

Etude de l'effet antioxydant des anthocyanes de l'Olive, du Raisin rouge, du Chou rouge et de la Fraise.

H. Yousfi, El H. Tahri; A. El Amrani et H. Serghini. Caid

Laboratoire d'Amélioration et de Production Végétales, Département de Biologie Faculté des Sciences, Oujda, Maroc.

hafida1000@yahoo.fr E-mail:

Coopération UMP-CUD 2003/2007 ; Activité Ouj 03

Résumé :

Dans ce travail, nous avons tenté d'étudier le rôle potentiel antioxydant des extraits anthocyaniques de la fraise, du raisin rouge, du chou rouge et des olives vis-à-vis de l'eau oxygénée en présence ou non d'une activité peroxydasique. Les résultats que nous avons obtenus, ont montré que seuls les extraits anthocyaniques du chou rouge présentent, dans nos conditions expérimentales, une réaction directe avec l'eau oxygénée. Cette réaction n'est que très légèrement favorisée en présence d'une activité peroxydasique.

Mots clés : Antioxydants, Anthocyanes, Chou rouge, Fraise, Olives, Raisin

Introduction

Les anthocyanes, molécules appartenant à la famille des flavonoïdes, sont des pigments qui participent à la coloration de certaines parties des plantes (fleurs, fruits, feuilles, tiges, racines ou graines) en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (Brouillard., 1993).

Plusieurs études suggèrent que les anthocyanes ont un effet bénéfique dans les traitements de nombreuses maladies de microcirculation résultantes de la fragilité des capillaires (Havsteen., 1993). Ces pigments peuvent, aussi, prévenir le cholestérol responsable de l'athérosclérose (Kadar et al., 1979; Scharrer et Obre, 1981). Ils posséderaient, en plus, d'autres propriétés biologiques comme agents anti-inflammatoires et anti-cancérigènes (Kamei et al., 1995).

Les effets positifs de ces pigments peuvent être liés à leur potentiel antioxydant démontré par plusieurs études in vitro (Tsuda et al., 1994). Ces anthocyanes peuvent, en effet, attaquer les radicaux O_2^- (Sichel et al., 1991; Tsuda et al., 1996), OH^\cdot (Tsuda et al., 1996), ROO^\cdot et l'oxyde nitrique (Sabe et al., 1995). Ils inhibent la peroxydation lipidique induite par le Cu^{2+} (Vinson J.A. et al., 1995), le Fe^{2+} et l'irradiation par les U.V (Tsuda et al., 1996).

Aux USA, la consommation des anthocyanes est estimée à 180-215 mg/j (Kuhau, 1976), celle des autres flavonoïdes est de l'ordre de 23 mg /j (Hertog et al., 1993). Cette consommation a prouvé une forte capacité à prévenir certaines maladies chroniques.

Matériel et Méthodes

Les pigments anthocyaniques ont été extraits (broyage et centrifugation) dans le tompon acétate 0.1M, pH 4.5 contenant du méthanol à une hauteur de 20%(V/V). L'évolution de l'intensité de la couleur des pigments anthocyaniques a été suivie dans les quatre milieux réactionnels par spectrophotométrie à 530 nm. Les résultats sont exprimés en % par rapport aux densités optiques initiales. L'activité peroxydasique a été obtenue par broyage de 1,1g de feuilles d'une graminée (*Hordeum murinum*) cueillie sur le campus universitaire a été broyé dans 10 ml de tampon acétate 0.1 M, pH 4.5 contenant du méthanol (80/20 : v/v) puis centrifugé à froid (4°C) à 4000 tours/min pendant 8 min. Le surnageant obtenu (extrait peroxydasique) a servi à l'étude de l'activité peroxydasique. Cette dernière a été mesurée selon la méthode de Hammerschmidt (Hammerschmidt et al., 1982), selon laquelle la peroxydation du guaiacol entraîne la formation du tétraguaiacol :



La réaction entre les anthocyanes et l'eau oxygénée catalysée éventuellement ou non par l'enzyme peroxydase que nous avons nous même préparée (voir ci-dessus) a été suivie selon le protocole suivant :

	milieu (1)	milieu (2)	Milieu (3)	Milieu (4)
Extrait anthocyanique (ml)	3	3	3	3
Tampon (ml)*	0,2	00	00	00
Eau oxygénée (50%) (ml)	00	0,04	0,04	0,04
Extrait peroxydasique bouilli (ml)	00	00	0,2	00
Extrait peroxydasique (ml)	00	00	00	0,2

Tampon acétate 0,1 M pH 4.5 contenant du méthanol (80/20 : v/v).

MR= Milieu réactionnel.

Le milieu 1 permet de suivre la stabilité de l'extrait anthocyanique, et milieu 2, la réaction directe de l'eau oxygénée avec l'extrait anthocyanique. Le milieu 3 représente un témoin pour la réaction enzymatique qui pourrait avoir lieu dans le milieu 4.

Résultats et discussion

Plusieurs études in vitro ont montré que les flavonoïdes peuvent directement piéger des espèces moléculaires de l'oxygène actif comme les superoxydes (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et le radical hydroxyle (OH) (Bors et al., 1990 et 1994; Yamasaki et al., 1996). Récemment, on a démontré que les anthocyanes (cyanidin-3-sophoroside) peuvent piéger l'excès en H₂O₂ en présence d'une enzyme de type peroxydase (Yamasaki et al., 1997).

Dans ce travail, nous avons tenté d'étudier le rôle potentiel antioxydant de nos extraits anthocyaniques en adoptant la méthode de Yamasaki et al., 1997) citée ci-dessus. Le choix de cette méthode est dicté par deux raisons essentielles :

* Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) constitue l'une des plus importantes sources génératrice des radicaux libres d'oxygène (Yamasaki et al., 1997) ; son élimination ou tout au moins la réduction de sa teneur conduirait a priori à la réduction des autres espèces moléculaires radicalaires de l'oxygène.

* La mise en évidence de la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les pigments anthocyaniques catalysée par une peroxydase s'avère être aisément réalisable alors que le dosage des autres espèces radicalaires nécessite des moyens sophistiqués (La résonance paramagnétique électronique par exemple) et qui ne sont pas à notre disposition.

Recherche de l'effet antioxydant de l'extrait anthocyanique du chou rouge

L'addition de l'extrait de la graminée contenant l'activité peroxydasique au milieu réactionnel refermant l'extrait anthocyanique du chou rouge et de l'eau oxygénée a conduit à une réduction de la couleur de ces pigments anthocyaniques (diminution de la DO mesurée à 530 nm) (fig.1). Toutefois, cette réduction de couleur n'est que légèrement plus importante en présence (tracé 3) qu'en l'absence (tracé 2) de l'extrait peroxydasique. Ce résultat suggère que :

* les pigments anthocyaniques de l'extrait du chou rouge réagiraient directement avec l'eau oxygénée sans l'intervention d'une peroxydase,

* L'enzyme peroxydase ne fait qu'accélérer légèrement la réaction entre l'eau oxygénée et les pigments anthocyaniques du chou rouge,

* L'enzyme que nous avons utilisée pourrait ne pas être d'une grande affinité pour les pigments anthocyaniques du chou rouge,

* L'extrait anthocyanique du chou rouge contiendrait lui même une activité peroxydasique capable de catalyser la réaction 'H₂O₂ + Anthocyanes du chou rouge ' (ce point reste donc à vérifier).

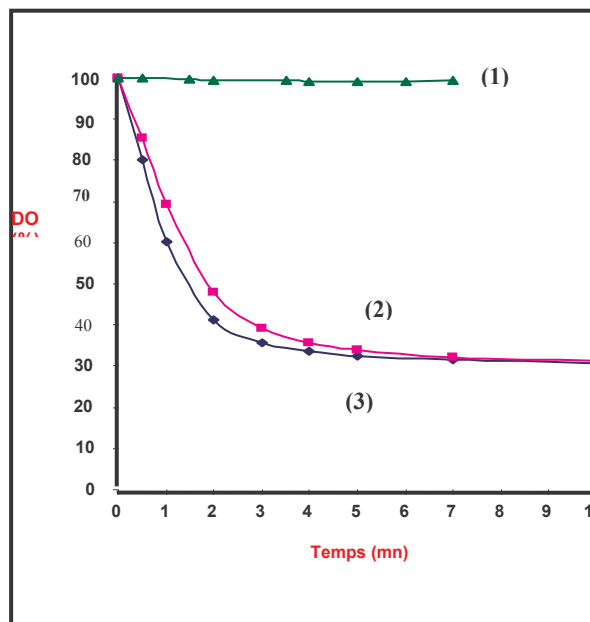


Figure 1 : Evolution de la couleur de l'extrait anthocyanique du chou rouge additionné ou non (1) d'eau oxygénée (5%) (2) ou de l'eau oxygénée ou à la fois de l'eau oxygénée et de l'extrait peroxydasique (3).

Recherche de l'effet antioxydant des extraits anthocyaniques du raisin, de l'olive ou de la fraise

Pour les extraits du raisin, de l'olive ou de la fraise, aucune réaction n'a été enregistrée entre leurs

pigments anthocyaniques et l'eau oxygénée ; que la réaction est catalysée ou non par l'extrait peroxydasique que nous avons utilisé (fig. 2).

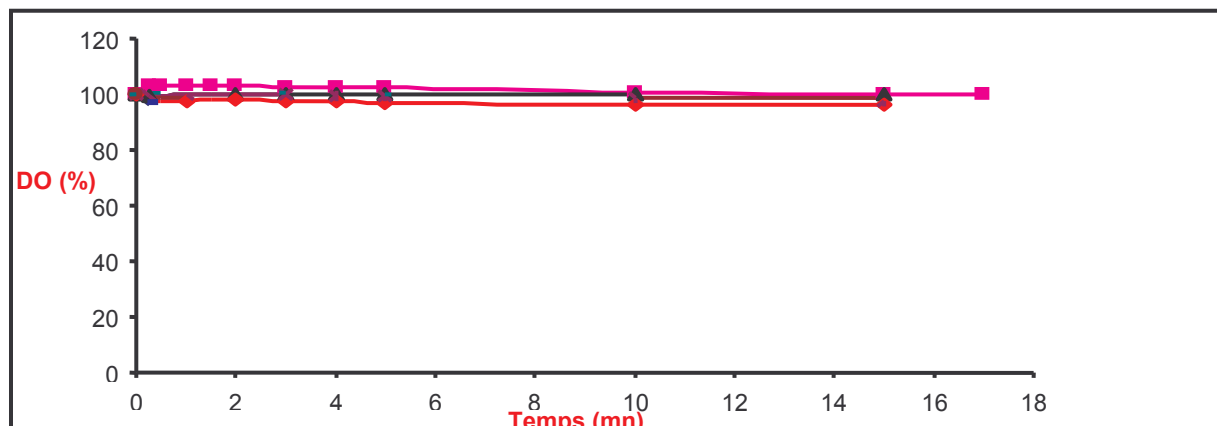


Figure 2 : Evolution de la couleur des extraits anthocyaniques du raisin (—▲—), d'olives (—◆—), et de la fraise (—■—) en présence de l'eau oxygénée et de l'extrait peroxydasique.

Yamasaki et al., (1997) a montré que certains flavonols sous leur forme glycosidique ou aglycone sont oxydés par H₂O₂ en présence de l'enzyme peroxydase purifiée à partir du raifort.

La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres est liée essentiellement à leur structure moléculaire (Bors et al., 1990). En effet, les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (Cyanidine) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons,
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3,

A la lumière de ces données, seule une identification de la composition flavonoïdique de nos extraits à posséder une activité antioxydante.

Conclusion

L'étude que nous avons réalisée a montré que pour les quatre extraits anthocyaniques, seuls l'extrait obtenu à partir du chou rouge a montré une activité antioxydante. Les pigment anthocyanique de ce légume réagiraient directement avec l'eau oxygénée et cette réaction n'est que très légèrement accélérée par l'extrait peroxydasique que nous avons employé.

Bibliographie

Bors W, Michel C, Saran M (1994)- Flavonoid antioxydant. Methods enzymol, 234: 420-429.

Bors W., Heller W., Michel C., et Saran M., (1990)- Flavonoids as antioxydants: determinate of radical-scavenging efficiencies méthodes enzymol, 186: 343-355

Brouillard R., (1993)- The flavonoids, Advances in research since 1986, éd. J.B Harborne, Chapman and Hall, London, 525-538.

Hammerschmidt R., Nuckles E.M. et Kuc J. (1982)- Association of enhanced peroxydase activity with induced systemic resistance of cucumber to colletotrichum lagenarium. Physiol.PL. pathol., 20: 73-82

Havsteen B., (1983)- Flavonoïdes, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem.Pharmacol. 32:1141-1148.[Medline]

Hertog M.G.L., Feskens E.J., Hollman P.C.H., Katan M.B., and Kromhout D., (1993)- Dietary antioxidant flavonoïdes and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly study. 342:1007-1011.

Kadar A., Robert L., Miskulin M., Tixier J.M., Brechemier D., et Robert A.M., (1979)- Influence of anthocyanoside treatment on the cholesterol-induce atherosclerosis in the rabbit paroi arterielle; 5:187-205. [Medline].

Kamei H., Kojima T., Hasegawa M., Koide T., Umeda T., Yukawa T. et Texabe K., (1995)- Suppression of tumour cell growth by anthocyanins in vitro. Cancer Invest. 13:590-594 [Medline].

Kuhnau J., (1976)- The flavonoids. A class of semi-essential food component: their role in human nutrition. World Rev Nutr Diet; 24:117-191. [Medline].

Sabe V. A., Tromp M.N.J.L., Haenen G.R.M.N., Van der vijgh WJF, Bast A.,(1995)- Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. Biochem Biophys Res commun,214:755-9-[Medline].

- Sabe V. A., Tromp M.N.J.L., Haenen G.R.M.N., Van der vijgh WJF, Bast A.,(1995)- Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res commun*,214:755-9-[Medline].
- Scharrer A., Obre M., (1981)- Anthocyanosides in the treatment of retinopathies. *Klin Monatsbl Augenheilkd*.178:386-9. [Medline].
- Sichel G., Cosaro C., Scalia M., Bilio A.J.D., et Bonomo R.P., (1991)- In vitro scavenger activity of some Flavonoids and melanins against O₂. *Free Radic . Biol Med*. 11:1-8. [Medline].
- Tsuda T, Schiga K, Ohshima K, Kawakishi S, Osawa T., (1996)- Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanins pigments isolated from *phaseolus vulgaris* L. *Biochem pharmacol*; 52: 1033-9 [Medline].
- Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Choi S.-W., Kawakishi S. et Osawa T., (1994)- Antioxidative of anthocyanin pigment Cyanidin 3-0-β-D-glucoside and Cyanidin. *J. Agric. Food chem.*. 42:2407-2410.
- Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M., et Jang J.,(1995)- Plant flavonoids, especially tea flavonoids, are powerful antioxidants using an in Vitro oxidation model for heart disease. *J Agric Food chem*; 43:2800-2
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., and Ikehara, N.,(1997)- Flavonoid-peroxydase reaction as detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant physiol*. 115: 1405-1412.