relativement peu toxique. Il est issu de la transformation du radical superoxyde par les enzymes antioxydantes SOD. Il peut également être formé par une simple réduction de l'oxygène en présence d'une enzyme nommée oxydase. (24)



La quantité en eau oxygénée est régulée par des enzymes appelées catalases (à base de fer), qui accélèrent la transformation de du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. (24)



2.3.3. Le radical hydroxyle

Le soleil émet plusieurs types de rayons dont ceux appelés gamma. Si ces rayons ne sont pas arrêtés par la couche d'ozone, ils cassent les molécules d'eau du corps pour donner le radical hydroxyle.

En présence de fer ou de cuivre, le peroxyde d'hydrogène peut également donner naissance à ce radical.



Les radicaux hydroxyles sont les plus toxiques. Leur durée de vie est limitée et par conséquent ils réagissent sur leur lieu de production. Ils s'attaquent particulièrement à l'ADN (support du code génétique), aux protéines et aux lipides. (24)

2.3.4. Le radical peroxy-nitrite : le mutant

En même temps qu'ils fabriquent du superoxyde, les globules blancs libèrent des molécules contenant de l'azote. L'association donne naissance à un mutant : le radical peroxy-nitrite, qui s'attaque à la fois aux protéines et aux gènes.

Le peroxy-nitrite est impliqué dans l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, les maladies de l'intestin... (24)

2.3.5. Le monoxyde d'azote : l'indispensable

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) est un gaz présent naturellement dans l'organisme. C'est un neurotransmetteur, c'est-à-dire une molécule capable de tenir le rôle de messenger, libérée par un nerf et entraînant après captation par une autre cellule, une réaction de cette cellule. Ce radical libre devient particulièrement dangereux lorsqu'il se combine au radical superoxyde pour former le radical peroxy-nitrite. (24)

2.3.6. L'oxygène singulet : stigmate du vieillissement

Sous l'action des rayons ultraviolets, l'oxygène produit des espèces actives comme l'oxygène singulet.

Cet oxygène singulet est à l'origine des rides mais aussi des cancers de la peau. (24)

3. L'oxydation in vivo

3.1. Physiologie de l'oxydation

En condition physiologique, l'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques forment les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR) et les espèces réactives de l'azote.

Aux doses faibles, les EOR sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la transduction du signal, l'entretien et le fonctionnement de l'organisme ainsi que dans le processus de la fécondation, de la maturation et du mouvement cellulaires. Ils jouent aussi un rôle majeur dans la production de médiateurs cellulaires, l'élimination des produits toxiques et la défense contre les infections bactérienne et virales, de même que contre les cellules tumorales. Ces espèces réactives participent dans de nombreuses fonctions biologiques. À titre d'exemple le $\text{NO}\cdot$ joue un rôle dans plusieurs processus physiologiques tel que la protection cardiaque, la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission et les mécanismes de défense. (25)

Les espèces réactives (O_2^- , H_2O_2 , $\text{NO}\cdot$) interviennent aussi dans la maturation, l'hyper activation des spermatoocytes et la fusion de spermatoocyte avec l'ovocyte. Les espèces réactives oxygénées et azotées participent aussi dans la différenciation cellulaire l'apoptose, l'immunité et la défense contre les micro-organismes. (25)

3.2. Physiopathologie de l'oxydation

Les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme à des doses excessives.

Cette surproduction des EOR au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement. (25)

4. les antioxydants

4.1. Définition :

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autre substance chimique, il est définie par HALLIWELL comme toute « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxyde, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat. C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de

l'oxygène et permis de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres. (21)

4.2. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés selon leur origine en antioxydant synthétiques ou naturels et selon leur mode d'action en antioxydants primaires ou secondaires.

❖ Les antioxydants synthétiques

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la gallate propylée (PG) et le tetra-butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. (26)

Le BHA et BHT ont été développés à l'origine pour protéger le pétrole contre le gommage oxydatif. Ces composés sont les plus répandus aujourd'hui pour stabiliser les matières grasses et les huiles. Ils ont non seulement des noms, mais aussi des structures semblables (voire **figure 4**). Leur effet antioxydant se rassemble aussi. (27)

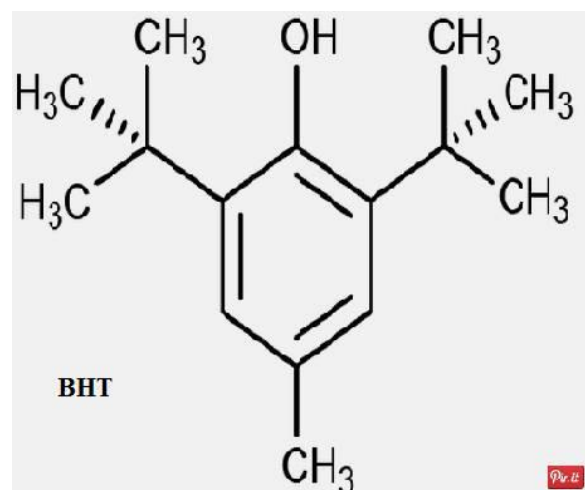
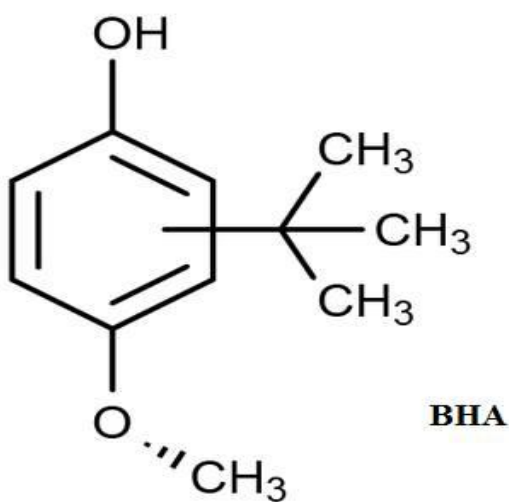


Figure 04 : structure chimique de L'HBA et l'BHT. (28)

Des études de toxicité chronique ont attribué une certaine activité tumorigène à l'BHT lorsqu'il est absorbé en concentration élevées. Par ailleurs, l'BHA et l'BHT peuvent tous deux être d'importants inhibiteurs de la carcinogenèse, à cause de leur effet antioxydant. (27)

❖ Les antioxydants naturels

Il est bien évident qu'une alimentation saine et équilibrée assure un apport considérable d'antioxydants naturels pour le bon fonctionnement de l'organisme humain, elles incluent principalement (26) :

✓ Vitamine E

Il est peut-être l'antioxydant naturel le plus connu. De plus, son rôle métabolique ou physiologique dans l'organisme semble lié à une fonction antioxydante. Même si la fonction antioxydante de la vitamine E dans l'alimentation et le corps humain semble identique, il ne faut pas oublier certaines différences importantes. La vitamine E est aussi appelée tocophérol et il existe au moins sept types différents appelés constituants de la vitamine E (alpha, gamma, et delta « tocophérol »).notant que les formes delta et gamma ont une activité plus importante que l'alpha-tocophérol comme antioxydant naturel qui agit en donnant des électrons.(27)

✓ Acide ascorbique

Ou vitamine C qui agit comme antioxydant en donnant de l'hydrogène. Même si l'acide ascorbique est un antioxydant naturel, on ne le retrouve pas en forte concentration dans les matières grasses et les huiles à cause de sa faible liposolubilité. C'est pourquoi son efficacité comme antioxydant est limitée à cet égard, mais il peut agir en synergie avec d'autres antioxydants comme la vitamine E et l'BHT. Composé semblable à l'acide ascorbique, le palmitate d'ascorbyle est aussi un antioxydant efficace. Même si on n'en trouve pas à l'état naturel, on peut le considérer comme un antioxydant naturel parce qu'il donne, à l'hydrolyse, de l'acide ascorbique et de l'acide palmitique, deux composés naturels. (27)

✓ Les Caroténoïdes

Sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, également dans le lait, empêchent les dommages génétiques, protègent contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêchent l'expression des oncogènes, augmentent l'activité de communication des gaps jonctions. Les exemples de caroténoïdes, incluent l'alpha carotène, bêta carotène, lycopène, phytofluène, phytoène, lutéine, neoxanthine, viloxanthine, anthéroxanthine ,alphacryptoxanthine et bêta cryptoxanthine.(25)

✓ Les Polyphénols

Les Polyphénols sont le plus grand groupe de composés phytochimiques, et la plupart d'entre eux ont été trouvés dans les aliments à base de plantes. Les régimes alimentaires riches en polyphénols ont été liés à de nombreux avantages pour la santé. Ce sont des antioxydants puissants qui complètent et ajoutent aux fonctions de vitamines et enzymes antioxydantes comme moyen de défense contre le stress oxydatif causé par l'excès d'espèces réactives de l'oxygène, ce groupe de produits naturels est très diversifié et contient plusieurs sous-groupes de composés phénoliques, Pour simplifier les discussions, la classification des polyphénols se fera selon les structures chimiques des aglycones. (29)

- Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques non-flavonoïde qui peuvent être divisés en deux types principaux, l'acide benzoïque et dérivés de l'acide cinnamique à base de C1-C6 et C3-C6. Alors que les fruits et les légumes contiennent beaucoup d'acides phénoliques libres, dans les céréales et les graines en particulier dans le son ou la coque, Ces acides phénoliques ne peuvent être ni libérés ni hydrolysés, ou dégradés par des enzymes. (29)

- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une structure générale en squelette C6-C3-C6 dans lequel les deux unités (C6 cycles A et B) sont de nature phénolique (**voire figure 5**). En fonction du motif d'hydroxylation et les variations dans le cycle chromane (cycle C), Les flavonoïdes peuvent être divisés en différents sous-groupes tels que les anthocyanines, flavan-3-ols (sont souvent appelés catéchines), les flavones, les flavonones et flavonols. Ces structures de base de flavonoïdes sont aglycones ; Cependant, chez les végétaux, la plupart de ces composés existent sous forme de glycosides. Les activités biologiques de ces composés, y compris l'activité antioxydante, dépendent à la fois de la différence de structure et les motifs de glycosylation. (29)

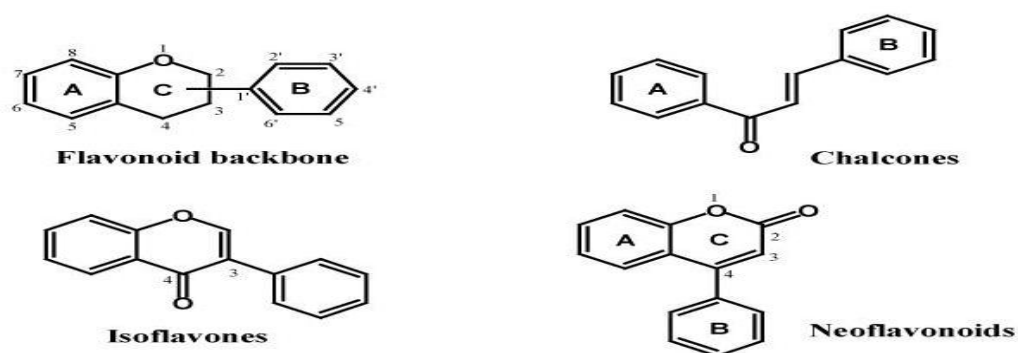


Figure 05 : structures des flavonoïdes de base. (29)

➤ Flavones, flavonols, flavanones et flavanols

Ces sous-groupes de flavonoïdes sont les plus communs, et se trouvent presque partout, dans tout le règne végétal. (29)

➤ Les Flavanoles et proanthocyanidines

Flavonoïdes ou flavan-3-ols sont souvent communément appelés catéchines, ils se trouvent dans de nombreux fruits, en particulier dans les raisins. Les proanthocyanidines sont traditionnellement considérés comme des tanins condensés. Flavonoïdes et oligomères (contenant 2-7 unités monomères) sont connus comme de puissants antioxydants, qui ont été associés à plusieurs avantages potentiels pour la santé. (29)

➤ Isoflavones, néoflavonoïdes et chalcones

Les isoflavones sont surtout présents dans la famille des légumineuse des plantes. Les néoflavonoïdes ne sont pas souvent trouvés dans les plantes alimentaires, mais le daidzéine est l'isoflavone la plus courante et relativement largement répandue dans le règne végétal et les chalcones sont présents dans les fruits comme les pommes et du houblon ou des bières. (29)

- Les anthocyanes

Les anthocyanes sont les principaux composants des pigments rouges, bleus et violets de la majorité des pétales de fleurs, fruits et légumes, et certaines variétés spéciales de grains. Cyanidine, delphinidine et pélagonidine sont les anthocyanes plus largement trouvés, avec plus de deux douzaines d'autres anthocyanes monomères (un total de 31 anthocyanidines). (29)

- Les amides polyphénoliques

Deux de ce groupe d'amides polyphénoliques sont d'importance pour être les principales composantes des aliments courants : capsaïcinoïdes dans les piments et avenanthramides dans l'avoine. (29)

- Autres polyphénols (non flavonoïdes)

En plus des acides phénoliques, les flavonoïdes et les amides phénoliques, il existe plusieurs polyphénols non flavonoïdes présents dans les aliments qui sont considérées comme importantes pour la santé humaine. Parmi ceux-ci, le resvératrol est unique aux raisins et le vin rouge. (29)

5. Effet biologiques des antioxydants

Certains antioxydants **piègent ou luttent** en direct contre les radicaux libres responsables du stress oxydant et des dommages cellulaires.

Les antioxydants ralentissent le vieillissement et prolongent la durée de vie des cellules.(30)

D'autres ont des effets **protecteurs** vasculaires en freinant l'oxydation du mauvais cholestérol (LDL cholestérol) impliqué dans les processus d'athérosclérose. (31)

Les antioxydants constituent un moyen d'intervention contre la maladie coronarienne en empêchant les espèces de radicaux libres d'oxyder les lipoprotéines. (32)

Les antioxydants ont montré d'effets bénéfiques comme unique ou traitement adjuvant de l'hépatite C chronique, maladie alcoolique du foie et de la stéato-hépatite non alcoolique. (33)

L'administration d'antioxydants naturels et synthétiques tels que, la quercétine, la catéchine, la taurine, l'acide gallique, la mélatonine, N-acétyl-cystéine, l'acide lipoïque α et d'autres ont été reconnus dans la prévention de la maladie et la guérison contre l'intoxication aux métaux lourds.ils ont la capacité d'améliorer le mécanisme de défense antioxydant cellulaire en régénérant antioxydants endogènes et influencent également la signalisation cellulaire et le déclenchement redox voies de régulation sensibles. (34)

L'apport d'antioxydants exogènes (vitamines E, C, bêta-carotène et d'autres) pourrait protéger contre le cancer et d'autres maladies dégénératives chez les personnes ayant des niveaux innés ou acquis élevés des espèces réactives de l'oxygène. (35)

Des études récentes ont montrés que certains antioxydants (la silymarine) jouent un rôle important dans le traitement le contrôle des complications induites par la surcharge en fer chez les patients avec β -thalassémie. (36)



PARTIE EXPERIMENTALE

Objectif du travail

L'objectif de ce travail est de faire une analyse et poursuite de la croissance de la levure de *Saccharomyces cerevisiae* soumise à des conditions particulières (stress oxydatif) en présence de l'extrait aqueux des feuilles de *l'eruca vesicaria sativa* de la région d'el Bayadh en vue d'évaluer son activité antioxydante.

MATERIELS ET METHODES

1. Echantillonnage

Les feuilles de *l'eruca vesicaria sativa* ont été récoltées durant le mois de décembre 2019 dans 02 régions : point Kilométrique N°36 sur la route nationale N°06 et la commune de Bougtob (El bayadh). (Voir **figure 06**)

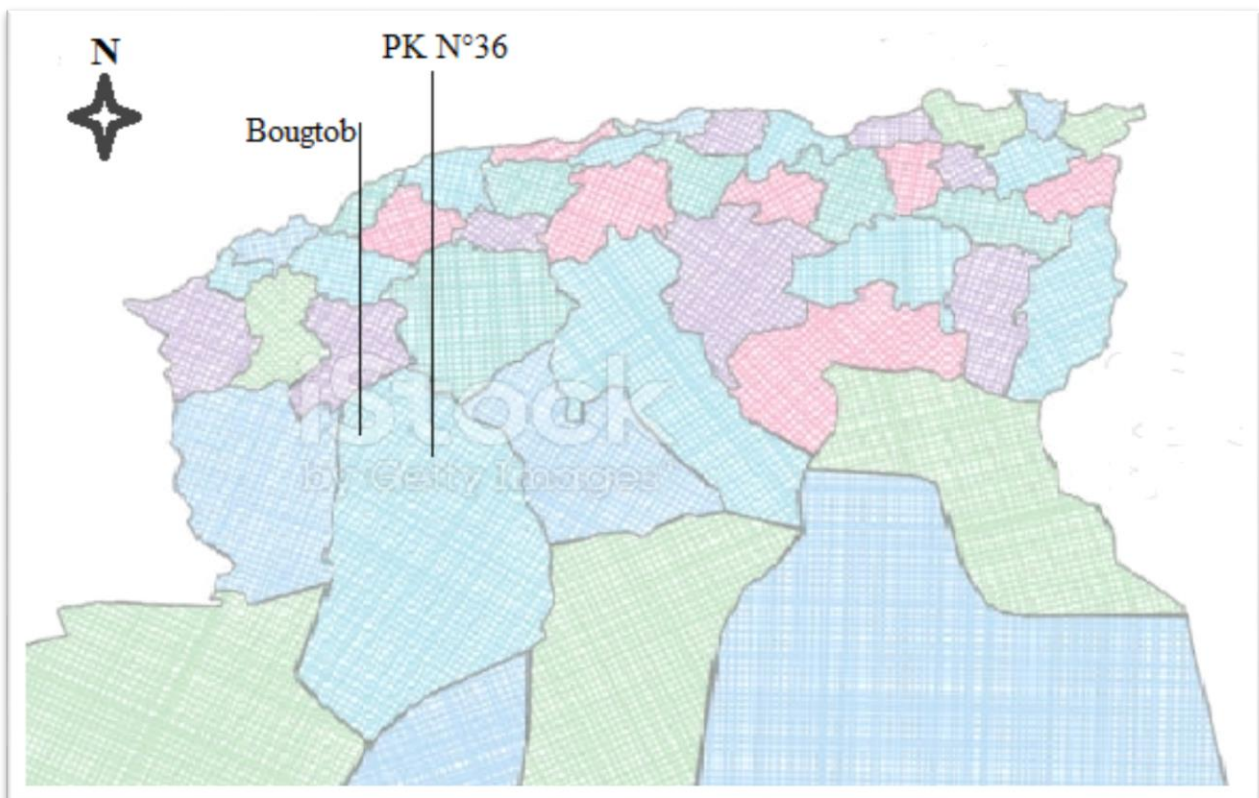


Figure 06 : Situation géographique des régions de récolte.

Les feuilles ont été séchées à température ambiante, après le séchage elles ont été conservées dans des sacs en papier kraft.

2. Préparation des extraits

Les feuilles séchées ont été broyées par la suite à l'aide d'un broyeur automatique au sein du laboratoire de Une partie fraîche a été conservée dans des conditions nécessaires pour l'utiliser en macération.

2.1. Extraction

Les extraits utilisés au cours de notre études sont préparés selon plusieurs mode d'extraction : en macération ou sous reflux.

2-1-1- préparation de l'extrait aqueux par macération (EA1)

- 10g de feuilles découpé en petit morceaux sont mise en macération à température ambiante avec 100 ml de l'eau distille pendant 48h.
- L'extraction est réalisée par percolation 3 fois. Après extraction l'extrait est filtré
- Le filtrat récupéré est séché à sec.(37)

2-1-2- préparation de l'extrait aqueux sous reflux (EA2)

Extraction sous reflux et à chaud (100° C) de 50 g de feuilles en présence de 300 ml d'eau distille pendant 20 minute, On dépose souvent quelques grains de pierre ponce pour réguler l'ébullition, ce qui permet d'éviter d'avoir de grosses bulles qui se forment et projettent le milieu réactionnel sur les parois du ballon et du réfrigérant. (**Voire figure 07**)

Filtration de la solution et récupération du filtrat

Evaporation à sec du filtrat.(37)

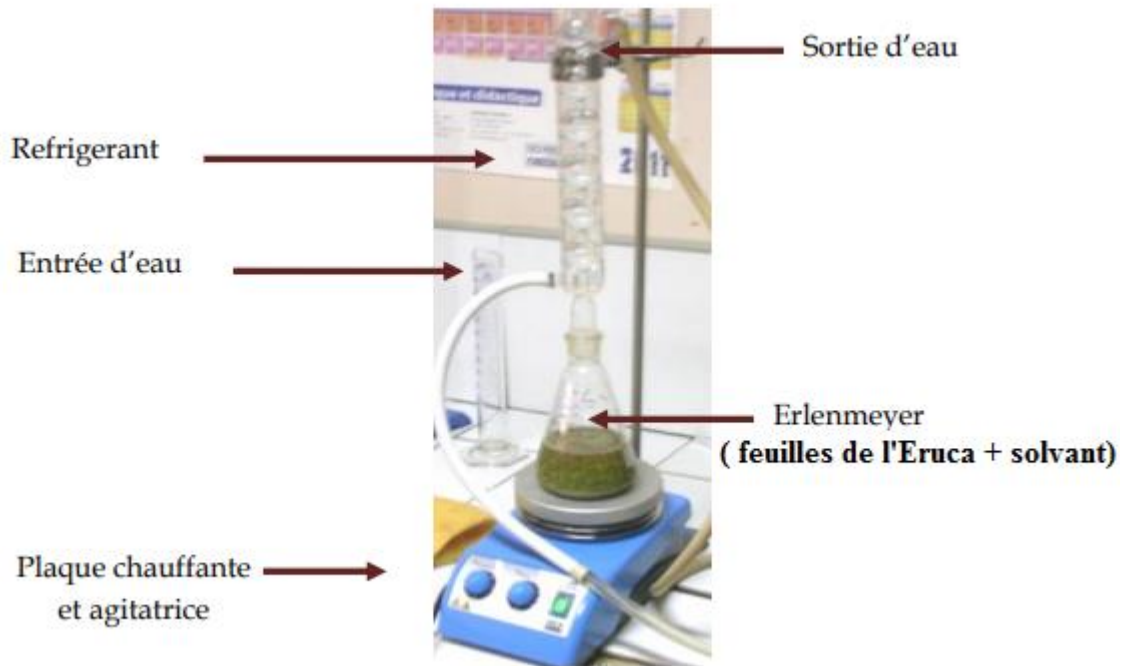


Figure 07 : Extraction sous reflux de feuille de la roquette. (37)

Afin d'améliorer notre travail et dans le but d'avoir des extraits de différents solvant nous avons procédé à une préparation par un mélange eau méthanol

2.1.3 Préparation de l'extrait eau méthanol (EM)

Extraction sous reflux et à chaud (100°C) de 10g de feuilles dans 100 ml du mélange eau/méthanol (V/V : 20/80), pendant 20min.

Filtration et récupération du filtrat; le filtrat est évaporé à sec; Le produit est récupère sur les parois de ballon d'évaporation.

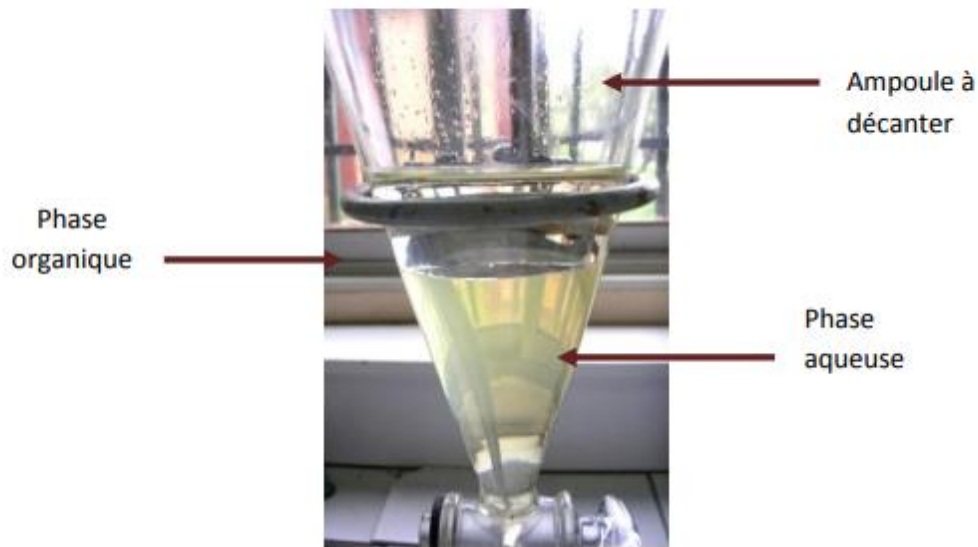


Figure 08 : Montage de l'extraction liquide/liquide. (37)

Après extraction set filtration plusieurs dilutions ont été réalisées sur les extraits de la roquette objet de l'étude sur lesquels nous avons réalisé différents tests et activités.

3. Matériel biologique

La souche utilisée durant cette étude est la levure instantanée boulangère *Saccharomyces cerevisiae* nommée (saf-instant). C'est une souche pure fabriquée en France par S.I.L esaffre59703Marq France. Le choix de cette espèce de levure est basé sur les critères suivants; croissance rapide, culture facile, obtention de biomasse abondante, conservation de ses caractères biochimiques, aucun risque de variation génétique, pouvoir fermentaire élevé et disponibilité.

3.1. Caractéristiques de la souche étudiée

Les caractéristiques physiologiques de la souche *Saccharomyces cerevisiae* sont représentées dans le tableau ci-dessus (**Tableau II**).

Tableau II : Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Saccharomyces cerevisiae*.

Caractéristiques	
Température optimale de croissance	28- 30°C
pH optimal de croissance	4 - 4,5
Mode respiratoire	Aérobie anaérobie facultatif
Mode de reproduction	Sexué et asexué
Forme	Sphérique plus ou moins arrondie
Métabolite	Production d'éthanol par voie fermentaire

3.2. Milieux de culture

Dans cette étude, nous avons utilisé un seul milieu de culture, il s'agit du milieu PDA, La gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre (PDA) est utilisé pour l'isolement, culture et dénombrement des levures et des moisissures dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires. Le milieu de culture préparé est favorable à la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, est le milieu PDA (PDL liquide) ou additionné de 15g/l d'agar quand il est solide. Pour la préparation du milieu PDA, on pèse 200g de pomme de terre, après l'avoir épluchée. Une fois coupée en petits morceaux, on met ces morceaux dans 300 ml d'eau distillée et on laisse ce mélange bouilli à 100° C pendant 20 à 25 minutes. Cette eau bouillie est récupérée (environ 300 ml). Après, on fait dissoudre 20g de glucose dans l'extrait de pomme de terre et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu' à 1000ml. La solution obtenue est autoclavée à la température de 104° C, pendant 30 min.(milieu organique). (38)

4. Dosage des Polyphénols

- **Principe du dosage**

le dosage des composés phénoliques totaux est basé sur la méthode de Folin-Ciocalteu , ce réactif de couleur jaune va oxydé l'ensemble des polyphénols. Lors de l'oxydation l'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique sont réduits avec développement d'une coloration bleue qui est proportionnelle à la concentration de composés phénoliques et possède une absorption maximale aux environs de 765 nm. (38)

- **Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon la méthode décrite par Vermerius et Nicholson en 2006. 400 microlitres de l'extrait éthanolique dilué de moitié a été mélangé avec 1.6ml d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7.5 % fraîchement préparée, 2 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué aux 1/10^{ème}) ont été ajoutés puis homogénéisés à l'aide d'un vortex, le tout a été laissé pendant 30 minutes à température ambiante, la lecture a été effectuée contre un blanc d'éthanol absolu à l'aide d'un spectrophotomètre (OPTIZEN) à 765 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme référence. (38)

- **Préparation de la gamme étalon**

Un standard de calibration a été préparé à différentes concentrations (0.004-0.014 m/ml) à partir d'une solution mère d'acide gallique à concentration de 4mg/100 ml. Les mêmes conditions opératoires que les extraits ont été appliqués et la lecture a été faite à 765 nm à l'aide d'un blanc (éthanol).

5. Dosage des flavonoïdes

➤ Principe du dosage

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. (38)

➤ Mode opératoire

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode colorimétrique décrite par Ardestani et Yazdanparast en 2006 par le trichlorure d'aluminium. 1 ml de l'extrait aqueux dilué de moitié a été mélangés avec 3ml d'eau distillée, suivis de 300 μl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 7 %. Après cinq minutes d'incubation, 300 μl de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 10 % ont été ajoutés au mélange, le tout a été laissé pendant six minutes. Ensuite, 1 ml d'hydroxyde de sodium (1M) a été ajouté aux tubes. Après 5 minutes, l'ensemble a été agité à l'aide d'un Vortex, la lecture est faite à 510 nm contre un blanc de méthanol absolu à l'aide d'un spectrophotomètre. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif. Les résultats ont été exprimés en milligrammes équivalent de catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg CEQ/g).

6. Activité antioxydante

6.1. Test DPPH

- **Principe du dosage**

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH.) est réalisé par une méthode qui permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de la concentration inhibitrice à 50 % (CI50) des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H⁺. (39)



- **Mode opératoire**

50µl de chaque solution aqueuse des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025g/l). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) obtenue selon la formule suivante. (40)

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Les valeurs de l'EC50 ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire. (40)

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions à l'aide d'une solution mère d'acide ascorbique préparée à partir de 100 mg d'acide dans 100 ml de méthanol. 05 dilutions (d) ont été réalisées à partir de cette solution.

6.2. Pouvoir antioxydant (capacité antioxydante totale)

- **Principe du dosage**

La capacité antioxydant totale (CAT) des extraits de plante est évaluée par la méthode de Phosphomolybdène. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO₄²⁻ à molybdène Mo (V) MoO₂⁺ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/ Mo(V) à pH acide.(41)

- **Mode opératoire**

Un volume de 0.3 ml de chaque extrait aqueux est mélangé avec 3 ml de solution du réactif (0.6 M acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes sont vissés et incubés à 95C° pendant 90 min. Après refroidissement,

l'absorbance des solutions est mesurée à 695 nm contre le blanc qui contient 3 ml de la solution du réactif et 0.3 ml du méthanol et il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. La capacité antioxydant totale est exprimée en milligramme équivalents d'acide ascorbique par gramme de la matière sèche (mg EAA/ g MS). (41)

7. Activité microbienne

7.1. Réponse membranaire suite au stress éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae*

Les expérimentations effectuées dans cette étude visent à caractériser le maintien de l'intégrité fonctionnelle en relation avec la composition en stérols membranaires chez la levure *S. cerevisiae* soumise à différents types de perturbations éthanoliques (augmentation de la concentrations en éthanol dans le milieu de croissance, chocs éthanoliques d'amplitude croissante et suivi au cours du temps ; choc à 10% , 15% et 20% pendant 15 minutes en présence d'extrait aqueux de la plante puis suivi au cours du temps après retour dans un milieu sans éthanol (« pulse » 20% d'éthanol). (42)

7.2. Le comportement de Levure *Saccharomyces cerevisiae* vis-à-vis d'un xénobiotique

Ce travail concerne l'influence du xénobiotique « Zinc » appliqué dans des traitements combinés avec Cd dans la présence et ou l'absence de Calcium sur l'activité respiratoire de *Saccharomyces cerevisiae*. Le suivi de l'inhibition d'activité respiratoire avec une assimilation d'oxygène en présence de l'extrait aqueux de la plante permet d'évaluer son effet sur l'activité respiratoire de la levure. (43)

7.3. Traitement de la levure avec du H₂O₂ en présence du glutathion et d'extrait aqueux de la roquette

Pour mieux caractériser sa fonction au cours d'un stress oxydant, nous avons soumis des cellules de levure contenant différentes concentrations intracellulaires de GSH à un traitement H₂O₂ en présence de concentrations différentes d'extraits de plante et nous avons comparé leurs réponses physiologiques au stress. Nous avons ainsi montré qu'en l'absence totale de GSH, un stress oxydant provoque l'endommagement des composants cytoplasmiques et nucléaires des cellules ainsi que l'inhibition de leurs activités traductionnelles et transcriptionnelles. (44)

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux de l'extrait méthanolique **étudié par BENTAFAR Sarra et al (2016)** d'Eruca vesicaria a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent d'acide gallique par mg d'extrait sec. On utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée par l'acide gallique .

Selon les résultats obtenus, la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait méthanolique d'Eruca vesicaria est de l'ordre de $1.63\mu\text{g GAE/mg}$ d'extrait. La grande majorité des polyphénols ne sont pas hydrosolubles. Par conséquent, pour obtenir des fractions riches en polyphénols, il est préférable d'employer des mélanges du solvant organique approprié avec de l'eau. L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols. Cette augmentation est peut être due à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses. Elle pourrait également être due à l'augmentation de la basicité et de l'ionisation des polyphénols dans telles solutions. La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, de poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base. Le résultat que nous avons obtenus est inférieur à cet obtenu par **(Sarwar Alam.M et al., 2007)**. Cette différence observée peut s'expliquer par la provenance géographique, le cultivar, la variété et surtout le degré de maturité et la durée de stockage.

2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes est réalisée par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) en utilisant comme standard la Catéchine.

Les analyses quantitatives des flavonoïdes, sont déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage exprimées en μg équivalent de Catéchine par g de la matière sèche de roquette. (Voire **figure 09**)

La teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique d'Eruca vesicaria étudié **par BENTAFAR Sarra et al (2016)** est égale à $2.14\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait. La raison principale pour laquelle on a choisi cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits **(Gomez-Caravaca et al. 2006)**.

Les teneurs rapportées par **Saima H et al.,2014**, sur les extraits d'*Eruca sativa*, sont très élevées par rapport à nos résultats, cette différence trouve probablement son explication dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes.

D'après les résultats cités ci-dessus on constate que l'extrait aqueux pourrait être plus riche en raison de la méthode d'extraction utilisée.

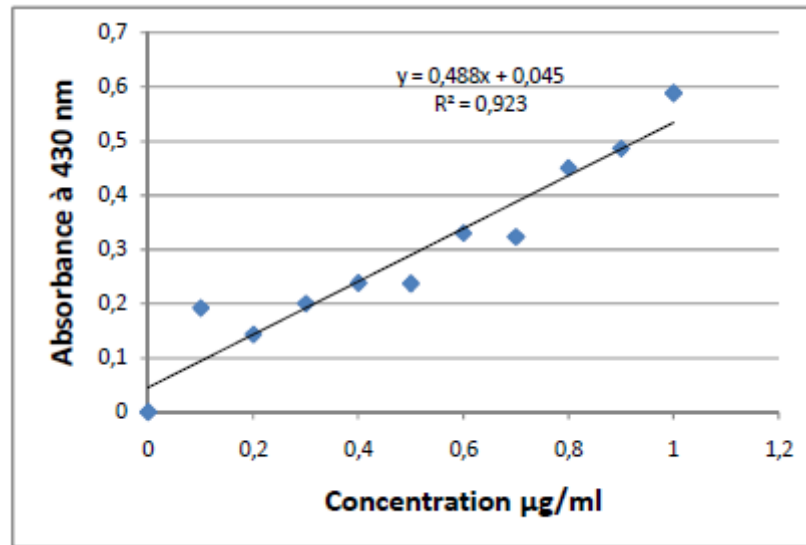


Figure 09 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

3. Activité antioxydante

3.1. Test DPPH

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant. Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait de la plante. Nous avons déterminé la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC50), qui constitue l'activité antioxydante de l'extrait étudié en utilisant la courbe de régression linéaire : $y = ax + b$.

Selon **Saima H et al.,2014**, le pourcentage d'inhibition augmente graduellement ou progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'enrayement presque total du DPPH présent dans le milieu. A partir des courbes des taux d'inhibition, nous avons pu déduire graphiquement les valeurs d'IC50 de l'Ac ascorbique et de l'extrait méthanolique de

la plante étudiée ; représentées dans La valeur de L'IC50 est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (taux d'inhibition I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est appréciable. Selon les résultats enregistrés, l'extrait de la plante est doté d'un pouvoir antioxydant important, leur IC50 est : 0,16 mg/ml mais relativement faible que celle d'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,036 mg/ml. Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**De Pooter H.L. et al., 1986**).

Les polyphénols contenus dans l'extrait méthanolique d'Eruca vesicaria étudié par **BENTAFAR Sarra et al (2016)** sont probablement responsables de l'activité antioxydante de cet extrait. Cela est en accord avec les travaux menés sur les extraits de *S. montana*, espèce riche en composés phénoliques qui sont responsables de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydante et antimicrobienne (**Ćetković G.S et al., 2007**). Comparativement à d'autres études, nos résultats concordent avec ceux obtenus par (**Koubaa M en 2015 et saima H et ses collaborateurs en 2014**) sur les différents extraits d'Eruca sativa.

Notre protocole de recherche est voisin de ceux de **BENTAFAR Sarra et al (2016)** et **De Pooter H.L. et al., 1986**) ce qui permet de conclure une similitude très proche de l'extrait aqueux et méthanolique.

3.2. Pouvoir oxydant

L'activité antioxydante d'extrait de la plante étudiée *Eruca vesicaria* a été évalué en utilisant la méthode de FRAP (Ferric reducing antioxydant power). Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (**Benzie I.F.F.,Strain J.J.,1996**) . Il est universel peut être appliquer aussi bien chez les plantes et que les plasmas et dans les extraits organique et aqueux (**Li H-B ; Wong C-C et al ., 2008**) . La présence des réducteurs dans les extraits de la plante provoque la réduction de Fe³⁺/ complexe ferricyanide à la forme ferreux. par conséquent, Fe²⁺ peut être évaluer en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Chung Y-C ; Chang C-T,2002**).

Selon résultats de (**Chung Y-C ; Chang C-T,2002**) nous avons remarqué chez les extraits testés l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées. A la concentration de 0,5mg/ml, le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique d'Eruca

vesicaria est égale à $DO = 0.858$ Et cette valeur, elle est nettement inférieure à celui de l'acide ascorbique, pour ce dernier la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0.2mg/ml. Le pouvoir réducteur de l'espèce *Eruca vesicaria* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (**Siddhuraju P et Becker K, 2007**).

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par (**Saima.H et al., 2014**) sur les différents extraits d'*Eruca sativa* vue la seule différence du solvant d'extraction.

4. Activité microbienne

4.1. Réponse membranaire suite au stress éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae*

Les résultats obtenus par **Quoc-Bao Vo-Van (2012)** démontrent l'importance de l'ergostérol dans le maintien de l'intégrité membranaire et supportent également l'hypothèse du rôle « vecteur » de l'éthanol vis à vis d'une oxydation, dont l'efficacité serait dépendante de la nature des stérols présents au niveau membranaire. Les premiers résultats analysant la cinétique de transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif suggèrent une formation plus importante de formes réactives de l'oxygène (ROS) induite par le choc éthanol chez un mutant affecté dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol.

L'ensemble des résultats trouvés par **Quoc-Bao Vo-Van (2012)** démontrent que le choc éthanol entraîne une altération de l'intégrité membranaire.

La présence d'extrait aqueux de la plante pourrait être d'effet significatif sur la perméabilité membranaire de la levure vue la présence de polyphénols totaux.

4.2. Le comportement de Levure *Saccharomyces cerevisiae* vis-à-vis d'un xénobiotique

Les résultats obtenus par **Lilia ZAOU, Mohamed Reda DJEBAR 2011**, ont montré l'inhibition d'activité respiratoire avec une assimilation d'oxygène d'environ (52%) chez les cellules traitées avec les concentrations 5mM et 10mM. Cependant, pour les cellules traitées avec Cd^{2+} / Ca^{2+} et Cd^{2+} / Zn^{2+} , une activité respiratoire est observée avec une haute consommation d'oxygène (56%) à comparé avec les cellules témoins. Ceci pourrait éventuellement montrer que l'activité de détoxification mise en jeu serait énergie dépendante.

Donc, la mesure d'activité respiratoire montre que l'accumulation de Cd peut être associée au stress oxydatif reflétant l'action toxique du Cadmium, d'où le traitement en présence du calcium et / zinc peut interdire et réduire ses effets indésirables.

Notre objectif est de minimiser le stress oxydatif associé au cadmium en présence d'antioxydants polyphénoliques de forte activité en corrélation avec les résultats de *Lilia ZAOUI, Mohamed Reda DJEBAR (2011)*.

4.3. Traitement de la levure avec du H₂O₂ en présence du glutathion et d'extrait aqueux de la roquette

Les résultats obtenus par **Ludivine Monceau (2006)** ont lui permet d'identifier deux paramètres cruciaux dans cette régulation : la concentration d'H₂O₂ résiduelle qui, au-dessus d'un certain seuil, est responsable de la réoxydation itérative du facteur, et la réduction catalytique de Yap1, probablement via les thiorédoxines (Trx).

Les Trx interviennent aussi sur le premier paramètre, puisqu'elles sont les réductases des peroxyrédoxines (Prx), assurant la dégradation de l'H₂O₂. Trx et Prx étant contrôlées par Yap1, il y a autorégulation de Yap1 par le biais des deux paramètres identifiés. Ces résultats établissent que Yap1 est un moniteur hautement fiable de [H₂O₂].

Dans une deuxième partie, nous avons identifié la forme oxydée de Yap1 in vivo, deux ponts disulfures intramoléculaires et proposé un modèle pour leur formation, faisant intervenir l'association séquentielle de deux molécules d'Orp1 oxydé avec Yap1. Notre étude montre que la configuration de la forme oxydée de Yap1 assure la stabilité de sa forme active. Finalement, nous avons tiré parti de la fonction de moniteur redox de Yap1 pour étudier la contribution des Prx, Trx et catalases dans le contrôle de [H₂O₂], ainsi que celle des régulateurs Msn2/4 et conclure à l'existence d'une régulation fine et permanente de l'H₂O₂, de type homéostatique.

L'ensemble des résultats obtenus montrent une similitude avec ceux de **TODOROVA, Tatina (2007)** dans l'approche de la détoxification de composés toxiques d'origine exogène et endogène ce qui nous a permis de déduire une possibilité d'inclure des antioxydants détoxifiants d'origine naturels tels les polyphénols de l'Eruca sativa.



Conclusion générale

Conclusion générale

Au terme de notre travail, dont l'objectif est la valorisation des feuilles de l'*Eruca vesicaria.sativa. L* provenant de différentes régions d'Algérie et l'évaluation de leurs propriétés antioxydantes nous avons pu avoir d'importantes données sur la chimie de la roquette et ces propriétés thérapeutiques.

Dans la première partie, la quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux en flavonoïdes et en tannins qui restent satisfaisante.

Dans la deuxième partie, nous avons pu établir et déterminer deux activités biologiques : antioxydante sur la levure.

Le screening de l'activité antioxydante totale et l'activité antiradicalaire nous a permis de mettre en évidence un fort pouvoir antioxydant de la plante étudiée.

Il paraît évident que les variations des résultats trouvés dépendent des profils polyphénoliques des feuilles et leurs effet sur la levure.

L'ensemble de ces résultats permet donc de valoriser cette plante peu étudié dans notre pays particulièrement les feuilles et de mettre en évidence sa composante polyphénolique d'intérêts biologiques, agroalimentaire et industriel surtout la laiterie et les engrais. Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- Faire un dosage HPLC des flavonoïdes et tannins.
- Faire un recensement des différentes classes de composés phénoliques.
- Identification et isolement des ces composés pour les utiliser dans des formulations industrielles.
- Elargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* sur plusieurs souches microbiennes.
- Réaliser un test antiparasitaire.
- Faire d'autres tests biologiques suivant le métabolisme de la levure.



Références bibliographiques

(01) **Mélinda Wilson**, Fleurs comestibles: du jardin à la table, Les éditions Fides, 2007, p. 190-192

(02) <https://www.passeportsante.net/fr/Nutrition> [En ligne]. [Page consultée 20/08/2020]. https://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=roquette_nu.

(03) **Jamal BELLAKHDAR** (1997). Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle au Maroc : la situation actuelle, les produits, les sources du savoir ; Enquête ethnopharmacologique de terrain réalisée de 1969 à 1992. [Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'université de METZ, Spécialité "Science de la vie" soutenue publiquement le 4 avril 1997]. Université de METZ ; centre des sciences de l'environnement.

(04) **Warwick et al. (2006)** Brassicaceae: Species checklist and database on CD-Rom [En ligne]. [Page consultée le 31/11/2019]. 259, pages 249-258. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00606-006-0422-0>.

(05) **Bentafar Sarra et al** (2016). Contribution à l'étude phytochimique et à l'effet antioxydant de l'extrait méthanolique d'*Eruca vesicaria*. [Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques Spécialité : Biochimie moléculaire et santé]. Constantine Université des Frères Mentouri, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

(06) *Eruca vesicaria* subsp. *sativa* (Mill.) Thell. [En ligne]. [Page consultée 12/01/2020]. <https://www.tela-botanica.org/isfan-nn-78048-illustrations>

(07) **Bennett RN, Rosa EA, et al.** Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis eruroides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish rocket). *J Agric Food Chem* 2006 May 31;54(11):4005-15.

(08) **Vargas AJ, Burd R.** Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutr Rev.* 2010 Jul;68(7):418-28.

(09) **Bennett RN, Mellon FA, et al.** Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L. (salad rocket). *Phytochemistry* 2002 September;61(1):25-30.

(10) **Kim SJ, Jin S, Ishii G.** Isolation and structural elucidation of 4-(beta-D-glucopyranosylthiobutyl)butyl glucosinolate from leaves of rocket salad (*Eruca sativa* L.) and its antioxidative activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004 December;68(12):2444-50.

(11) **Barillari J, Canistro D, et al.** Direct antioxidant activity of purified glucoerucin, the dietary secondary metabolite contained in rocket (*Eruca sativa* Mill.) seeds and sprouts. *J Agric Food Chem* 2005 April 6;53(7):2475-82.

(12) **Lund E.** Non-nutritive bioactive constituents of plants: dietary sources and health benefits of glucosinolates. *Int J Vitam Nutr Res* 2003 March;73(2):135-43.

(13) **Grubben, G. J. H. & Denton, O. A. (eds)** 2004. *Plant resources of Tropical Africa* 2 July 2003 Pages 298-298.

(14) **Mohammad SALMA (2013).** Etude et caractérisation de l'état «viable mais non cultivable chez *Saccharomyces cerevisiae*. [Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Bourgogne, discipline : sciences de l'alimentation ,spécialité : Microbiologie]. Université de Bourgogne, institut universitaire de la vigne et du vin. UMR PAM A02-102.

(15) **Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress response of *Saccharomyces cerevisiae*.**[en ligne]. [page consultée le 20/02/2020].
https://www.researchgate.net/publication/12455671_Influence_of_magnesium_ions_on_heat_shock_and_ethanol_stress_response_of_Saccharomyces_cerevisiae.pdf

(16) http://dlibrary.univboumerdes.dz:8080/bitstream/123456789/3768/1/merged_document_7.pdf

(17) **Furukawa et Kimura, 1971.**Effect of Pantothenic Acid Deficiency on Lipid Metabolism in the Yeast, [En ligne]. [Page consultée le 20/02/2020] 1971 p. 219-224.
<https://doi.org/10.5925/jnsv1954.17.219>.

(18) Blom et al., 2000; Flikweert et al., 1999; Van Hoek et al., 2000. Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. [En ligne]. [Page consultée le 20/02/2020]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022900001642>.

(19) Hohmann et Mager, 2003. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. [En ligne]. [Page consultée le 26/02/2020]. https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-45611-2_4.

(20) Romano. Et Suzzi 1993. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. [En ligne]. [Page consultée le 26/02/2020]. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1000102006018>.

(21) Kahina Bouhadjra épouse fodhil. Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. [Mémoire de magister, chimie, chimie de l'environnement]. Tizi-Ouzou : université Mouloud Mammeri faculté des sciences, département de chimie ; 2011.

(22) J. Haleng et al. Le stress oxydant [En ligne]. Rev Med Liege ; 62 : 10 : pages 628-638, 2007, http://www.chu.ulg.ac.be/upload/docs/application/pdf/201001/stress_oxydant_rmlg_2007.pdf [page consultée le 08/03/2016].

(23) SPORT-PASSION. Radicaux libres et antioxydants. [En ligne]. <http://www.sport-passion.fr/sante/radicaux-libres-et-antioxydants.php> [page consultée le 08/03/2016].

(24) Carol Ann O'Hare. LA NUTRITION.fr. La famille des radicaux libres. [En ligne]. Juin 2010. <http://www.lanutrition.fr/bien-dans-son-age/vieillesse/radicaux-libres-antioxydants-et-vieillesse/la-famille-des-radicaux-libres.html>. [Page consultée le 09/03/2016].

(25) Manallah ahlem. Activité antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea*. [Mémoire de magister, Biochimie, Biochimie appliquée]. Sétif : université Ferhat Abbas, faculté des sciences de la nature et de la vie ; 2012.

(26) ABBES Amal. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXIZIE, HUILES ESSENTIELLES D'AMMOIDES VERTICILLATA «NOUKHA» DE LA REGION DE TLEMCEM. [En ligne]. Tlemcen. Juin 2014. <http://docplayer.fr/9804126-Memoire-de-fin-d-etude-diplome-de-master-theme.html>.

(27) John W. Hilton. Les antioxydants : rôles, types et nécessités dans les aliments pour animaux de compagnie. [En line]. **Canada**. Pottruff & Smith, October 1989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1681283/pdf/canvetj00563-0068.pdf>.

(28) chemistry.about. This is the chemical structure of Butylated HydroxyToluene (BHT). Photo Credit: Todd Helmenstine. [en line]. <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---B/BHT.htm#step-heading>. [Page consultée le 08/03/2016].

(29) Rong ,Tsao. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphénols. [En line]. 93 Stone Road West, Guelph Ontario, N1G 5C9, Canada, December 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257627/pdf/nutrients-02-01231.pdf>

(30) Izabela ,Sadowska-Bartosz et and Grzegorz ,Bartosz. Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. [En line]. Zelwerowicza Street 4, 35-601 Rzeszow, Poland, Academic Editor: Efstathios S. Gonos, Mars 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3982418/pdf/BMR12014-404680.pdf>

(31) SANTEPRATIQUE.fr.Antioxydants. [en ligne]. <http://www.santepratique.fr/antioxydants.php#effetsdesantioxydantsdanslorganisme>. [Page consultée le 08/03/2016].

(32) Jane A. Leopold, M.D. Antioxidants and Coronary Artery Disease: From Pathophysiology to Preventive Therapy. [en line]. Coron Artery Dis, Mars 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4315737/pdf/nihms631492.pdf>

(33) Singal AK1, Jampana SC et Weinman SA. Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. [En line]. 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228367/pdf/nihms310432.pdf>

(34) S.J.S. Flora, Rupal Shrivastava et Megha Mittal. Chemistry and Pharmacological Properties of Some Natural and Synthetic Antioxidants for Heavy Metal Toxicity. [en line]. <http://www.eurekaselect.com/112179/article>. [Page consultée le 07/03/2016].

(35) Salganik RI. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. [en line]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11603657>. [Page consultée le 09/03/2016].

(36) Hadi Darvishi Khezr, et al. Potential Effects of Silymarin and Its Flavonolignan.

Components in Patients with β -Thalassemia Major: A Comprehensive Review in 2015. [en line]. Iran, Mahmoud S. Ahmed, Janvier 2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4779508/pdf/APS2016-3046373.pdf>

(37) **HADJ MOUSSA ALI** (2012). Contribution à l'étude in vitro de l'effet des extraits de feuilles de *Retama raetam* sur l'activité de l' α -amylase. [Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du Diplôme d'Etude Supérieur en Biologie, option Biochimie] Université de Tlemcen. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, de la Terre et de l'Univers Département de Biologie Laboratoire de recherche.

(38) Aggoune Bahia ; Zerkane Iman (2016). étude du comportement rhéologique d'une levure *Saccharomyces cerevisiae* en milieu liquide. [Mémoire de projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master Filière : science Biologiques Spécialité : Biotechnologie Microbienne] Boumerdes .Université M'Hamed bougara. Faculte des sciences, departement de biologie.

(39) **Harrar Abd el Nacer** (2011-2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. [mémoire de magister en Biochimie et physiologie expérimentale, Sétif, université Ferhat abbes, faculté des sciences de la nature et de vie.

(40) **Nabila Bougandoura et Nassima Bendimerad** (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq., Laboratoire des Produits Naturels, Université Abou Bakr Belkaid, BP 119, Tlemcen 13000, Algérie, Revue « Nature & Technologie ».

(41) **Ouafa Medjoujda** (2012). Méthodes d'études d'activité des antioxydants des plantes médicinales, Université d'Agadir – licence. Mémoireonline. [en ligne]. [Page consultée le 20/01/2016], http://www.memoireonline.com/03/15/8988/m_Methodes-d-etudes-d-activite-des-antioxydants-des-plantes-medicinales19.html.

(42) **Quoc-Bao Vo-Van** (2012). Exploration fonctionnelle de la réponse au stress chez des micro-organismes d'intérêt technologique : dynamique de la réponse membranaire suite au stress éthanolique chez *Saccharomyces cerevisiae*.pdf

(43) Lilia ZAOUI, Mohamed Reda *DJEBAR* (2011). Le stress oxydatif comme processus inducteur d'action toxique du Cadmium sur la Levure (*Saccharomyces cerevisiae*). [en ligne]. [Page consultée le 04/05/2020], <https://revues.imist.ma/index.php/technolab/article/view/397>.

(44) Ludivine Monceau (2006). Identification des paramètres contrôlant l'état redox de Yap1, régulateur majeur de la réponse au stress oxydant et homéostasie des peroxydes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. [en ligne]. <https://www.theses.fr/2006PA112100>.

Résumé

Notre travail est basé principalement sur l'étude l'évaluation de l'activité antioxydante de la roquette (*Eruca vesicaria*) vis-à-vis un stress oxydatif appliqué sur une levure *Saccharomyces cerevisiae*. C'est une plante qui pousse dans la région méditerranéenne, utilisée en thérapie. Après extraction aqueuse, des méthodes spectrophotométriques ont été utilisées pour le dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins.

. L'estimation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux a montré la richesse des feuilles et des tiges d'*Eruca vesicaria* par ces composés.

Les activités antiradicalaires ont été évaluées à travers des tests chimiques tels que : DPPH et le pouvoir antioxydant FRAP. Les résultats obtenus montrent une activité réductrice élevée.

Les méthodes de l'activité antioxydante montrent que tous les extraits étudiés présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux.

Mots clés : *Eruca vesicaria*, polyphénols, *Saccharomyces cerevisiae*, activité antioxydante, DPPH,

Abstract

Our work is mainly based on the study of the evaluation of the antioxidant activity of the roquet (*Eruca vesicaria*) when oxidative stress applied to a yeast *Saccharomyces cerevisiae*. It is a plant that grows in the Mediterranean region. , used in therapy.

After aqueous extraction, spectrophotometric methods were used for the determination of polyphenols, flavonoids and tannins.

The quantitative estimation of total polyphenols and total flavonoids showed the richness of leaves and stems of *Eruca vesicaria* by these compounds.

The anti-free radical activities have been evaluated through chemical tests such as: DPPH and the antioxidant power FRAP. The results obtained show a high reducing activity.

The methods of antioxidant activity show that all the extracts studied exhibit antioxidant properties at different levels.

Keywords : *Vitis vinifera* ; Polyphenols, *Saccharomyces cerevisiae*, antioxidant, DPPH°.

ملخص

يتمحور عملنا بشكل أساسي على دراسة تقييم النشاط المضاد للأكسدة في الجرجير (*Eruca vesicaria*) مقابل الإجهاد التأكسدي المطبق على خميرة *Saccharomyces cerevisiae* ، و الجرجير هو نبات ينمو في منطقة البحر الأبيض المتوسط. ، المستخدمة في العلاج الطبي

. بعد الاستخراج المائي ، تم استخدام الطرق الطيفية لتقدير البوليفينول والفلافونويد والعفص في أوراق النبتة قيد الدراسة.

. أظهر التقدير الكمي لمجموع البوليفينول والفلافونيدات الكلية ثراء أوراق وسيقان الجرجير الحويصلي بهذه المركبات.

تم تقييم الأنشطة المضادة للجذور الحرة من خلال الاختبارات الكيميائية مثل: DPPH وقوة مضادات الأكسدة FRAP.

النتائج التي تم الحصول عليها تظهر نشاط اختزال عالي و قدرة ارجاع معتبرة للجرجير.

توضح طرق النشاط المضاد للأكسدة أن جميع المستخلصات التي تمت دراستها لها خصائص مضادة للأكسدة على مستويات مختلفة.

الكلمات المفتاحية: الجرجير الحويصلي ، البوليفينول ، الخميرة الخبازية ، النشاط المضاد للأكسدة ، DPPH ،