

MARTHA ESTRELLA GARCIA PEREZ

CARACTÉRISATION DE COMPOSÉS PHENOLIQUES DES EXTRAITS
DE RAMILLES DU BOULEAU JAUNE : ÉTUDE DE LEUR CAPACITÉ
ANTIOXYDANTE

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences du bois
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DU BOIS ET DE LA FORÊT
FACULTÉ DE FORESTERIE ET GEOMATIQUE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

RÉSUMÉ

Les composés phénoliques des ramilles du bouleau jaune extraits à l'acétone/eau (70/30 v/v) et ses fractions ont été étudiés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). De plus, la capacité antioxydante de ces extraits a été déterminée à température ambiante et aux températures élevées. La capacité antioxydante à la température ambiante a été examinée en utilisant deux méthodes basées sur la réactivité des extraits avec un radical libre, stable en solution, le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). La calorimétrie différentielle (DSC) et la thermogravimétrie (TG) ont été employées pour l'étude de la capacité antioxydante des extraits à haute température. Un antioxydant synthétique, couramment utilisé dans l'industrie alimentaire et cosmétique, le BHT (2,6-di-ter-butyl-4-méthyl-phenol) a servi de référence afin de valider le réel potentiel antioxydant des extraits phénoliques étudiés. L'analyse chimique par CLHP a indiqué la présence de l'eugénol, du thymol, de l'acide salicylique, du salidroside, du guaïacol, de l'épicatéchine, de la vanilline et de la taxifoline dans les extraits. L'eugénol, le thymol, l'acide salicylique, le guaïacol, l'épicatéchine, la vanilline et la taxifoline n'avaient jamais été identifiés précédemment dans les extraits de ramilles de bouleau jaune. En particulier, le thymol et la taxifoline sont de nouveaux composés identifiés pour le genre *Betula*. Parmi les échantillons, la fraction à l'acétate d'éthyle et la fraction aqueuse sont les plus efficaces d'un point de vue capacité antioxydante à température ambiante. En revanche, la fraction à l'éther et l'extrait brut ont montré une activité antioxydante plus élevée à de hautes températures. L'antioxydant BHT a montré le meilleur comportement antioxydant dans la plupart des essais effectués, sauf dans la méthode cinétique avec le DPPH. Les résultats de cette étude confirment l'importance d'examiner la capacité antioxydante en employant des méthodes diverses dans différentes conditions expérimentales.

ABSTRACT

The phenolic constituents of the aqueous acetone extract (70/30, v/v) and its fractions obtained from yellow birch twigs were studied by using high-performance liquid chromatography (HPLC). Additionally, the antioxidant capacity of the studied extracts was determined at ambient and at elevated temperatures. The antioxidant capacity of the extracts at room temperature was studied using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) based methods. Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG) were used to evaluate antioxidant capacity of the extracts at high temperatures. The commercial antioxidant 2,6-di-tert-butyl-4-methyl-phenol (BHT), commonly used in food and cosmetic industries, was used as antioxidant reference. The HPLC analysis revealed the presence of eugenol, thymol, salicylic acid, salidroside, guaiacol, epicatechine, vanillin and taxifoline in the natural extracts. Some of them have not been reported previously neither for yellow birch nor for others birch species. Among samples, the ethyl acetate and aqueous fractions exhibited the highest antioxidant capacity at ambient temperature. The ether fraction and crude extract showed the highest antioxidant activity at high temperatures. BHT exhibited the best antioxidant behavior in most of the reported tests, except in the kinetic method with DPPH. The results of this study confirm the importance of testing the antioxidant capacity by using different methods under various experimental conditions.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire comprend 2 publications présentées dans les chapitres 2 et 3 du présent document :

Article 1:

García-Pérez, M.E., Diouf, P.N., Stevanovic, T. (2007) Characterisation of phenolic compounds from yellow birch twigs extracts. Cette article sera soumis à la revue “Journal of Ethnopharmacology”

Article 2:

García-Pérez, M.E., Diouf, P.N., Stevanovic, T. (2008). Comparative study of antioxidant capacity of yellow birch twigs extracts at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*. 107 : 344-351

Le rôle des co-auteurs dans la préparation de ces articles est divisé comme suit. L’auteur principal, Martha-Estrella García-Pérez, a fait la revue de littérature complète, a effectué la plus grande majorité des travaux expérimentaux ainsi que la première version anglaise des articles. Le Dr. Papa Niokhor Diouf a effectué des travaux selon son expertise dans le domaine des antioxydants aussi bien que dans la caractérisation chimique de composés phénoliques. La Professeure Tatjana Stevanovic a effectué bon nombre de corrections de fond et de forme sur les articles et a soumis de nombreuses suggestions expérimentales au cours de l’écriture.

Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier Mme. Tatjana Stevanovic pour m'avoir accueilli dans son équipe, et avoir persisté pendant deux années dans son intention de me faire prendre part à ce travail. Mon cheminement personnel n'aurait pas été le même sans votre aide et supervision scientifique.

Mille mercis au Dr. Papa Diouf pour avoir eu la patience de me montrer les principes scientifiques dans le monde des polyphénols et m'avoir donné la chance de partager mes idées avec lui d'une façon si dynamique.

Merci aussi à Monsieur Yves Bédard pour toute l'aide qu'il m'a apportée au cours de mon travail au laboratoire. Sans toutes les techniques qu'il m'a montrées, rien de tout ceci n'aurait été possible.

Mes remerciements s'adressent également à tout le personnel du CRB ; à vos côtés, j'ai appris que dans le bois il y a un monde intéressant, plein de secrets à découvrir.

Je voudrais remercier de tout mon cœur mon frère pour son exemple et le soutien apporté pendant toute ma vie. Un gros merci à mes parents qui, très loin de moi, ont suivi chaque étape avec beaucoup d'amour.

Finalement, merci à mon copain Raul qui m'a beaucoup encouragée tout au long de ce travail. Merci d'avoir montré beaucoup de patience avec moi durant les moments les plus stressants.

Table des matières

CHAPITRE 1. Revue de littérature.....	14
1.1 Description botanique.....	14
1.1.1 Le genre <i>Betula</i>	14
1.1.2 Le bouleau jaune.....	15
1.2. Les composés phénoliques.....	16
1.2.1 Classification.....	17
1.3 Méthodes d'analyse de polyphénols.....	27
1.3.1 Extraction.....	27
1.3.2 Hydrolyses.....	32
1.3.1 Identification de polyphénols par chromatographie liquide à haute performance. .	33
1.4 Polyphénols et bouleaux.....	36
1.5 Les polyphénols comme des molécules bioactives.....	46
1.5.1 Polyphénols et maladies cardio-vasculaires.....	46
1.5.2 Propriétés anti-inflammatoires et effets sur le système immunitaire.....	47
1.5.3 Propriétés anti-cancérogènes.....	48
1.5.4. Propriétés antioxydantes.....	49
1.6. Méthodes pour mesurer la capacité antioxydante des polyphénols.....	54
1.6.1 Méthodes utilisant des radicaux libres.....	58
1.6.2 Méthodes mettant en jeu la formation de produits au cours de l'oxydation.	61
1.6.3. Méthodes d'oxydation accélérée.....	63
1.6.4 Autres méthodes.....	66
1.7 Antioxydants et bouleaux.....	67
OBJECTIFS, HYPOTHÈSES ET MÉTHODOLOGIE.....	71

CHAPITRE 2. Characterisation of phenolic compounds from yellow birch twigs extracts....	74
2.1 Introduction	77
2.2 Materials and Methods	78
2.2.1 Twigs Samples.....	78
2.2.2 Standards and solvents.....	79
2.2.3 Extraction and Solvent fractionation	79
2.2.4 Chromatographic system.....	80
2.2.4 Lignin Determination.....	82
2.3 Results and Discussion	83
2.3.1 Extraction and solvent fractionation	83
2.3.2 Lignin determination.....	84
2.3.3 Identification and quantification of phenolic compounds of yellow birch twigs....	85
2.4 Conclusions	93
CHAPITRE 3. Comparative study of antioxidant capacity of yellow birch twigs extracts at ambient and high temperatures	94
3.1. Introduction	97
3.2 Materials and methods.....	99
3.2.1 Chemicals.....	99
3.2.2 Extraction	100
3.2.3 Total phenols content.....	100
3.2.4 Evaluation of antioxidant capacity	100
3.2.5 Statistical analysis.....	103
3.3 Results and discussion	103
3.3.1 Total phenols content.....	103
3.3.2 Antioxidant properties at ambient temperature	104

3.3.3 Methods at high temperatures	107
3.4 Conclusions.....	112
Conclusions générales.....	114
Bibliographie	116

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Absorption UV des flavonoïdes

Tableau 1.2 Constituants phénoliques retrouvés chez le feuillage de *Betula alleghaniensis* Britton

Tableau 1.3 Composés phénoliques retrouvés chez les jeunes tiges de *Betula alleghaniensis*

Tableau 1.4 Concentration de molécules phénoliques retrouvées dans le bois du tronc et les sciures du bouleau jaune

Tableau 1.5 Méthodes les plus employées pour mesurer l'activité antioxydante des composés phénoliques

Table 2.1. HPLC gradient elution by the Method B

Table 2.2 HPLC gradient elution by the Method C

Table 2.3. Extract yield of yellow birch twigs samples in aqueous acetone

Table 2.4. Lignin content of yellow birch twigs

Table 2.5. Average concentration of phenolic compounds in yellow birch twig crude extract and its fractions in relation to the method used for its identification

Table 2.6. Occurrence of the identified yellow birch phenolic compounds in tissues of birch species

Table 3.1. Antioxidant capacities of crude extract, BHT and different fractions of *Betula alleghaniensis* twigs

Liste de figures

Figure 1.1 Phénols simples retrouvés dans le bois

Figure 1.2 Lignanes d'essences feuillues

Figure 1.3 Familles des flavonoïdes

Figure 1.4 Structure d'autres types de flavonoïdes

Figure 1.5 Flavonols prédominant dans les feuillages des plantes vasculaires

Figure 1.6 Structures fondamentales des tannins hydrolysables

Figure 1.7 Les molécules monomères des tanins condensés

Figure 1.8 Structures chimiques de trois nouveaux composés phénoliques isolés du xylème de *Betula pendula* Roth

Figure 1.9 Composés phénoliques fréquemment retrouvés dans les tiges des essences du genre *Betula*

Figure 1.10 Structure chimique du rhododendrol, un composé retrouvé dans l'écorce de plusieurs essences appartenant au genre *Betula*

Figure 1.11 Le linoléate de méthyle : une molécule très sensible à l'attaque de l'oxygène

Figure 1.12 Formule du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Figure 2.1 Scheme of solvent fractionation of yellow birch twigs extraction.

Figure 2.2 Yields of solvent fractionation of yellow birch twigs extraction

Figure 2.3 Structures of the phenolic compounds identified in the extracts of *B. alleghaniensis* twigs

Figure 3.1 Correlation between total phenols content and the k_a obtained by kinetic DPPH method (K-DPPHM) and C_{50} obtained by equilibrium DPPH method (E-DPPHM)

Figure 3.2 Typical thermoanalytical curves obtained for methyl linoleate oxidation by DSC and TGA methods

Figure 3.3 Comparison of methyl linoleate oxidation with and without antioxidants

Figure3.4 Correlation between DSC and TGA methods

Introduction

Le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*) est un arbre très répandu en Amérique du Nord. Principalement concentré dans la province du Québec, il en est devenu l'arbre emblématique. Son exploitation produit une grande quantité de résidus y compris les ramilles. Ces derniers ne possèdent actuellement que peu ou pas d'usages secondaires ce qui entraîne la perte d'une importante quantité de matière végétale.

Au cours des dernières années, l'intérêt pour les molécules bioactives a pris un essor considérable aussi bien pour l'industrie pharmaceutique que cosmétique ou alimentaire. C'est ainsi que 71 % des Canadiens et Canadiennes consomment des produits de santé naturels, étant donné le caractère multifonctionnel des molécules extraites de la biomasse et leur relative innocuité. Le Québec est un acteur important au niveau mondial pour la transformation du bois. Cette dernière représente une part importante de l'économie de la Province, générant d'importants revenus, mais aussi des quantités massives de résidus qui pourraient éventuellement servir comme sources de biomolécules.

Il existe plusieurs types de molécules bioactives, mais en particulier les polyphénols sont réputés pour leurs excellentes propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancérigènes. Les antioxydants jouent un rôle important pour la santé puisqu'ils sont capables de réduire ou de neutraliser les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme ; les radicaux libres sont notamment responsables de l'oxydation des cellules, de l'ADN, des protéines et des lipides qui est à la base du processus de vieillissement, de dégénération des cellules somatiques et de pathogénie de plusieurs maladies.

Malgré l'importance des polyphénols sur la santé, il existe peu d'études concernant les composés phénoliques modèles présents dans le bouleau jaune et plus particulièrement dans les ramilles. En effet, la majorité des travaux sur ce sujet utilisent des essences européennes. Compte tenu de la richesse et de la diversité des molécules qu'il est possible d'envisager dans

le bouleau jaune, tout en considérant les énormes quantités de résidus produits par l'industrie forestière sans aucune forme de valorisation, il serait intéressant d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de ramilles de cette essence afin d'assurer une voie de développement de valorisation des déchets de l'industrie de transformation du bois. D'autant plus que la tendance actuelle dans le domaine de l'industrie pharmaceutique, alimentaire et cosmétique est l'incorporation de produits naturels dans leurs formulations.

CHAPITRE 1. Revue de littérature

1.1 Description botanique

1.1.1 Le genre *Betula*

Le genre *Betula*, de la famille des Bétulacées et de l'ordre des Fagales, comprend une quarantaine d'espèces dans les zones tempérées, boréales et arctiques de l'hémisphère nord. Très peu exigeantes, les espèces appartenant au genre *Betula* s'adaptent très facilement à des sols pauvres, des conditions de sécheresse ou de froids extrêmes et colonisent ainsi facilement les espaces libres. Leur feuillage gracieux et très coloré à l'automne, combiné à une écorce très décorative aux multiples teintes pastel, confèrent aux bouleaux, un intérêt ornemental de plus en plus grand. En Amérique du Nord, on distingue trois groupes: les bouleaux à écorce foncée, les bouleaux blancs et les bouleaux nains (FNAEC 2005).

Le premier groupe (*Betula* section *Costatae* (Regel) Koehne) peut être identifié par des arbres de grande taille, ayant une écorce généralement foncée et relativement serrée ou encore qui s'exfolie avec le temps. Ce sont généralement des arbres mésophytes adaptés à des conditions moyennes d'humidité. En Amérique du Nord, le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*), le bouleau flexible (*B. lenta*) et le bouleau noir (*B. nigra*) sont considérés comme des bouleaux à écorce foncée (FNAEC, 2005).

Le deuxième groupe (*Betula* section *Betula*) est le plus circumboréale des trois. En effet, les bouleaux blancs sont reconnus par leur écorce blanchâtre qui s'exfolie à maturité. Le bouleau à papier et le bouleau blanc d'Alaska (*B. neoalaskana*) appartiennent à cette catégorie. Finalement, le troisième groupe inclut des arbrisseaux ou des arbustes des régions froides ou des tourbières humides (*Betula* section *Humiles* W. D. Koch). En Amérique du Nord, le

bouleau glanduleux (*B. glandulosa*), le bouleau pumila (*B. pumila*) et le bouleau nana (*B. nana*) sont considérés comme des bouleaux nains (FNAEC, 2005).

Au Canada, 10 espèces sont indigènes : 6 arborescentes et 4 arbustives. Certaines d'entre elles, spécialement le bouleau blanc ou le bouleau à papier, sont largement répandues dans tout le pays. D'autres espèces se limitent à une région ; bouleau jaune et bouleau gris dans l'Est ; bouleau flexible en Ontario et en Alaska ; et bouleau occidental dans l'Ouest et le Nord-Ouest.

1.1.2 Le bouleau jaune

Le bouleau jaune (*Betula alleghaniensis* Britton) est le plus grand des bouleaux indigènes. À l'âge adulte, il se distingue par la couleur dorée de son écorce satinée qui s'effiloche en fines lanières minces et frisées. Ses ramilles ont un goût de thé des bois et il pousse à une hauteur moyenne de 28 m et a un diamètre moyen de 70 cm (MRNF, 2005).

Présent surtout en milieu forestier, le bouleau jaune côtoie des essences comme l'érable à sucre (*Acer saccharum*), le hêtre (*Fagus spp*), le tilleul (*Tilia spp*) et certains conifères, dont le pin blanc (*Pinus strobus*) et le sapin baumier (*Abies balsamea*). Le bouleau jaune pousse principalement dans la zone de la forêt méridionale québécoise. C'est d'ailleurs l'un des endroits où l'on retrouve le plus de bouleaux jaunes au monde. Pour souligner son importance, le gouvernement du Québec a choisi cette essence comme arbre emblématique. En fait, cet arbre, familièrement appelé « merisier », est un symbole économique, social et culturel. En plus d'être l'un des bois nobles les plus connus au Québec, le bouleau jaune se distingue par la variété de ses usages et par sa valeur commerciale élevée. Ainsi, il est le feuillu le plus recherché pour le bois d'œuvre, notamment en ébénisterie puisqu'il est dur, résiste bien aux chocs et se travaille facilement (MRNF, 2005). Bien que les prix de la majorité des essences soient demeurés assez stables au cours des deux dernières années, ceux du bouleau jaune, compte tenu d'une demande croissante, sont en hausse (DDIPF, 2003).

L'exploitation forestière, au Québec comme ailleurs, produit une grande quantité de résidus aussi bien au niveau forestier par les feuilles et les branches coupées qu'à celui des scieries où sont produites des quantités importantes de sciures et d'écorces. Cette situation s'aggrave, car plusieurs dérouleurs sur la frontière et ailleurs importent du bouleau jaune des États-Unis, et accumulent les écorces sans aucune forme de valorisation. Au Québec, les sciures de bouleau jaune représentent environ 35000 tonnes/année de biomasse très peu valorisées. De même, des quantités énormes de ramilles et de branches restent dans les forêts sans utilisation envisageable (Lavoie, 2005).

1.2. Les composés phénoliques

Les plantes sont connues pour produire un grand nombre de composés à faible poids moléculaire dont leurs structures ont été identifiées récemment, malgré leur exploitation et leur utilisation, depuis toujours, comme médicaments ou aliments. En raison du développement remarquable des méthodes d'analyses chimiques (par exemple, la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie liquide à haute performance), il a été possible de caractériser même les composés mineurs présents dans les plantes (Rhodes, 1994).

Dans le passé, la plupart de ces composés ont été classés comme des métabolites secondaires parce qu'ils n'ont pas semblé avoir une fonction claire dans les organismes qui les produisent. De nos jours, il a été reconnu que même si ces molécules ne sont pas indispensables pour la croissance et la reproduction des plantes, elles jouent un rôle très important dans plusieurs fonctions biologiques. Beaucoup de composés secondaires sont maintenant connus non seulement en raison de leur rôle protecteur contre les effets nocifs de la lumière U.V ou d'autres facteurs abiotiques, mais également en tant que défenseurs contre les herbivores et les microbes pathogènes. De plus, ils sont reconnus pour aider au processus de pollinisation, ou même à titre de molécules clés dans beaucoup de processus physiologiques d'importance pour

les plantes. Par ailleurs, beaucoup de métabolites secondaires permettent d'augmenter les perspectives de la survie des plantes en interaction avec l'environnement (Graglia et al., 2001).

Contrairement aux métabolites dits primaires, les métabolites secondaires changent considérablement leur distribution parmi les espèces. La synthèse et l'accumulation de différents composés secondaires reflètent différentes étapes d'évolution. Certains de ces composés sont produits seulement sporadiquement, tandis que d'autres sont distribués largement dans tout le règne des plantes. Les différents composés secondaires peuvent être spécifiques aux ordres, aux familles, aux espèces, et parfois même aux taxa (Laitinen, 2000).

Dans la structure poreuse du bois on retrouve des composés de petits poids moléculaires qui sont usuellement nommés comme extractibles. Il s'agit de toute une gamme de produits naturels, dont la plupart appartiennent aux métabolites secondaires antérieurement mentionnés. Le nom « extractibles » dérive du fait qu'on peut extraire ces composés avec des solvants organiques ou de l'eau, sans procéder aux traitements intensifs qui modifient chimiquement les constituants structuraux du bois.

Un groupe largement distribué de métabolites secondaires qui appartiennent aux extractibles du bois sont les composés phénoliques. Il s'agit d'un groupe très répandu qui est représenté par divers types de composés. On définit les polyphénols comme des composés aromatiques portant plus qu'une fonction hydroxyle sur un noyau benzénique.

1.2.1 Classification

1.2.1.1 Les phénols simples

Les bois contiennent des phénols de structure simple, dont le squelette est basé sur le C6-C1 et au maximum C6-C2 (Figure 1.1). Dans les plantes supérieures, ces composés dérivent de la voie biosynthétique des phénylpropanes suivies par une dégradation du squelette C6-C3

initialement formé. Une voie directe représentée par aromatisation de l'acide shikimique semble être la voie principale vers l'acide gallique, le précurseur des tanins hydrolysables. Ainsi, on trouve les dérivés C6 tels que le crésol et le gaïacol dont le squelette de base est formé d'un noyau benzénique. Le phénol simple qui est aussi un dérivé C6, peut se retrouver dans le bois de cœur du peuplier faux tremble (*Populus tremuloides*) et dans les semences de pin sylvestre (Stevanovic 2005).

Les structures phénoliques C6-C1 constituées d'un noyau benzénique auquel est greffé un atome de carbone sont aussi retrouvées dans les extractibles du bois. Dans ce groupe, on peut mentionner les acides phénoliques (acide salicylique, p-hydroxy benzénique, gallique, vanillique) et les aldéhydes benzyliques (aldéhyde salicylique, syringique, vanilline).

La vanilline est largement distribuée et on la trouve dans la sève de l'érable à sucre, dans la *Vanilla Dahlia*, ainsi que dans le bois de cœur de diverses angiospermes. Les acides salicylique, p-hydroxybenzénique et vanillique sont présents dans les angiospermes et se retrouvent aussi bien sous forme libre que liés sous forme d'esters et de glycosides.

Parmi les composés avec des squelettes C6-C2, les dérivés de l'acide phényl acétique et des acétophénones sont les plus importants. Le p-hydroxyacétophénone et l'aglycone de picéine sont retrouvés dans les bourgeons de peuplier (*Populus balsamifera*) et également dans les branches, l'écorce et les racines de divers saules (*Salix*) (Figure 1.1).

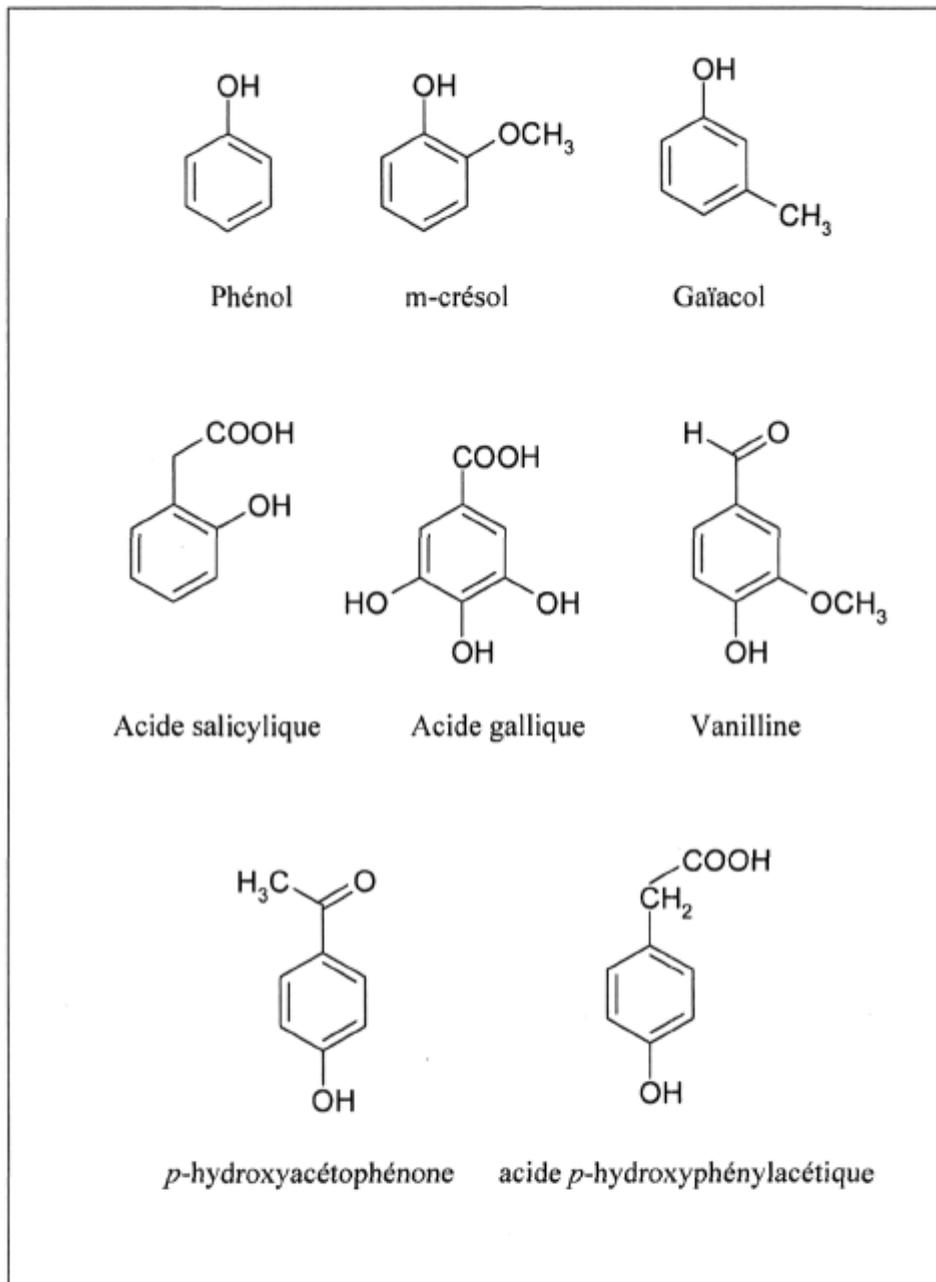


Figure 1.1 Phénols simples et leurs dérivés retrouvés dans le bois.

Un autre groupe de polyphénols simples est constitué par les lignanes, formés de deux unités phénylpropane liées entre-elles de différentes manières (Figure 1.2). Quelques-uns d'entre eux forment des structures dimères également présentes dans les molécules de lignine. Les

lignanes ont été isolés aussi bien à partir des extraits d'essences résineuses que d'essences feuillues. Parmi les lignanes de *Quercus*, *Alnus* et *Ulmus*, le syringarésinol est le plus abondant.

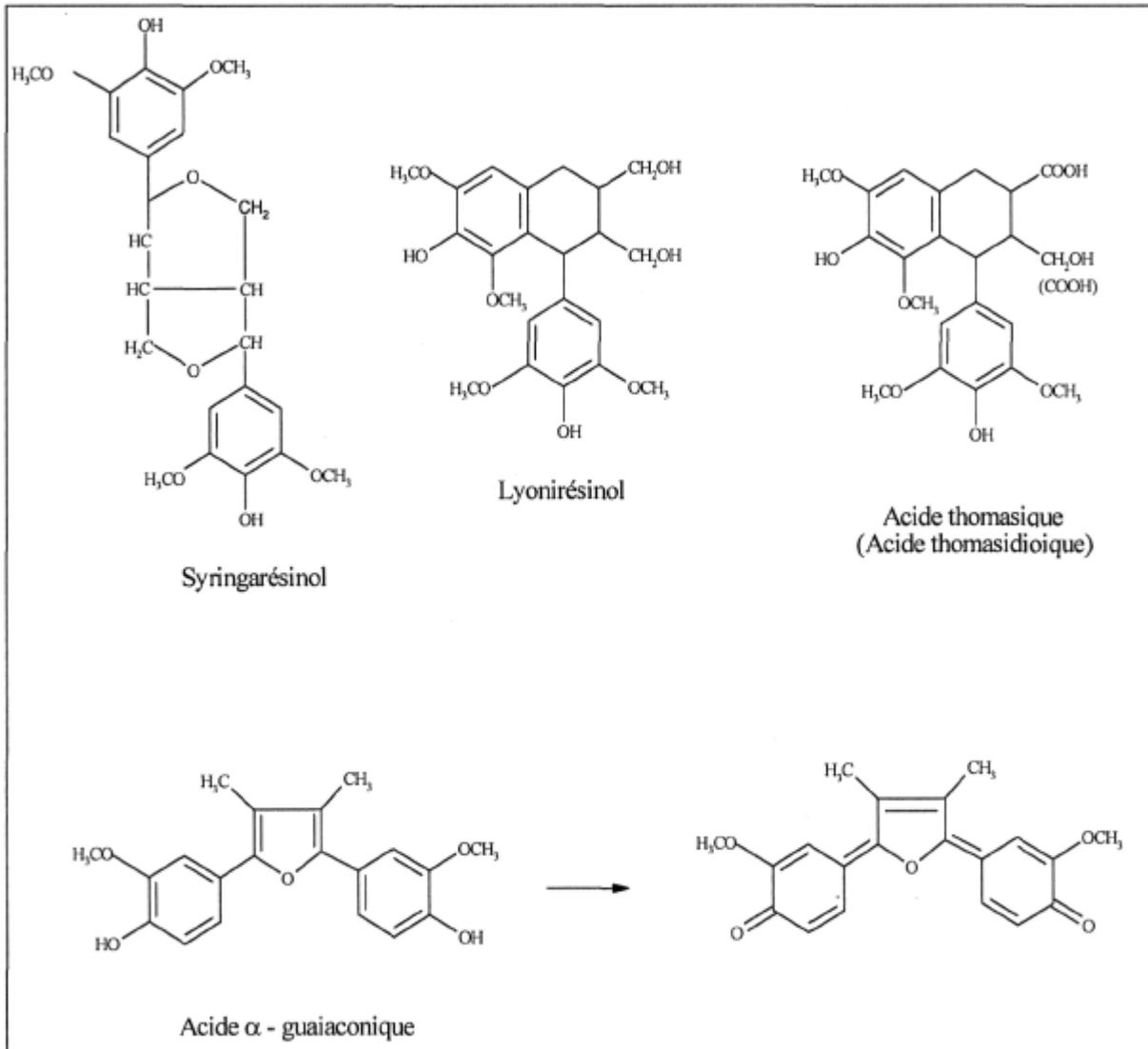


Figure 1.2. Lignanes d'essences feuillues.

Un autre groupe de constituants aromatiques est représenté par les stilbènes présents aussi bien chez les feuillus que chez les résineux. Les stilbènes sont produits par addition de 1 à 3 molécules de malonyl CoA sur les acides cinnamiques qui dérivent de la voie de biosynthèse des phénylpropanes. Ces composés seraient responsables du noircissement des bois lors de

leur exposition à la lumière et des difficultés rencontrées lors de la fabrication de la pâte à papier en milieu acide. On attribue aux stilbènes les rôles de fongicides et la protection contre les insectes (Stevanovic, 2005)

1.2.1. 2 Les flavonoïdes

L'évolution des plantes vasculaires est directement liée au développement de la capacité de lignification ou plus précisément à l'expansion du métabolisme phénylpropane (impliquant l'acide shikimique comme intermédiaire obligatoire). Les flavonoïdes partagent la même voie de biosynthèse que la lignine et sont représentés par des composés avec des squelettes C6-C3-C6, c'est-à-dire à la base de phénylpropane. En effet, ils représentent les polyphénols les plus distribués dans la nature et sont présents dans tout le règne végétal, à l'exception des algues et des champignons. Leur structure moléculaire est caractérisée par un squelette carboné de type diphenyl 1,3-propane qui comprend 15 atomes de carbone répartis en deux cycles benzéniques notés A et B reliés entre eux par la structure chromane à trois carbones (C).

Plusieurs sous-groupes existent selon leur degré d'insaturation et d'oxydation de l'hétérocycle : flavone, flavanone, flavane, isoflavones (Fengel et Wegener, 1984). Les flavonoïdes existent généralement dans la nature sous forme hydroxylée et combinés à diverses molécules, ce qui explique la grande variété de ces composés (Figure 1.3). La présence de glucides ou de groupements méthyle sur les hydroxyles phénoliques est très fréquente. Pour la plupart des flavonoïdes, la chaîne aliphatique propane est incluse dans un hétérocycle pyrane. Toutefois, il existe d'autres molécules pour lesquelles la chaîne propane, qui relie les deux cycles A et B, présente des squelettes différents à savoir : chalcones, aurones, isoflavones (figure 1.4).

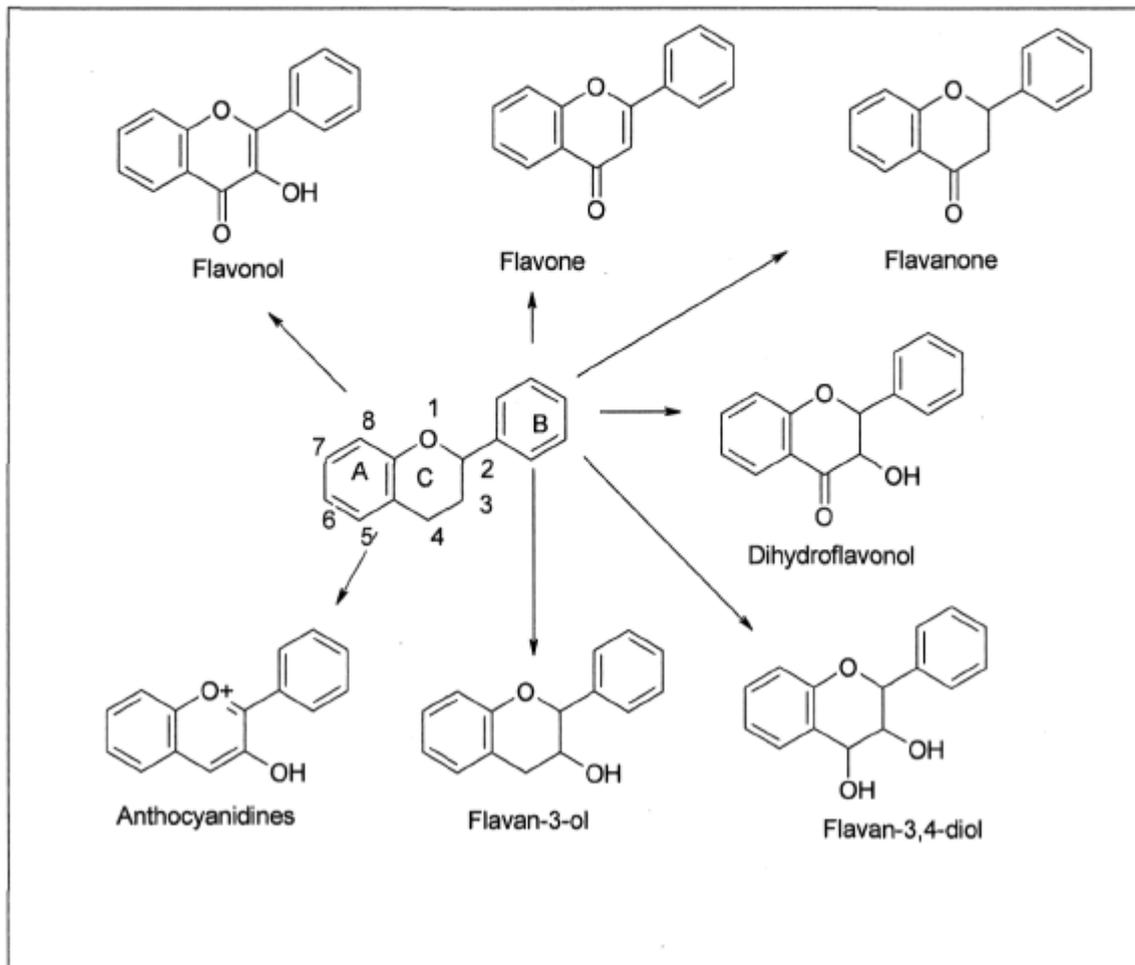


Figure 1.3 Familles des flavonoïdes.

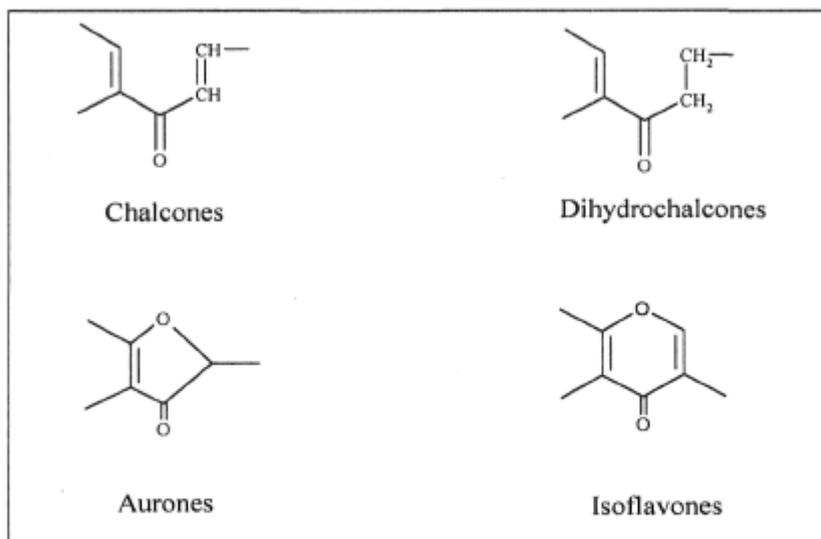


Figure 1.4 Structure d'autres types de flavonoïdes

Les glycosides (hétérosides) des flavonols, principalement ceux du kaempferol, de la quercétine et de la myricétine représentent les polyphénols prédominants dans les feuillages des plantes vasculaires (Figure 1.5) (Stevanovic, 2005).

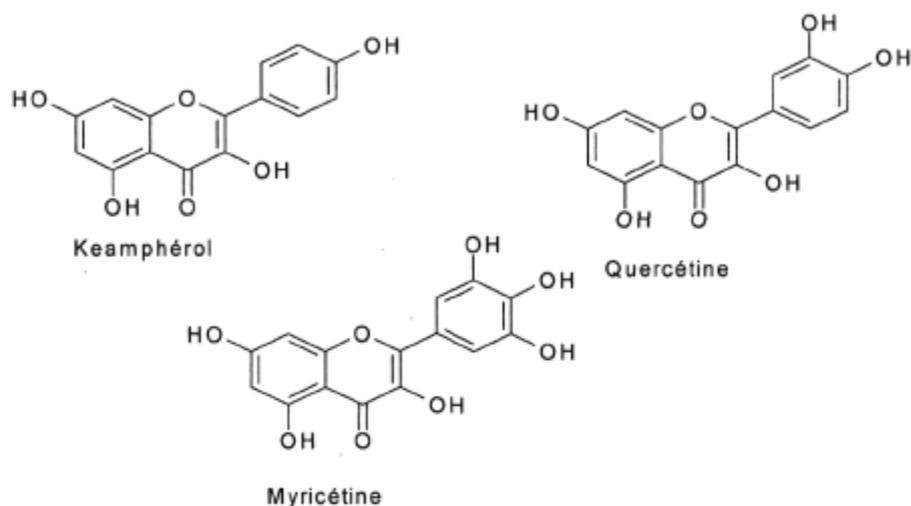


Figure 1.5 Flavonols prédominant dans les feuillages des plantes vasculaires

Les flavonoïdes jouent un rôle dans la pigmentation des plantes, la fixation du diazote atmosphérique par les plantes légumineuses, la défense chimique contre les prédateurs (phytoalexines) et la reproduction des plantes.

1.2.1. 3 Les tannins

Les tannins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau, dont les masses molaires se situent entre 500 et 3000. En plus de présenter les réactions caractéristiques des phénols en général, ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines (Stevanovic, 2005). Cette réactivité avec les protéines est à l'origine des propriétés tannantes qu'ils exercent sur le collagène de la peau au cours de la transformation de la peau en cuir, la rendant imputrescible et moins perméable à l'eau. Les tannins sont très répandus dans le monde végétal, leur teneur et leur nature varient d'une espèce à l'autre. On distingue, d'après leur structure et leurs propriétés, deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

a) *Les tannins hydrolysables*

On classe les tannins hydrolysables en deux catégories :

1. Les gallotannins qui libèrent de l'acide gallique et leurs dérivés galloylés (depsides)
2. Les ellagitannins qui libèrent par hydrolyse de l'acide gallique accompagné par les acides ellagique, hexahydroxydiphénique, valonique, etc.

En général, les tannins hydrolysables ont un poids moléculaire plus faible et précipitent les protéines beaucoup moins que les tannins condensés (Jarrige, 1995). Ils sont présents dans certaines dicotylédones des prairies naturelles, et surtout dans les jeunes feuilles d'arbres ou d'arbustes (*Quercus* méditerranées et tropicaux, acacias, etc.). Les tannins hydrolysables sont caractérisés par une partie centrale de polyol (dans la plupart des cas, β -D-glucose) dont les fonctions hydroxyles sont estérifiées avec l'acide gallique (Figure 1.6). Le 1,2,3,4,6-pentagalloyl glucopyranose occupe une place centrale dans la biosynthèse des tannins hydrolysables (Gross, 1992)

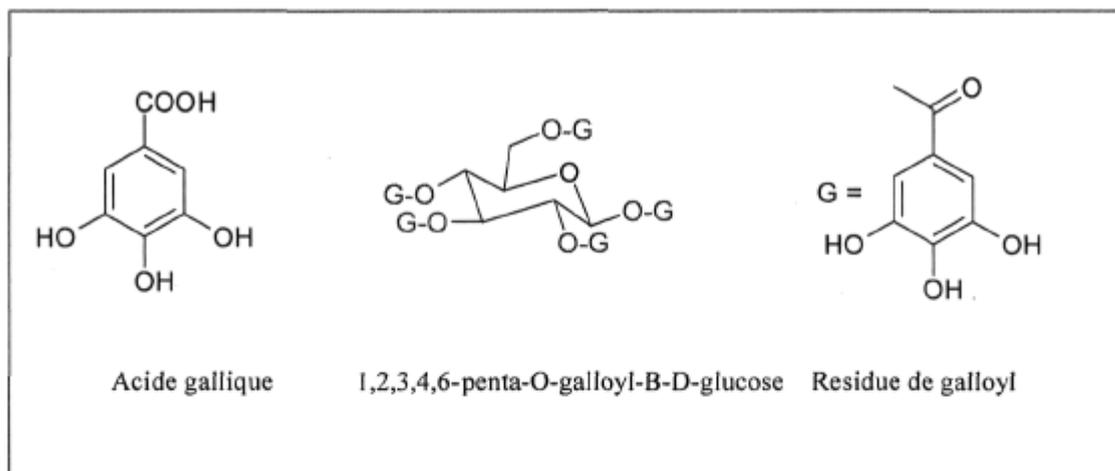


Figure 1.6 Structures fondamentales des tannins hydrolysables (*d'après Gross, 1992*).

b) *Les tanins condensés*

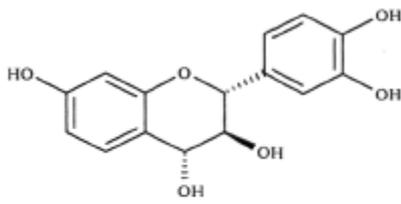
Les oligomères hétérogènes dont la structure est liée aux flavan-3-ols et flavan-3,4-diols, sont nommés les proanthocyanidines ou les tannins condensés. Ils ont plusieurs propriétés

communes avec les tannins hydrolysables, telles que la précipitation des protéines en solution aqueuse et l'astringence caractéristique au niveau de la langue. Habituellement, les tannins condensés sont présents dans les tissus épidermiques des plantes, dans les feuilles, l'écorce et le phloème, et en règle générale, ils sont absents du bois d'aubier et du cœur. Cependant, il y a plusieurs exceptions, comme c'est le cas des genres *Acacia* et *Schinopsis* dont le bois de cœur sert comme source commerciale de tanins condensés (Stevanovic, 2005).

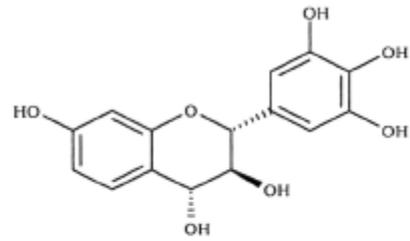
Les tannins condensés ont été nommés pendant longtemps les leucoanthocyanidines. Actuellement, ce nom est réservé aux flavan 3,4-diols. Les leucoanthocyanidines sont, en effet, les proanthocyanidines monomères, tandis que les vrais tannins condensés, qui possèdent une efficacité tannante et astringente optimale se retrouvent parmi les dimères, les trimères et les oligomères proanthocyanidines. Les flavan 3,4-diols et les flavan-3-ols, sont à la base des oligomères proanthocyanidines (Figure 1.7).

Les unités de monomères sont principalement liées par des liaisons C-C entre les carbones 4-6 ou 4-8. En règle générale, les monomères constitutifs des proanthocyanidines liés entre eux par des liaisons C-C 4-8, sont plus communes dans les plantes que celles liées par des liaisons C-C 4-6 (Porter, 1992). De plus, les unités monomères peuvent être liées en d'autres positions dans la chaîne polymérique. Les proanthocyanidines sont, donc, des polymères irréguliers (Porter, 1992). D'un point de vue structural les proanthocyanidines formés par des liaisons C-C 4-8 entre deux molécules de flavan-3-ols sont appelés dimères de type B. Par contre, les dimères de type A sont constitués des unités de 5-déoxyflavan-3-ol qui sont préférentiellement liés par des liaisons C-C 4-6. Ces dimères sont à la base des systèmes des tannins condensés de type résorcinol. Ils proviennent majoritairement de deux familles : *Leguminosae* et *Anacardiaceae*.

A) Flavan-3,4-diols

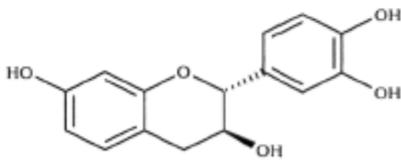


(+) - leucofisetidine

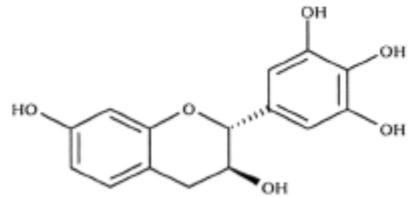


(+) - leucorobinetidine

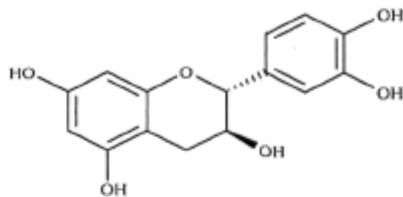
B) Flavan-3-ols



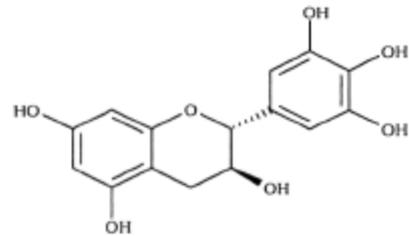
(-) - fisetinidole



(-) - robinétinidole



(+) - catéchine



(+) - gallocatéchine

Figure 1.7 Les molécules monomères des tanins condensés (d'après Diouf 2003)

En général, les tannins condensés de type B sont omniprésents dans les arbres. On les retrouve à la fois comme les tannins condensés purs (à base d'unités de catéchine et d'épicatéchine) et accompagnant des tannins de type résorcinol (Stevanovic, 2005).

1.3 Méthodes d'analyse de polyphénols

1.3.1 Extraction

L'isolement des composés phénoliques des plantes par extraction est généralement un processus très difficile compte tenu de la variété de composés qu'il est possible de trouver dans les échantillons naturels. L'obtention de rendements élevés est parfois compliquée et par conséquent des soins doivent être pris pendant la manipulation afin d'éviter les modifications chimiques qui peuvent survenir lors du processus d'extraction en raison de l'activité enzymatique élevée des échantillons naturels. En effet, l'oxydation et l'isomérisation durant l'extraction sont un souci constant (Antolovich et al., 2000).

C'est ainsi qu'afin de protéger les composés phénoliques contre les processus de détérioration pendant l'extraction, l'ajout d'antioxydants et le travail dans des conditions d'atmosphère inerte ont été des solutions proposées. La fidélité entre le profil phénolique du produit de départ et celui de l'extrait obtenu est un paramètre important qui doit être pris en considération. Par conséquent, les conditions utilisées devraient être douces afin d'éviter l'oxydation, la dégradation thermique et d'autres changements chimiques et biochimiques dans les échantillons naturels.

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction de polyphénols. La macération, connue comme une méthode traditionnelle, a été couramment employée (Spigno et De Faveri 2007 ; Budic-Letoc et al., 2005). Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. En plus,

elle se déroule à température ambiante ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules polyphénoliques qui sont sensibles aux changements de température.

L'extraction au Soxhlet, parfois combinée avec des techniques de percolation et d'immersion, a été communément employée afin d'obtenir un bon rendement d'extraction de polyphénols (Al-Bandak et Oreopoulou, 2007; Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003). Cette méthode est très appréciée car elle permet de faire des extractions en continu tout en restant simple et relativement peu coûteuse. Cependant, les manipulations séquentielles, les longs temps d'extraction et le travail à des températures d'ébullition peuvent constituer des inconvénients.

L'extraction assistée par ultrasons est une autre technique souvent employée qui utilise des solvants liquides (Proestos et Komaitis 2006). À l'intersection des deux principes de base, soit celui des ultrasons et celui des extractions, il est possible de considérer l'interaction des ondes ultrasoniques sur les performances d'extraction de composés organiques présents dans les plantes. Les ultrasons possèdent plusieurs avantages dont celui de briser les parois cellulaires des organismes végétaux ainsi que celui de provoquer des effets de capillarité dans la matière végétale (Lavoie, 2005).

L'extraction en utilisant des pH différents a été aussi utilisée dans le but d'extraire sélectivement des composés phénoliques avec des solubilités différentes. C'est ainsi que ce type d'extraction a été employé afin d'extraire des composés phénoliques du vin (Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003). Pour ce faire, l'alcool du vin a été premièrement évaporé à une température inférieure à 30 °C en vue de préserver l'intégrité des polyphénols contre les effets des températures élevées. Postérieurement, le pH des échantillons a été ajusté à pH 7. Après cette étape, une extraction avec le chloroforme (CHCl₃) a permis d'obtenir les composés lipophyliques présents dans l'extrait. Les composés phénoliques plus polaires ont été ultérieurement recueillis par ajustement à pH 6 de la phase aqueuse suivi d'une autre extraction avec CHCl₃. Rodríguez-Delgado (2001) et son équipe ont proposé une méthode

simple pour extraire les composés phénoliques du vin par acidification de celui-ci à pH 2 avec 0,1 M HCl. Dans une autre étape, les auteurs ont effectué une extraction avec le diéthyl éther afin de séparer adéquatement les divers types de polyphénols. Bien que ce type d'extraction ait été employé de manière reproductible pour séparer les acides phénoliques, la catéchine et les dihydrochalcones, les faibles rendements d'extraction des flavonoles ont limité son utilisation.

L'extraction en phase solide (EPS) constitue aussi une autre option rapide et économique puisqu'elle réduit de manière significative le volume des solvants requis. Elle est employée dans le but d'extraire les composés à partir d'une matrice liquide ou comme complément à l'extraction par solvants (Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003). L'EPS peut être également employée comme méthode de fractionnement/purification ou pour obtenir la préconcentration des composés. En effet, l'extraction en phase solide avec des cartouches C₁₈ a été régulièrement utilisée pour l'extraction sélective d'acides phénoliques et de flavonoïdes des vins rouges (Pinelo et al., 2006), jus d'orange (Mouly et al., 1999), jus de canneberge (Ferguson et al., 2004) et de pommes (Ohnishi-Kameyama et al., 1997). De plus, cette technique a aussi été utilisée dans le but d'identifier les composés benzéniques volatiles (en incluant les composés phénoliques) à partir de cinq différents types de bois employés dans la fabrication de barils pour l'entreposage de vins (Flamini et al., 2007).

L'extraction par fluide supercritique a pris, ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction de polyphénols à partir de sources naturelles. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. La basse viscosité des fluides supercritiques confère une capacité élevée pour la diffusion permettant l'accès du solvant aux composés phénoliques liés aux parois cellulaires. En outre, tous les processus de dégradation possibles, tels qu'oxydations ou isomérisations, sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit et que le

processus d'extraction peut être suivi en absence de lumière et d'air (Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003). Cette technique a été utilisée avec de l'éthanol afin d'extraire les polyphénols de raisins (Chafer et al., 2005) et d'oignons (Gorostiaga-Martino et Guyer, 2003). De plus, elle a aussi été employée pour obtenir un haut rendement de polyphénols à partir des sous-produits de l'industrie vinicole (Louli et al., 2004). Toutefois, cette technique d'extraction présente comme inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui est le solvant d'extraction le plus employé ce qui génère une haute sélectivité d'extraction ne permettant pas de solubiliser les composés phénoliques plus polaires. Dans plusieurs cas, afin d'obtenir de hauts rendements de polyphénols, il est nécessaire d'ajouter des solvants plus polaires ou effectuer des changements chimiques aux composés qui seront extraits afin de diminuer leur polarité (Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003).

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes d'extraction traditionnelles. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels qu'un gain de temps d'extraction, une utilisation de petites quantités de solvants et un rendement d'extraction de polyphénols élevé (Lavoie 2005 ; Csiktusna di Kiss et al., 2000; Hemwimon et al., 2007).

En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature des composés (par exemple, classes de molécules phénoliques spécifiques telles que des flavonoïdes, acides phénoliques, glycosides, etc.) de la nature de l'échantillon (graines, feuilles, ramilles) et de son état physique (Antolovich et al., 2000). Indépendamment de la technique choisie, l'optimisation des conditions d'extraction et le temps d'extraction peuvent changer selon la préparation de l'échantillon.

Il est possible de constater que les solvants jouent un rôle très important dans plusieurs méthodes d'extraction. En effet, les composés phénoliques solubles sont généralement extraits

en utilisant des solvants polaires tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol ou l'acétone. La présence de sucres, parfois liés aux polyphénols, les rendent plus solubles dans l'eau, tandis que les combinaisons des solvants avec de l'eau s'utilisent dans le but d'extraire les glycosides. Les aglycones moins polaires sont plus solubles dans les solvants apolaires (Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003).

Le mélange acétone/eau est communément employé comme solvant dans le but d'extraire des polyphénols (Goni et Serrano, 2005). En effet, Druzynska et al (2007) ont démontré que les rendements d'extraction de polyphénols du thé vert, en utilisant l'acétone à 80 %, a été plus important que celui obtenu avec d'autres solvants tels que l'éthanol 80 %, le méthanol 80 % et l'eau. Turkmen (2006) et son équipe ont également analysé l'efficacité de divers solvants par rapport aux rendements d'extraction de polyphénols du thé noir. L'acétone 80 % a aussi montré les meilleurs résultats tandis que l'eau a eu une efficacité plus faible que celle des solutions alcooliques. En effet, l'acétone et le méthanol semblent avoir des spécificités distinctes par rapport à l'extraction de substances polyphénoliques.

À l'heure actuelle, le méthanol est le solvant le plus employé. En fait, il a été utilisé afin d'obtenir des extraits riches en flavanones, flavones, flavone-glycosides, méthoxyflavones et flavones dimères (Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003). Le méthanol 70-80 % a aussi donné d'excellents rendements permettant l'extraction des flavones, flavonoles et catéchines à partir des fruits (Bocco et al., 1998) et des légumes (Escarpa et al., 2002). L'utilisation de mélanges du méthanol avec de l'eau (50:50) est parfois préférable afin de permettre une extraction appropriée de glycosides (Escribano-Bailón et Santos-Buelga, 2003). En effet, des études ont indiqué que le méthanol est le meilleur solvant pour l'extraction de catéchines, tandis qu'un meilleur rendement de procyanidins est obtenu avec 70 % d'acétone. Il a été également indiqué qu'un mélange méthanol/eau, dû à sa polarité, est capable d'extraire plus

efficacement des polyphénols liés aux matrices fibreuses polaires que l'acétone (Escribano-Bailón et Santos-Buelga 2003).

1.3.2 Hydrolyses

Markham (1982) a décrit l'utilisation de l'hydrolyse comme une procédure qui aide à l'élucidation structurale et à la caractérisation des glycosides polyphénoliques. L'hydrolyse a également été employée dans le but de réduire au minimum les interférences chromatographiques (Engelhardt et al., 1993) en contribuant à la simplification des chromatogrammes (Hertog et al., 1992). Une fois que l'hydrolyse est effectuée, elle permet une réduction du contenu de l'information et un éclaircissement des chromatogrammes. Par exemple, un extrait contenant plusieurs *O*-glucosides d'une aglycone produira après hydrolyse acide, seulement un pic correspondant à l'aglycone en question. En général, trois types de traitements hydrolytiques sont employés à cette fin, à savoir : l'hydrolyse acide, enzymatique et alcaline (Antolovich et al., 2000).

Dans la majorité des cas, la rapidité de rupture de la liaison glycosidique dépendra de la force des liaisons, de la nature du sucre et de la position d'union à l'aglycone (Antolovich et al., 2000). Par exemple, l'hydrolyse acide est connue, en raison qu'elle permet de séparer une grande quantité de sucres qui sont liés aux flavonoïdes (Markman 1989 ; Harbone, 1965). Cependant, les glucuronides peuvent résister à cette hydrolyse tandis que les glucosides sont libérés rapidement. Harbone (1965) a démontré que le facteur le plus important par rapport à l'efficacité de l'hydrolyse acide est la nature du sucre. De même, cet auteur a classé les différents types de monosaccharides en tenant compte de leur facilité de séparation de l'aglycone dans l'ordre suivant : L-rhamnose = L-arabinose > D-glucose \approx D-galactose > D-acide glucuronique. La résistance des *O*-glucuronides à l'hydrolyse a été expliquée par la conformation des glucuronides qui semble être différente de celle d'autres glycosides. L'auteur a aussi remarqué l'importance de la position de la liaison glycosidique dans la

rapidité de leur détachement de l'aglycone. En effet, il a démontré que les 3-glycosides sont hydrolysés plus rapidement que les 4'-glycosides qui, en même temps, sont hydrolysés plus rapidement que les 7-glycosides. Par contre, la nature des flavonoïdes a été considérée comme un facteur de faible importance.

En ce qui concerne l'hydrolyse alcaline, on peut remarquer qu'elle a été utilisée pour l'isolement de phénols de certains fruits, en particulier pour la caractérisation des acides phénoliques (Fallico et al., 1996 ; Germano et al., 2006). Les conditions alcalines sont également utilisées si on suspecte la présence de groupements acyle (Bloor, 2001).

Un des risques de l'hydrolyse alcaline est la dégradation de certaines flavones polyméthoxylées (Antolovich et al., 2000). De même, les flavanones et les 3-hydroxyflavanones sont sensibles aux conditions alcalines et peuvent former des chalcones, qui, éventuellement, se décomposent en donnant des phénols et des dérivés d'acides cinnamiques (Schmidlein et Herman 1976). Dans ces circonstances, l'hydrolyse est effectuée le plus souvent sous des conditions acides ou en employant des enzymes spécifiques pour des glycosides connus.

L'hydrolyse enzymatique, lorsqu'elle est utilisée dans des conditions optimales, peut mener à un plus grand degré de spécificité et de sélectivité que les hydrolyses acide et alcaline (Day et Morgan, 2003). Elle a été utilisée pour la séparation sélective des 3-*O* ou 7-*O*-glycosides de flavonoïdes (Bloor, 2001). Les enzymes les plus employées pour l'analyse des polyphénols des plantes ont été les β -glucosidases (Farag et al., 2007) et les β -glucuronidases (Germano et al., 2006).

1.3.1 Identification de polyphénols par chromatographie liquide à haute performance.

Même s'il existe d'autres techniques qui permettent de faire l'identification de polyphénols tels que la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie sur couche mince (Bloor,

2001), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inversée, combinée à la détection électronique ou à la spectroscopie ultraviolette et visible (UV-VIS) est, sans doute, la méthode la plus communément utilisée pour l'identification et la quantification des différents composés phénoliques (Mattila et Kumpulainen 2002; Merken et Beecher 2000).

La CLHP a été employée pour la première fois pour la détermination des flavonoïdes en 1976 par Fisher et Wheaton (Hasegawa et al., 1996). Plusieurs travaux ont été effectués sur l'identification de composés phénoliques en utilisant la CLHP combinée avec d'autres techniques de détection plus ou moins complexes (Daigle et Conkerton 1983 ; Daigle et Conkerton 1988 ; Robards et Antolovich 1997 ; Wen et al., 2005). En particulier la détermination de polyphénols en utilisant la CHLP couplée à un détecteur à barrette de diodes, a été très employée ; et c'est pour cette raison qu'elle sera l'objet de la présente section.

L'analyse par CLPH inclut la détermination des conditions opératoires qui seront employées pendant l'analyse, à savoir les types de colonnes à utiliser, les solvants, le temps d'analyse, etc. En général, les colonnes qui s'utilisent pour faire l'analyse de polyphénols sont presque exclusivement de phase inverse (RP) avec 100 à 300 millimètres de longueur et 4.6 mm de diamètre interne (Merken et Beecher 2000). Les systèmes d'élution sont habituellement binaires (solvant A et solvant B) : un solvant aqueux polaire acidifié tel que l'acide acétique aqueux, l'acide perchlorique, l'acide phosphorique ou l'acide formique (solvant A) et un autre solvant organique moins polaire tel que le méthanol ou l'acétonitrile qui peut être acidifié (solvant B). Habituellement, on utilise un gradient d'élution où l'éluant B augmente avec le temps. Des travaux ont prouvé que l'acide trifluoroacétique dans l'éluant B peut améliorer la résolution de la catéchine (Dalluge et al., 1998). Parfois, des systèmes isocratiques ou tertiaires, et même des systèmes quaternaires ont été décrits dans le but d'identifier les polyphénols (De Pascual et al., 1998 ; Tamura et al., 1994). En général les expériences

prennent 1 heure et un temps supplémentaire est nécessaire afin de rétablir l'équilibre du système. Le flux peut varier entre 0,5 -1,5 ml/min (Merken et Beecher 2000).

Un avantage particulier des phénols et particulièrement des flavonoïdes est celui d'avoir des spectres UV distinctifs où des différences structurales peuvent être observées, permettant ainsi le diagnostic rapide de leurs caractéristiques structurales (Bloor 2001). Généralement, les phénols absorbent dans la région UV pouvant ainsi être identifiés en utilisant un détecteur à barrette de diodes (DAD). C'est ainsi que, par exemple, les flavonoïdes présentent deux bandes d'absorption caractéristiques : la bande II provenant de l'anneau A avec un maximum entre 240-285 nm et la bande I provenant de l'anneau B avec un maximum entre 300-550 nm (Tableau 1.1) (Mabry et al., 1970 ; Robards et Antolovich 1997). D'ailleurs, les anthocyanidines montrent les bandes I et II avec des maximums entre 265-275 nm et 465-560 nm respectivement (Robards et Antolovich 1997). S'il n'y a qu'une petite conjugaison entre les anneaux A et B des flavanones et des isoflavones, leur spectre UV présentera une intense bande II, mais une petite bande I. Par ailleurs, le spectre UV des flavones et des flavonols est caractérisé par une bande II entre 240-280 nm et un autre pic caractéristique dans la bande I entre 300-380 nm (Marbry et al., 1970). C'est ainsi que les flavanones et leurs glycosides ont généralement été détectés à 280 nm (Krause et Galensa, 1991) et aussi à 290 nm (Bogdanov, 1989), tandis que les flavones, flavonols et leurs glycosides ont été détectés à 270 nm (Brolis et al., 1998), 365 nm (Crozier et al., 1997), 370 nm (Ewald et al., 1999) aussi bien qu'entre 280-350 nm (De Cooman et al., 1998). Les acides phénoliques sont généralement caractérisés par des maximums d'absorption entre 254-320 nm. Par exemple, l'acide vanillique et anisique peuvent être détectés à 254 nm, l'acide gallique et syringique à 275 nm, l'acide salicylique à 305 nm tandis que les acides chlorogénique, caféique, gentisique, sinapique, p-coumarique, férulique et rosmarinique sont caractérisés par une absorption maximale à 320 nm (Wen et al., 2005).

Tableau 1.1 Absorption UV des flavonoïdes (d'après Markham 1982)

Types de flavonoïdes	Bande II (nm)	Bande I (nm)
Flavones	250-280	310-350
Flavonols (3-OH substitués)	250-280	330-360
Flavonols (3-OH)	250-280	350-385
Isoflavones	245-275	310-330
Flavanones	230-270	300-330
Anthocyanidines	270-280	465-560

1.4 Polyphénols et bouleaux

Plusieurs travaux portant sur une multitude d'essences du genre *Betula* ont été publiés dans la littérature au cours des dernières années. Même s'il n'existe pas beaucoup de travaux concernant l'identification de composés polyphénoliques dans le bouleau jaune comme tel, il est nécessaire de cibler les études faites sur le même genre. Ceci est surtout important car il est connu que le genre *Betula* a un modèle polyphénolique caractéristique qui permet d'établir des relations taxinomiques entre les différentes espèces appartenant à ce genre. (Laitinen, 2003).

En général, les études réalisées sur l'identification et la quantification de composés phénoliques du genre *Betula* se dirigent vers trois directions principales. La première concerne les études chimio taxinomiques étant donné le fait que la variation qualitative et quantitative des polyphénols dans les bouleaux permet de faire des distinctions entre les essences (Lundgren et al., 1995 ; Keinanen et al., 1999 ; Lahtinen et al., 2006 ; Julkunen-Tiito et al., 1996). Ce dernier est particulièrement important, car les bouleaux, spécialement les jeunes arbres, sont taxinomiquement très complexes à identifier en utilisant seulement leurs

caractéristiques morphologiques (Jong, 1993). En plus, l'existence d'espèces hybrides donne encore plus de complexité à leur identification sur la seule base de leurs caractéristiques morphologiques (Julkunen-Tiito et al., 1996).

Les plus nombreuses études s'intéressant à l'identification des polyphénols chez les bouleaux portent sur les variations du contenu de composés phénoliques sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques tels que les niveaux élevés de CO₂, les changements de saisons, l'ozone, la lumière U.V-B, l'exposition aux microorganismes et mammifères, la température, etc. Généralement, ces études évaluent la réponse chimique des arbres sous des conditions de stress ou de changements environnementaux (Loponen et al., 2001 ; Laitinen et al., 2004 ; Graglia et al., 2001; Tegelberg et al., 2002 ; Kuokkanen, et al., 2001 ; Sunnerhein et al., 1988 ; Lavola 1998 ; Vainiotalo et al., 1991 ; Graglia et al., 1996 ; Baldwin et al., 1987 ; Palo 1984 ; Tahvanainen et al., 1991 ; Palo et al., 1985 ; Santamour et Vettel 1978). Les polyphénols sont considérés comme des molécules déterminantes pour la résistance des bouleaux aux herbivores, aux mammifères et aux microorganismes. En fait, ils sont considérés comme agents qui empêchent la biodisponibilité des nutriments (Rhoades, 1979). Sunnerheim et collaborateurs (1988) ont démontré que le platyphylloside, une molécule phénolique communément retrouvée dans les bouleaux, possède un effet déterminant sur la digestibilité des ruminants *in vitro*. Les auteurs ont aussi expliqué que les phénols de petits poids moléculaires sont souvent assez liposolubles pour pénétrer les cellules des animaux et interagir avec les macromolécules de leur système digestif.

Également, les polyphénols peuvent être considérés comme des protecteurs de l'ADN des plantes contre les dommages provoqués par la lumière U.V-B. En fait, ils semblent avoir beaucoup d'importance dans les mécanismes d'adaptation des plantes à l'exposition élevée à ce type de rayonnement. En outre, il a été démontré que la production de composés

polyphénoliques dans les tissus épidermiques des feuilles chez *Betula pendula* s'incrémentent après l'exposition des arbres à la lumière UV (Tegelberg et al., 2001).

Kuokkanen (2001) et son équipe ont étudié l'influence du CO₂ et de la température sur la production de métabolites secondaires dans les feuilles du *Betula pendula*. Leurs résultats ont montré que les concentrations élevées de CO₂ ont produit une augmentation de la concentration des tannins condensés et des flavonols au niveau des feuilles de cette essence. De plus, l'augmentation de la température a provoqué un accroissement de la concentration de flavones dans le feuillage de *B. pendula*.

De même, l'influence des changements saisonniers sur la production de polyphénols a été étudiée par Riipi et collaborateurs (2002) qui ont trouvé que les quantités de composés phénoliques par feuille à travers la saison de croissance ont augmenté chez *Betula pubescens*. Finalement, les auteurs ont expliqué que les polyphénols doivent être considérés comme des molécules multifonctionnelles qui peuvent être synthétisées suivant les besoins particuliers des plantes.

Le troisième type d'études portant sur l'identification des composés phénoliques dans le genre *Betula* a comme objectif l'élucidation structurale de composés polyphénoliques dans certaines essences en utilisant des méthodes d'identification chimique plus ou moins complexes (Hiltunen et al., 2004 ; Mammela, 2001 ; Hanawa et al., 1997 ; Smite et al., 1995 ; Pan et Lundgren 1994 ; Salminen et al., 2002 ; Keinänen et Julkunen-Tiito 1998 ; Shen et al., 1999, Hiltunen et al., 2006). En général, ces recherches contribuent à la découverte de nouveaux composés qui n'avaient pas encore été identifiés pour les essences étudiées. Par exemple, Hiltunen et collaborateurs (2006) ont trouvé trois nouveaux composés polyphénoliques dans le xylème de *Betula pendula* Roth (figure 1.8). En plus, leurs travaux leur ont servi à caractériser qualitativement et quantitativement les composés phénoliques modèles présents dans les essences étudiées.

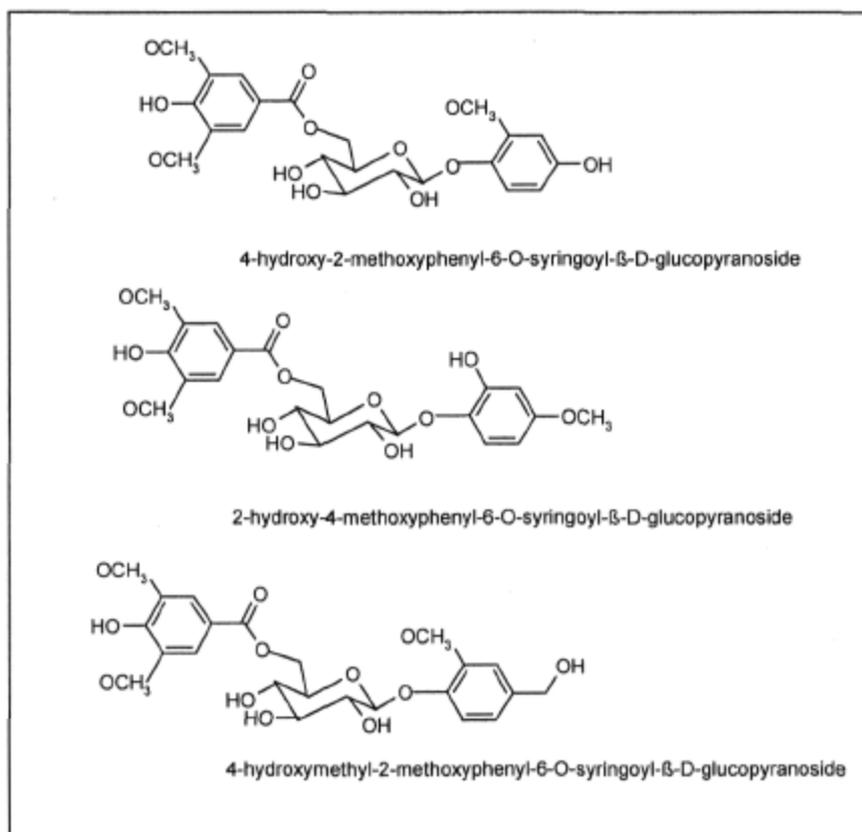


Figure 1.8 Structures chimiques de trois nouveaux composés phénoliques isolés du xylème de *Betula pendula* Roth (d'après Hiltunen et al., 2006)

Il est à noter que, indépendamment du but du travail, dans 35 études réalisées sur les polyphénols présents dans le genre *Betula*, 14 études (40 %) font référence aux feuilles (Graglia et al., 2001 ; Shen et al., 1999 ; Kuokkanen et al., 2001 ; Laitinen et al., 2000 ; Salminen et al., 2002 ; Keinänen et al., 1999 ; Keinanen et Julkunen-Tiitto 1998 ; Ossipov et al., 1996 ; Lahtinen et al., 2006 ; Lojonen et al., 2001 ; Dallenbach-Toelke et al., 1986 ; Riipi et al., 2002 ; De la Rosa et al., 2001 ; Nurmi et al., 1996). Le feuillage est la partie de l'arbre la plus facile à se procurer, ceci est probablement la raison pour laquelle le plus grand nombre d'études ont été effectuées sur ce tissu en particulier. L'essence la plus étudiée a été *Betula pendula* Roth (Kuokkanen et al., 2001 ; De la Rosa et al., 2001 ; Laitinen et al., 2000 ; Lahtinen et al., 2006 ; Salminen et al., 2002 ; Dallenbach-Toelke et al., 1986 ; Keinanen et

Julkunen-Tiitto 1998 ; Ossipov et al., 1996) suivie par *Betula pubescens* (Loponen et al., 2001 ; Riipi et al., 2002 ; Salminen et al., 2002 ; Keinänen et Julkunen-Tiitto 1998 ; Dallenbach-Toelke et al., 1986 ; Lahtinen et al., 2006 ; Ossipov et al., 1996 ; Nurmi et al., 1996).

En ce qui concerne l'analyse de polyphénols dans le feuillage du bouleau jaune, il existe très peu d'informations. En effet, on n'a trouvé que deux travaux sur cette essence. La première étude est celle de Baldwin et collaborateurs (1987) où deux espèces de la forêt boréale ont été analysées, à savoir *Acer saccharum* et *Betula alleghaniensis*. L'étude démontre que la teneur en polyphénols du bouleau jaune varie de façon imprévisible pendant la période verte de l'arbre pour des valeurs comprises entre 6,8 et 33,1 mg/g en termes d'équivalent en tannins de chêne rouge. Cependant, cette étude ne fait pas mention de la caractérisation des constituants polyphénoliques par des méthodes d'analyse chimique. La seconde étude, portant sur la caractérisation chimique du feuillage de 10 essences du genre *Betula*, a été faite par Keinänen et son équipe en 1999 et fut effectuée dans le but de connaître les implications taxinomiques de la variation de composés phénoliques dans plusieurs espèces de bouleaux (*Betula* spp.). Dans ce travail les auteurs ont comparé le modèle phénolique des essences en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Les essences choisies ont été : *B. papyrifera*, *B. pendula*, *B. platyphyla*, *B. resinifera*, *B. schmidtii*, *B. pubescens*, *B. alleghaniensis*, *B. grossa*, *B. ermanii* et *B. maximowicziana*. Les composés phénoliques qui ont été trouvés dans le feuillage du bouleau jaune, ainsi que leurs quantités sont rapportés dans le tableau 1.2. Notamment, des similarités entre le profil de composés polyphénoliques de *Betula alleghaniensis* et *Betula grossa* ont été observées.

Tableau 1.2 Constituants phénoliques retrouvés dans le feuillage de *Betula alleghaniensis* Britton (d'après Keinanen et al., 1999)

Composés phénoliques	Teneur (mg/g) de feuillage sec
(+)-catéchine	4,8
acide 3-caffeoylquinique	0,56
acide 3-coumaroylquinique	2,3
Quercetine-3-arabinopyranoside	0,27
Kaempferol-3-rhamnoside	0,33
Kaempferol-O-glycoside	0,72
Kaempferol-O-glycoside	0,51
Kaempferol-O-glycoside	6,0
Kaempferol-O-glycoside	7,9
Kaempferol-O-glycoside	0,89
Kaempferol-O-glycoside	0,53
Apigenin dérivés 1	0,23

Quant à l'identification des composés phénoliques dans les ramilles ou les tiges des bouleaux, 6 travaux ont été réalisés, ce qui représente 17 % par rapport au total d'études analysées. De nouveau, *Betula pendula* a été l'essence la plus analysée (Julkunen-Tiito et al., 1996 ; Vainiotalo 1991 ; Kuokkanen et al., 2001 ; Sunnerheim et al., 1998 ; Palo et al., 1985 ; Taipale et al., 1994). Le bouleau jaune a été seulement étudié dans le travail de Julkunen-Tiito et son équipe (1996) lequel portait sur la détermination de métabolites secondaires dans plusieurs essences appartenant au genre *Betula*. Dans l'étude en question, les espèces étudiées

provenaient de différentes régions géographiques, à savoir la Scandinavie (*B. pubescens*, *B. pendula*, *B. nana*), l'Eurasie (*B. ermanii*, *B. platyphylla*, *B. maximowicziana*, *B. schidtii*, *B. grossa*) et l'Amérique du Nord (*B. papyrifera*, *B. resinifera ssp. humilis* et *B. alleghaniensis*). Ces essences ont été étudiées dans le but de caractériser leurs composés phénoliques et terpéniques, et de les employer comme indicateurs chimio-taxinomiques. Les résultats de ce travail ont démontré que le contenu de métabolites secondaires était inférieur dans les jeunes arbres, particulièrement celui des tannins condensés. Le salidroside a été présent, en petites quantités, dans toutes les espèces sauf dans *B. maximowicziana*. Sa teneur particulièrement élevée dans les jeunes plantes de *B. alleghaniensis* et de *B. grossa* accompagnés du salicylate de méthyle (Jong, 1993) a indiqué le lien chimique très étroit entre ces essences. Le tableau 1.3 montre le profil de composés phénoliques retrouvés chez le bouleau jaune. Il est à noter que, même si les auteurs ont recherché d'autres composés phénoliques, tels que le déhydrosalidroside, (-)-rhododendrine, (+)-épirhododendrine et platyphylloside, ils n'ont pas été retrouvés dans les tiges de cette essence.

Tableau 1.3 Composés phénoliques retrouvés dans les jeunes tiges de *Betula alleghaniensis* (d'après Julkunen-Tiitto et al., 1996)

Composés phénoliques	Teneur (mg/g) de ramilles sèche
(+)-catéchine	1.08
Salidroside	3.09
Catéchine isomère	0,04
Tanins condensés	20.0

La figure 1.9 montre la structure chimique des composés phénoliques plus communément identifiés chez les tiges des essences appartenant au genre *Betula*.

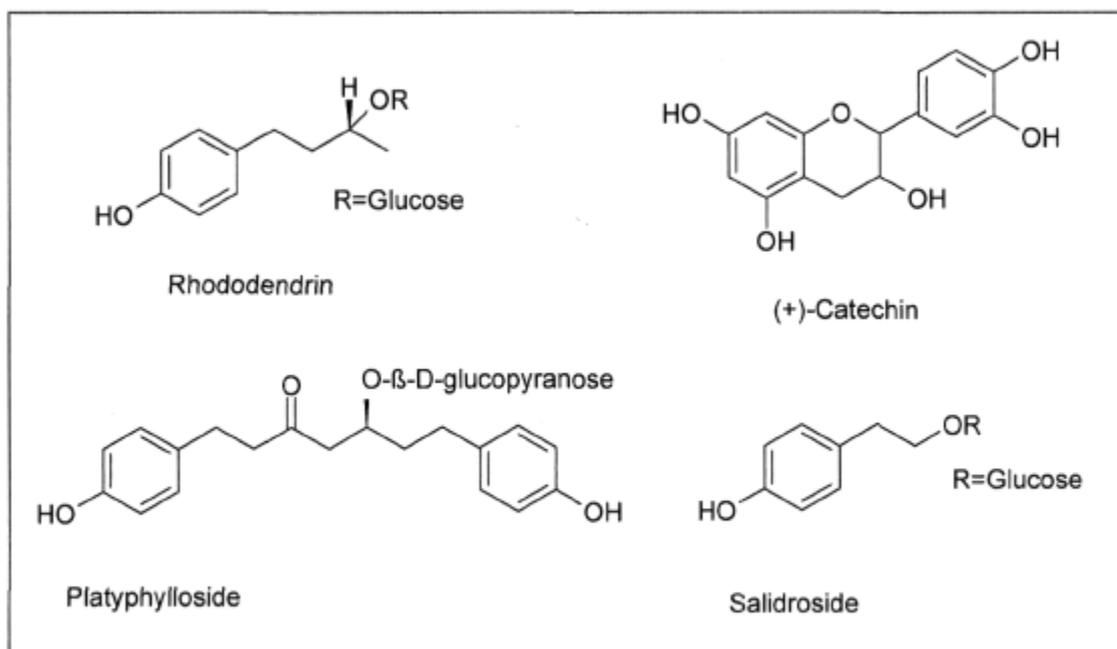


Figure 1.9 Composés phénoliques fréquemment retrouvés dans les tiges des essences du genre *Betula*.

Concernant les études qui ont utilisé des écorces pour l'identification de polyphénols, il en existe une dizaine à notre connaissance, ce qui constitue 29 % des travaux examinés. La majorité de ces études portent aussi sur *Betula pendula* (Smite et al., 1993 ; Smite et al., 1995; Tegelberg et al., 2001 ; Laitinen et al., 2004 ; Tahvanainen et al., 1991; Lundgren et al., 1995; Santamour et Vettel 1978 ; Santamour et Lundgren 1997). Toutefois, *Betula pubescens* (Pan et Lundgren 1994; Lundgren et al., 1995; Santamour et Vettel 1978 ; Santamour et Lundgren 1997) et *Betula ermanii* (Fuchino et al., 1995; Santamour et Vettel 1978 ; Santamour et Lundgren 1997) ont été aussi largement examinées.

Quant à l'identification de polyphénols dans l'écorce de *Betula alleghaniensis*, on a seulement trouvé deux études qui font référence à cette essence parmi d'autres appartenant au même genre (Santamour et Vettel 1978 ; Santamour et Lundgren 1997). Le premier est celui de Santamour et Vettel (1978) qui ont examiné la présence de rhododendrin, un glucoside du rhododendrol, dans quelques essences de bouleaux qui étaient susceptibles à l'attaque

d'*Agrilus anxius* Gory, un coléoptère dont les larves pénètrent la zone cambiale de plusieurs bouleaux. Les auteurs ont confirmé la présence de Rhododendrol (figure 1.10) dans les extraits hydrolysés de l'écorce de *Betula alleghaniensis*. Dans un travail subséquent, Santamour et Lundgren (1997) ont quantifié la teneur de rhododendrin dans l'écorce interne de *Betula taxa* en utilisant la CLHP. D'après leurs résultats, le bouleau jaune contenait un 0,01 % de rhododendrine par rapport à la masse sèche d'écorce.

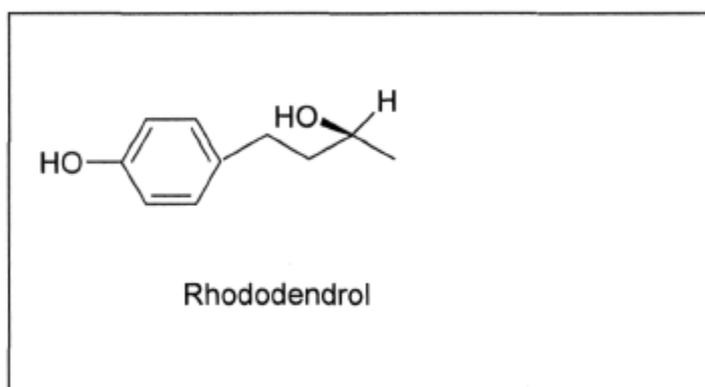


Figure 1.10 Structure chimique du rhododendrol, un composé retrouvé dans l'écorce de plusieurs essences appartenant au genre *Betula* (d'après Santamour et Vettel, 1978).

Quant aux études utilisant le xylème pour l'identification de composés phénoliques dans le genre *Betula*, 5 travaux ont été réalisés à notre connaissance ; ce qui représente 14 % du total d'études trouvées à ce sujet. Ce faible pourcentage nous laisse croire que le bois ne semble pas avoir suscité autant d'intérêt que le feuillage ou l'écorce. En effet, le bois est un matériau multifonctionnel et parfois, en raison de son importance pour l'industrie, devient plus difficile à se procurer et à utiliser.

Encore une fois, le bois de *Betula pendula* a été le plus étudié (Hiltunen et al., 2006; Mämmela 2001; Hiltunen et al., 2004). Également, on a trouvé une autre étude portant sur le xylème de *B. maximowicziana* (Hanawa et al., 1997).

L'identification de trois molécules phénoliques dans les extraits lipophiles du bois du tronc et des sciures de *Betula alleghaniensis* a été décrite par Lavoie et Stevanovic (2006). En effet,

dans ce travail, les auteurs ont analysé la composition des extraits en fonction de l'âge et du vieillissement en utilisant comme solvant le dichlorométhane. Leurs résultats ont démontré une forte présence de composés de nature triterpéniques dans les extraits analysés, ce qui peut être dû à la nature du solvant employé pendant l'extraction. Les composés phénoliques identifiés sont présentés au Tableau 1.4.

Tableau 1.4 Concentration de molécules phénoliques retrouvées dans le bois du tronc et les sciures du bouleau jaune (*d'après Lavoie et Stevanovic 2006*)

Composé phénolique	Masse moléculaire	Indice de similarité	Bois du tronc	Sciure
			Concentration moyenne (µg/g)	Concentration moyenne (µg/g)
Syringaldehyde	182.17	0,92	4,1	2,3
Salidroside	300.30	0,81	51	84,3
Acide chlorogénique	354.31	0,91	18,9	11

Il est possible de retenir dans la majorité des études réalisées, que le solvant le plus efficace pour l'extraction de composés phénoliques des tissus végétaux des bouleaux est le méthanol 100 % ou mélangé avec de l'eau (Mammela, 2001 ; Baldwin et al., 1987 ; Hiltunen et al., 2006 ; Graglia et al., 2001 ; Tegelberg, Aphalo, Julkunen-Tiito, 2002 ; Kuokkanen et al., 2001). Bien que les mélanges acétone/eau aient été moins utilisés, ils ont été aussi employés afin d'identifier les composés phénoliques dans plusieurs essences de bouleaux. (Tahvanainen et al., 1991 ; Vainiotalo et al., 1991 ; Sunnerhein et al., 1988; Loponen et al., 2001). L'éthanol a été aussi employé dans plusieurs études (Shen et al., 1999; Keinänen et Julkunen-Tiitto 1998 ; Keinänen et al., 1999).

Quant aux méthodes d'extraction, la macération a été presque universellement employée dans les études mentionnées. En effet, sa rapidité, son faible coût, sa facilité et sa pertinence

semblent être des critères qui ont amené les chercheurs à l'employer si couramment. Toutefois, l'extraction assistée par ultrasons, bien que beaucoup moins utilisée, a aussi été employée dans certaines des études examinées (Sunnerheim et al., 1998; Palo et al., 1985; Lavoie et Stevanovic 2006; Mämmela 2001).

Il est à noter que la méthode la plus utilisée afin de séparer les composés phénoliques dans les extraits de presque toutes les essences a été la chromatographie liquide à haute performance. Cette technique a été combinée avec des techniques de détection comme la spectrométrie d'absorption de l'ultraviolet et du visible (Lundgren et al., 1995 ; Taipale et al., 1994 ; Kuokkanen et al., 2001; Keinänen et al., 1999 ; De la Rosa et al., 2001), la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (Shen et al., 1999; Ossipov et al., 1996; Smite et al., 1993 ; Fuchino et al., 1995) et la spectrométrie de masse (Mämmela 2005 ; Vainiotalo et al., 1991 ; Salminen et al., 2002). D'autres méthodes séparatives qui ont été aussi employées en combinaison avec la CLHP ont été la chromatographie en phase gazeuse (Lavoie et Stevanovic 2006 ; Hiltunen et al., 2006; Julkunen-Tiito et al., 1996) et la chromatographie en couche mince (Palo et al., 1995 ; Ossipov et al., 1996; Shen et al., 1999)

Ainsi d'après la revue de littérature sur l'identification et la quantification de polyphénols du bouleau jaune, on peut conclure que cette essence mérite encore d'être étudiée en profondeur, au vu des quelques travaux réalisés à ce jour.

1.5 Les polyphénols comme des molécules bioactives

1.5.1 Polyphénols et maladies cardio-vasculaires

Un certain nombre d'études effectuées sur des animaux ont démontré que la consommation de polyphénols limiterait le développement de lésions athéromateuses (Scalbert et al., 2005). C'est ainsi que les ajouts de vin sans alcool, de la catéchine ou de la quercétine à l'eau potable ont réduit la taille de ces lésions chez les souris (Hayek et al., 1997 ; Miura et al., 2001). Ces

effets sont associés à une réduction de la prise de lipoprotéines de faible densité (LFD) par les macrophages ; une oxydation plus faible de ces protéines et une diminution de leur aptitude à l'agrégation. Des résultats semblables ont été obtenus chez les lapins en utilisant des régimes enrichis avec du cholestérol dans un extrait de graines de raisin riche en proanthocyanidines (Yamakoshi et al., 1999). En effet, plusieurs études ont prouvé que les polyphénols peuvent empêcher l'oxydation de LFD *in vitro*. Ce type d'oxydation est considéré comme le mécanisme principal de l'athérosclérose (Scalbert et al., 2005)

Les polyphénols peuvent exercer aussi des effets antithrombotiques. Ils sont capables d'empêcher l'agrégation de plaquettes *in vitro* (Sagesaka-Mitane et al., 1990 ; Russo et al., 2001). Ils ont également montré leur capacité à empêcher l'agrégation de plaquettes dans plusieurs modèles animaux. Ainsi, la consommation de vin rouge plutôt que de vin blanc ou d'alcool chez le rat a empêché l'effet du rebond des plaquettes (Ruf et al., 1995). En plus, la consommation de vin rouge ou de vin rouge sans alcool a réduit le temps de saignement et l'agrégation plaquettaire induits par le collagène chez le rat (Wollny et al., 1999). La thrombose induite par la sténose de l'artère coronaire chez le chien a été aussi inhibée lors de l'administration par intubation gastrique de vin rouge ou de jus de raisin (Demrow et al., 1995).

De même, les polyphénols peuvent améliorer le dysfonctionnement endothélial qui est considéré comme une étape primaire dans l'athérogénèse. Le dysfonctionnement endothélial est associé à plusieurs facteurs de risque de l'athérosclérose et il est considéré comme un indice qui permet de faire des pronostiques pour les maladies coronariennes du cœur (Celermajer et al., 1992).

1.5.2 Propriétés anti-inflammatoires et effets sur le système immunitaire.

De nombreux travaux démontrent que les polyphénols possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Da Silva et al., 1994 ; Galati et al., 1994 ; Read 1995) et qu'ils sont capables

de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton et Elliott, 1996). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Mookerjee et al., 1986 ; Namgoong et al., 1994). Cet effet sur les lymphocytes B ou T peut être variable. En effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) (Figure 1.4) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B mais l'explication reste encore inconnue.

L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine kinase C ou protéine tyrosine kinase) (Mookerjee et al., 1986; Namgoong et al., 1994). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (Middleton et Drzewiecki, 1984).

La phagocytose qui accompagne une infection virale ou bactérienne est suivie d'une production d'espèces oxygénées réactives (ROS) par les neutrophiles qui va promouvoir l'inflammation. D'une manière générale, les espèces radicalaires, quelles que soient leurs origines, peuvent induire des dommages tissulaires, favoriser le processus de vieillissement, voire être à l'origine de certaines pathologies telles que le cancer et l'athérosclérose (Ward 1994). Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables d'inhiber et/ou de réduire cette production de ROS par les neutrophiles (Limasset et al., 1993).

1.5.3 Propriétés anti-cancérogènes

Les effets anti-carcinogènes des polyphénols chez les animaux ont été bien documentés. En effet, lorsqu'ils sont administrés aux rats ou aux souris, avant ou après l'administration d'un agent cancérogène ou l'implantation d'une lignée de cellules cancérogènes humaines, les polyphénols peuvent protéger ou réduire le nombre de tumeurs et/ou leur croissance (Yang et al., 2001). La quercétine, par exemple, est capable de diminuer, chez le rat, l'incidence des

tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenz(a)anthracène) ou la NMU (nitrosom éthylurée) (Verma et al., 1988). Les études réalisées chez la souris abondent dans le même sens et mettent en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs de tumeurs (Kato et al., 1983).

L'action antitumorale de la quercétine pourrait aussi s'expliquer par son interaction avec le complexe calcium-calmoduline (Nishino et al., 1984) qui jouerait un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux promoteurs de tumeurs.

D'autres polyphénols, tels que la catéchine, les isoflavones, les lignanes, les flavanones, l'acide ellagique et le resvératrol ont aussi montré leurs effets protecteurs dans quelques modèles. Plusieurs mécanismes ont été suggérés afin d'expliquer ces effets anti-cancérigènes. D'abord, les polyphénols peuvent agir comme des agents de blocage dans l'étape de déclenchement du processus cancérigène. Ils influencent le métabolisme des pro-cancérigènes en inhibant les enzymes intervenant dans l'activation des pro-cancérigènes en intermédiaires mutagènes et cancérigènes (Scalbert et al., 2005). En plus, ils peuvent faciliter leur excrétion en augmentant l'expression des enzymes de conjugaison de la phase II (Suschelet et al., 1997). La prise des polyphénols pourrait alors activer ces enzymes dans le but de leur propre désintoxication et, de cette façon, induire la stimulation générale de nos défenses contre le xénobiotiques (Talalay et al., 1988). Les polyphénols peuvent également limiter la formation des cellules initiales en stimulant la réparation de l'ADN (Webster et al., 1996 ; Imanishi et al., 1991)

1.5.4. Propriétés antioxydantes

Le rôle des radicaux libres et des ROS dans la genèse de nombreuses maladies a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux (Halliwell et Cross, 1994). C'est ainsi que plusieurs maladies telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies dégénératives, sont associées à l'oxydation et au processus de vieillissement. Le dommage oxydatif des

cellules, de l'ADN, des protéines et des lipides augmente avec l'âge, et contribue considérablement à la dégénération des cellules somatiques et à la pathogénie de ces maladies (Scalbert et al., 2005).

Les radicaux libres sont des espèces chimiques présentant un ou plusieurs électrons libres (le radical hydroxyle $\text{OH}\cdot$, l'anion superoxyde O_2^- , l'oxyde nitrique $\text{NO}\cdot$). Ils sont produits naturellement par l'organisme (Hadi, 2004) :

- au niveau de la respiration mitochondriale, lorsque l'oxygène échappe à la réduction complète en H_2O ;
- au niveau de certains organites cellulaires tels que les peroxysomes ;
- par diverses oxydases cellulaires ;
- au cours de la phagocytose.

De plus la pollution, la cigarette et de nombreux agents chimiques peuvent être à l'origine d'une production accrue de radicaux libres. Frenkel et Chrzan (1987) ont démontré qu'ils existent des promoteurs de tumeurs qui peuvent induire la formation de peroxyde d'hydrogène par des leucocytes humains et ainsi provoquer des coupures de l'ADN.

L'organisme possède ses propres mécanismes de défense permettant de lutter contre les radicaux libres ou les ROS. Il s'agit principalement d'enzymes cytosoliques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase, glutathion transférase). L'action protectrice de ces enzymes est complétée par celle de différents réducteurs présents dans les structures lipoprotéiques (α -tocophérol, caroténoïdes, lycopène, ubiquinol) et dans le cytosol (acide ascorbique, glutathion réduit) (Hadi, 2004).

Dans les conditions physiologiques normales, du fait de l'efficacité des systèmes de défense, ces radicaux libres n'auront pas d'effets néfastes majeurs. Toutefois, si des quantités importantes de radicaux sont générées, dépassant les possibilités de protection enzymatique et épuisant le pool de divers capteurs, ils pourront engendrer :

- des peroxydations lipidiques favorisant l'athérosclérose et le vieillissement,
- des modifications oxydatives des protéines les rendant inactives,
- des dommages oxydatifs de l'ADN et de l'ARN aboutissant à des mutations et au développement du cancer (Hadi, 2004).

L'intérêt vers les antioxydants naturels fait l'objet d'un grand nombre de travaux. Parmi ces antioxydants, de nombreux auteurs ont mis en évidence le rôle prépondérant des polyphénols (Scarbert et al., 2005 ; Subirade et al., 1995). Les groupements hydroxyles des polyphénols peuvent accepter un électron pour former des radicaux phénoxyles relativement stables, rompant ainsi les réactions d'oxydation en chaîne dans les cellules (Kehrer et Smith 1994). On distingue les antioxydants préventifs, qui décomposent les peroxydes (amorces de chaîne) sans formation de radicaux libres, et les antioxydants par rupture de chaîne appelés aussi capteurs de radicaux libres, qui éliminent les porteurs de chaîne d'oxydation et dont une grande partie sont des composés phénoliques. Ces derniers réagissent avec les radicaux libres et se transforment en radicaux à durée de vie très longue et peu réactifs : la réaction de propagation est inhibée voire bloquée (Diouf 2003).

Le fait que les polyphénols soient de puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique est un élément important pour la protection des membranes cellulaires. En plus ils peuvent compléter les systèmes enzymatiques de défense cellulaire (Galvez et al., 1995). Effectivement, les acides gras ont tendance à s'oxyder au contact de l'air atmosphérique. C'est la double liaison qui est le lieu d'attaque de l'oxygène. L'oxygène se fixe soit en α de la double liaison, si la température est inférieure à 60°C (formation d'hydroperoxyde) soit directement sur la double liaison si la température est comprise entre 60°C et 130°C (formation d'épiperoxyde). Par exemple, le linoléate de méthyle (LH) est une molécule très sensible à l'oxygène moléculaire étant donné la présence de deux atomes d'hydrogène en α de deux liaisons doubles (Figure 1.11).

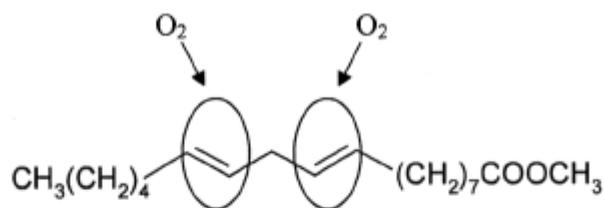


Figure 1.11. Le linoléate de méthyle : une molécule très sensible à l'attaque de l'oxygène.

La réaction peut être amorcée par la lumière, la chaleur ou des traces de métaux (Cu, Fe). La réaction est d'abord très lente, puis il y a formation de peroxydes pendant que la réaction s'accélère de façon exponentielle ; l'oxydation des acides gras (LH) au contact de l'air est une réaction en chaîne dont le mécanisme est décrit ci-dessous (Diouf 2003) :

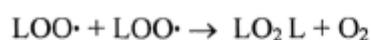
Amorçage :



Propagation :



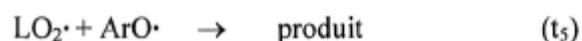
Terminaison :



En effet, le rôle protecteur des polyphénols vis-à-vis de la peroxydation lipidique a fait l'objet de nombreuses études *in vitro*. Dans plusieurs cas, leur efficacité antioxydante a été comparée à celles de substances de référence, telles que l' α -tocophérol, le Trolox (analogue hydrosoluble de l' α -tocophérol), l'acide gallique ou la catéchine. Un très grand nombre de ces molécules phénoliques semblent plus efficaces que le Trolox. C'est ainsi que les flavonoïdes préviennent efficacement la peroxydation lipidique puisqu'ils peuvent réagir avec la plupart

des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement CH₂ situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (Hadi, 2004).

Habituellement, les polyphénols agissent en rompant la chaîne d'oxydation en remplaçant un radical porteur de chaîne par un radical plus stable et qui ne participe pas à cette chaîne. Ainsi, on peut interpréter les propriétés antioxydantes d'un donneur d'hydrogène (comme le sont de nombreux phénols), noté ArOH, en ajoutant au mécanisme d'oxydation les processus suivants:



Les dérivés phénoliques possèdent au moins un atome d'hydrogène mobile. Ils réagissent facilement sur les radicaux LO₂· présents dans le milieu réactionnel pour former les radicaux ArO· (4) plus stables en empêchant ainsi la propagation de la chaîne d'oxydation. Ainsi, le phénomène d'inhibition par ces molécules consiste à remplacer les radicaux LO₂· et L· très réactifs et à l'origine de la réaction en chaîne d'oxydation par les radicaux phénoliques ArO· stables qui ne réagiront donc plus que dans des processus de terminaison (Diouf 2003).

D'après la littérature, la présence de polyphénols en quantités importantes dans l'alimentation diminue de 68% les risques cardiovasculaires par rapport à une alimentation qui en est faiblement pourvue (Hertog et al., 1993). Une augmentation de la capacité antioxydante du plasma chez les hommes a été observé suivant la prise de boissons riches en polyphénols telles que le thé (Leenen et al., 2000), le vin (Fuhrman et al., 1995 ; Serafini et al., 2000) et la

bière (Ghiselli et al., 2000) ainsi que des fruits et des légumes riches en polyphénols (Cao et al., 1998).

Parmi les composés les plus antioxydants, on peut citer l'épigallocatechine gallate, la catéchine, la quercétine, la lutéoline, la myricétine et l'apigénine mais aussi des acides phénoliques tels que les acides caféique et chlorogénique. La théorie du « paradoxe français », à savoir qu'une grande partie de la population ingère autant de corps gras que les Américains tout en présentant un moindre risque cardiovasculaire, a été reliée à une consommation plus abondante de produits végétaux et en particulier à celle de vin, riche en flavonoïdes (Commenges et al., 2000). Cependant, bien que les influences positives de l'ingestion de polyphénols sur l'augmentation de la capacité antioxydante du plasma soient bien établies, leur effet sur les constituants cellulaires *in vivo* fait encore l'objet de nombreuses recherches.

1.6. Méthodes pour mesurer la capacité antioxydante des polyphénols.

À l'heure actuelle, la capacité antioxydante des produits naturels contenant des polyphénols constitue un sujet de recherche très étudié. L'intérêt pour les antioxydants naturels a commencé depuis les années 1990 où on a largement identifié l'influence de plusieurs produits alimentaires et boissons comprenant des fruits, des légumes, du thé, du vin rouge, du café et du cacao sur la santé humaine qui s'avère être étroitement associée à la capacité antioxydante de polyphénols contenus. De nos jours, l'activité antioxydante des produits naturels est considérée comme un paramètre distinctif déterminant leur valeur sur le marché (Roginski et Lissi 2005). Ce dernier a stimulé le développement de méthodes efficaces et fiables afin de déterminer la capacité antioxydante de ces produits.

La détermination de la capacité antioxydante des produits naturels peut s'orienter dans deux directions. La première direction consiste à évaluer *in vitro* les propriétés intrinsèques des produits, c'est-à-dire l'étude du potentiel antioxydant, qui est déterminée par la quantité relative de composés antioxydants contenus dans les extraits et les propriétés antioxydantes de

chacun des constituants. La seconde direction consiste à déterminer, *in vivo* et/ou *ex vivo*, les propriétés antioxydantes sur des cellules, des enzymes ou l'organisme humain, en tenant compte de leur biodisponibilité. Le premier peut être étudié en utilisant des méthodes à l'aide d'outils physico-chimiques tandis que le second met en jeu des systèmes biologiques (Roginski et Lissi 2005). Étant donné le vaste domaine du sujet, nous allons uniquement nous intéresser à la mesure de l'activité antioxydante des extractibles des végétaux par des méthodes physico-chimiques. Les méthodes biologiques ne seront pas traitées dans le cadre de ce mémoire car elles ont déjà fait l'objet de plusieurs travaux de recherches (Mukhtar et Ahmad 2000 ; Yang et Landau 2000)

Il existe une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydante et il est très difficile de les classer. Plusieurs méthodes s'intéressent à l'analyse des étapes distinctes du processus d'oxydation en suivant le comportement de certains marqueurs. Dans d'autres, il n'existe pas de distinction claire entre les diverses étapes du processus d'oxydation. En général, les systèmes utilisés pour mesurer la capacité antioxydante sont constitués d'un substrat, d'un oxydant et d'un amorceur. L'ajustement de certains paramètres tels que l'augmentation de la température, l'augmentation de la pression partielle en oxygène, l'addition de métaux de transition ou l'utilisation d'amorceur pour induire plus rapidement la formation de radicaux libres, l'exposition à la lumière, et l'emploi d'une agitation mécanique afin d'augmenter le contact entre les composants du système ont été utilisés dans le but d'étudier le comportement des antioxydants sur le processus d'oxydation dans des temps raisonnables. Bien que l'utilisation des amorceurs est presque universelle, il existe des méthodes qui les omettent afin de suivre l'effet des antioxydants sur des produits endogènes naturellement formés. D'habitude les méthodes pour mesurer la capacité antioxydante comportent des mesures de la rapidité ou de l'extension de : (a) l'affaiblissement du substrat ou substance de preuve et/ou la consommation de l'oxygène au

cours de l'oxydation ; (b) la formation de produits d'oxydation ; (c) la capacité à piéger les radicaux libres générés en différentes phases. Dans les cas (a) et (b), la capacité antioxydante, indépendamment du mécanisme utilisé est démontré à partir de l'effet inhibiteur des antioxydants sur la rapidité de consommation des réactifs ou la formation de produits d'oxydation. La troisième méthode (c) suppose que l'oxydation est empêchée en grande partie par la capture des radicaux libres spécialement générés en phase aqueuse ou lipophile. Cette dernière comporte la génération des radicaux libres et la mesure de leur inhibition en ajoutant des antioxydants (Antolovich et al., 2002).

Bien qu'il existe une grande variété de classifications et des méthodes chimiques pour déterminer la capacité antioxydante des extraits naturels et qu'il n'existe pas un consensus entre les auteurs, presque tous confirment l'importance d'utiliser diverses méthodes afin de déterminer l'activité antioxydante des polyphénols naturels. Étant donné que la majorité des antioxydants naturels sont multifonctionnels, un protocole d'évaluation de l'activité antioxydante fiable exige la mesure de plus d'une propriété. Chaque évaluation doit être effectuée dans de diverses conditions d'oxydation, en utilisant plusieurs méthodes afin de mesurer différents produits d'oxydation (Frankel et Meyer 2000). Ce dernier est très important, car il est connu que la capacité antioxydante *in vitro* peut être partiellement influencée par la composition chimique du système employé. Il se peut que l'efficacité antioxydante soit déterminée par l'hétérogénéité et la nature hétérophasique du système employé, par le type de substrat utilisé, par les types d'amorceurs aussi bien que par les métaux de transition et par la façon d'accélérer l'oxydation. Pour cette raison, une complète évaluation inclurait l'utilisation de plusieurs méthodes dans des conditions différentes (Frankel et Meyer 2000).

Le tableau 1.5 montre les tests les plus employés pour mesurer l'activité antioxydante de composés phénoliques aussi bien que les entités chimiques examinées et les unités de base

utilisées pour les mesures antioxydantes. Une explication plus détaillée sera fournie à partir du point 1.6.1.

Tableau 1.5 Méthodes les plus employées pour mesurer l'activité antioxydante de composés phénoliques.

Tests	Mesures	Capacité antioxydante exprimée en :
Capacité antioxydante en équivalent Trolox. TEAC/ABTS ⁺	Absorbance du radical cation dans un milieu aqueux à 734 nm	Équivalent Trolox produisant le même effet que l'échantillon sur la réduction d'ABTS ⁺
1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	Absorbance du radical libre à 516 nm	Concentration capable de réduire de 50 % le DPPH à l'équilibre. Constante de vitesse de la réaction (Méthode cinétique).
Indice de peroxyde (PV)	Peroxydes et hydroperoxydes	mequiv. kg ⁻¹ des produits formés Temps auquel le PV atteint une valeur de 20 mequiv.kg ⁻¹
Diènes conjugués	Diènes conjugués produits. Absorbance à 234-235 nm	Augmentation de l'absorbance par rapport aux unités de masse en un temps fixé.
Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBA-RS)	Dialdéhyde malonique formé. Absorbance à 532-535 nm.	mg. kg ⁻¹ exprimés en dialdéhyde malonique.
Formation d'hexanal, et d'autres produits secondaires d'oxydation	Produits finaux formés comme résultat de l'oxydation	mg/ kg de produits formés
Rancimat	Changement de la conductivité électrique au cours de l'oxydation.	Temps d'induction
Méthode active de l'oxygène	Formation de peroxydes et d'hydroperoxydes au cours de l'oxydation	Temps requis pour atteindre une concentration en peroxyde de 100 meq par kg d'échantillon

Calorimétrie DSC/TGA	Temps ou température requis pour le développement de l'autooxydation	Temps d'induction (min, h), température d'induction ou Variation de masse (%)
FRAP	Capacité réductrice des antioxydants. Absorbance à 593 nm.	Absorbance échantillon par rapport à l'absorbance de la référence (Fe II)

1.6.1 Méthodes utilisant des radicaux libres

La capacité des polyphénols à céder un électron à un radical libre a été couramment utilisée pour mesurer leur activité antioxydante en utilisant la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Cette méthode a été décrite pour la première fois par Miller and Rice-Evans (1993) puis améliorée en 1999. En fait, elle consiste en la réduction du radical-cation coloré 2,2'-azobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide) plus connu sous le nom de ABTS⁺. On suit le développement de sa concentration à 734 nm au cours de sa réaction avec les antioxydants. La capacité antioxydante est mesurée comme la concentration (mM) de Trolox (un analogue soluble de la vitamine E) produisant le même effet que l'échantillon d'essai sur la réduction d'ABTS⁺ (Miquel-Becker et al., 2004).

La capacité antioxydante des polyphénols peut être aussi mesurée en utilisant des radicaux libres plus stables. Le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette (figure 1.12). Celui-ci a été très utilisé pour mesurer l'activité antioxydante des polyphénols. Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des polyphénols d'agir comme piègeur des radicaux libres (free radical scavengers).

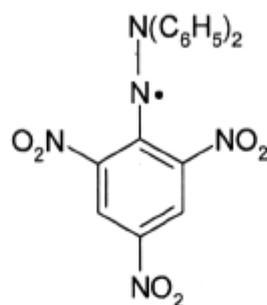
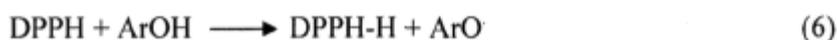


Figure 1.12 Radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

Les polyphénols agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale (6). L'avancement de la réaction est suivi par spectrophotométrie à 516 nm.



Plus un composé a la facilité de céder son atome d'hydrogène, plus celui-ci est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage du DPPH restant est proportionnel à la concentration de l'antioxydant. La concentration du composé phénolique nécessaire pour atteindre une disparition de 50 % du DPPH à l'équilibre est connue comme la C_{50} . Sanchez-Moreno (1998) et collaborateurs ont proposé un autre paramètre pour mesurer l'efficacité antiradicalaire (EA) où le T_{C50} est le temps nécessaire pour arriver à l'état d'équilibre en utilisant la C_{50} .

$$\text{EA} = (1/C_{50}) T_{C50} \quad (7)$$

La méthode du DPPH a été utilisée par de nombreux auteurs, du fait de sa rapidité et de sa reproductibilité. Par exemple, l'activité de la (+)-catéchine, du gallate éthylique, de l'acide ascorbique et du tocophérol en utilisant la méthode DPPH ont été étudiés par ^{13}C NMR (Sawai et Moon 2000). La catéchine agissait avec le DPPH en formant une structure *o*-quinone dans le noyau B. En général, les composés phénoliques sont capables de montrer une forte activité antioxydante avec le DPPH (Silva et al., 2000 ; Amarowicz et al., 2000). L'activité antioxydante des jus de grenade a été évaluée par la méthode du DPPH et en

utilisant aussi l'essai TEAC/ABTS. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour le thé et le vin rouge (Gil et al., 2000). Les auteurs ont démontré que les tannins hydrolysables ont été les principaux responsables de la haute efficacité observée.

Rosseau-Richard (1990) et collaborateurs ont employé une méthode cinétique pour quantifier l'activité antioxydante des composés dérivés de l'ellipticine, un agent anticancérigène très puissant, en utilisant le DPPH. Ils ont considéré que la mesure de la constante de vitesse de second ordre de la réaction entre le DPPH et les antioxydants peut constituer une estimation de la mobilité de l'atome H· à partir de certains dérivés de l'ellipticine contenant un groupement OH en position 9. Cette constante de vitesse est évaluée par modélisation d'une réaction d'ordre 2. Ohashi (1999) et son équipe ont aussi employé une méthode cinétique pour évaluer l'activité antioxydante des six dérivés méthyliques de la quercétine. Les auteurs, travaillant en excès de phénol avec des concentrations vingt fois supérieures à celle du DPPH, ont mesuré la constante de vitesse de pseudopremier ordre de la réaction, réaction qui a été suivie par spectroscopie à 516 nm.

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une autre technique qui peut spécifiquement détecter les radicaux libres impliqués dans l'autoxydation et les processus reliés, et permet d'étudier l'effet des antioxydants phénoliques sur ces radicaux (Antolovich et al., 2002). Elle est intrinsèquement sensible aux radicaux libres stables tels que le DPPH, le nitrosodisulphonate de potassium et le 2,6-di-*tert*-butyl- α -(3,5-di-*tert*-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-*p*-tolyl-*oxy* (Miquel-Becker et al., 2004). Cependant, la RPE ne permet pas de détecter des radicaux de courte vie mis en cause dans les processus d'oxydation. D'autres techniques ont été utilisées afin d'améliorer la détection de ces radicaux ; par exemple la radiolyse pulsée, la photolyse UV et le spin-trapping. La RPE est une technique relativement nouvelle pour l'étude des antioxydants et de l'oxydation lipidique. Malgré ses limitations actuelles, elle est considérée comme très prometteuse par le fait qu'elle

permet la mesure directe des concentrations de radicaux libres formés durant le processus d'oxydation.

1.6.2 Méthodes mettant en jeu la formation de produits au cours de l'oxydation.

Une des méthodes qui permet de mesurer un des produits primaires d'oxydation est celle de l'indice de peroxyde (PV, peroxide value). Les hydroperoxides sont des produits primaires formés lors de l'oxydation lipidique en jouant un rôle essentiel dans l'autoxydation des lipides. L'inhibition de leur formation et/ou l'action des antioxydants peut être employée comme indicateur afin d'évaluer l'activité antioxydante (Antolovich et al., 2002). Il s'agit d'une analyse volumétrique de l'iode libérée à partir de l'iodure de potassium par l'oxydation avec des peroxydes à température ambiante et dans un milieu chloroforme/acide acétique. Bandoniène et collaborateurs (2000) ont étudié l'activité antioxydante des extraits de sauge, de l'herbe douce et de la camomille dans l'huile de graine de colza à 40 °C en déterminant l'indice de peroxyde, aussi bien que le temps d'induction (temps auquel le PV a atteint une valeur de 20 mequiv.kg⁻¹) et le facteur de protection (rapport du temps d'induction de l'échantillon avec les extraits au temps d'induction de l'échantillon sans les extraits). Les résultats ont démontré que les extraits de sauge et de l'herbe douce ont eu la plus importante activité antioxydante due principalement à une quantité plus élevée de composés phénoliques. Une deuxième méthode aussi très employée qui utilise des produits intermédiaires d'oxydation est celle qui détermine les diènes conjugués. Au début de l'oxydation, les lipides subissent l'abstraction d'un atome d'hydrogène, et le produit formé est habituellement stabilisé par un réarrangement moléculaire en générant un diène conjugué. La quantification des diènes conjugués se réalise en calculant l'augmentation de l'absorbance à 234-235 nm par rapport à la masse de l'échantillon dans un temps fixe (Frankel et al., 1996). La mesure de la formation de diènes conjugués présente l'avantage de permettre l'évaluation dans une étape

initiale du processus d'oxydation. Cependant, la méthode des diènes conjugués par spectroscopie UV est considérée comme une mesure générique, fournissant peu d'information concernant la nature des composés impliqués. La sélectivité de cette technique peut être améliorée par la séparation des différents diènes conjugués en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (Halliwell et Gutteridge 1999).

La méthode qui emploie des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (Thiobarbituric acid reactive substances TBA-RS) est aussi communément utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des polyphénols. Le test TBA mesure la quantité de dialdéhyde malonique (MDA) qui se forme comme produit d'un endoperoxyde des acides gras insaturés au cours de l'oxydation lipidique (Antolovich 2002). Le MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique pour donner des pigments de coloration rouge. La quantité de pigments peut être mesurée par spectroscopie à 532-535 nm. Plusieurs substrats ont été utilisés afin de déterminer les TBA-RS, par exemple, certains types de tissus, l'acide linoléique, les lipoprotéines de basse densité (LDL) et d'autres acides gras (Miyake et al., 1997 ; Saccini et al., 1992). L'oxydation est inhibée par l'action des antioxydants et par conséquent, on pourra observer une diminution de l'absorbance. L'activité antioxydante est déterminée par le pourcentage d'inhibition de la formation de MDA.

La décomposition des produits primaires de l'oxydation lipidique produit des mélanges complexes comprenant des époxydes, des cétones, des hydrocarbures et des aldéhydes saturés et insaturés tels que l'hexanal (Halliwell et Gutteridge 1999). C'est ainsi que plusieurs mesures de ces produits finaux d'oxydation ont été utilisées dans le but d'évaluer la capacité antioxydante des polyphénols. Par exemple, l'indice d'anisidine (anisidine value) a été couramment employé pour mesurer la formation de 2-alcène-als au cours de l'oxydation des huiles (Antolovich 2002). Les composés comportant, dans leur structure, des groupements carbonyles en incluant le pentanal, le deca-2,4-diène et l'octa-3,5-diène-2-one semblent être les

principaux responsables du mauvais goût associé à la rancidité dans plusieurs produits alimentaires (Heydanek et MacGorin 1981 ; Corbo et al., 2000). L'hexanal est le produit final le plus abondant, et par conséquent le plus employé comme marqueur de la propagation du processus d'oxydation lipidique (Zwart et al., 1997 ; Koelsch et al., 1991). Frankel (1985) a fourni une étude détaillée des mécanismes impliqués dans l'autoxydation lipidique et du spectre des produits obtenus dans ce processus. Cette étude a été très utile afin de comprendre le rapport entre les caractéristiques structurales des acides gras, les hydroperoxydes intermédiaires et les métabolites secondaires volatiles qui se produisent au cours de l'oxydation. L'activité antioxydante peut être calculée comme le pourcentage d'inhibition d'un ou plusieurs des produits secondaires d'oxydation par rapport à un échantillon utilisé comme référence (Frankel et al., 1995 ; Hassan et Swet-Fan 2005).

1.6.3. Méthodes d'oxydation accélérée

Les essais réalisés afin d'évaluer la résistance des lipides à l'oxydation mettant en jeu des procédés accélérant la détérioration d'un substrat par l'action de la lumière UV ou de températures élevées sont connus comme méthodes d'oxydation accélérée (Antolovich 2002). Ces essais ont été employés pour l'évaluation des antioxydants phénoliques et leurs résultats sont habituellement exprimés en termes de temps d'induction. Dans certains cas, ils peuvent être un reflet des conditions auxquelles les huiles et les graisses sont soumises lors de leur production, de la fabrication des aliments ou de l'utilisation domestique.

Pour évaluer la résistance des huiles à l'oxydation, on utilise souvent la méthode Rancimat, laquelle utilise un système, à des températures élevées, où les produits volatils de l'oxydation sont détectés par conductimétrie (Diouf 2003). Barrera-Arellano et Estevez (1989) ont utilisé cette méthode afin de mesurer l'activité antioxydante de protecteurs naturels d'une huile de soja. En effet, au cours d'une oxydation accélérée à haute température, le changement soudain

de la conductivité de l'huile après quelques heures indique la fin de l'autoprotection de cette huile. En présence d'antioxydant, l'huile a montré plus de résistance par rapport à l'oxydation en absence d'additifs, et l'efficacité antioxydante est déterminée par l'augmentation du temps d'induction. Tura (2007) et collaborateurs utilisèrent cette méthode Rancimat pour évaluer l'influence des polyphénols, des tocophérols, des caroténoïdes, de la chlorophylle et du degré d'insaturation des acides gras sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive. Les quantités de polyphénols dans l'huile et le rapport entre les quantités d'acides gras saturés et insaturés ont été les facteurs les plus importants déterminant la stabilité oxydative de cette huile. La méthode de Rancimat et le test DPPH ont été utilisés afin de déterminer l'activité antioxydante des acides hydroxycinnamiques (Chen et Ho 1997). Les résultats de l'étude ont démontré les différences concernant l'activité antioxydante de différents composés en fonction de l'huile utilisée dans la méthode de Rancimat et des conditions employées dans les deux tests.

La méthode AOM (Active Oxygen Method) permet de faire une prédiction de la stabilité des lipides contre l'oxydation. Cette méthode fait passer de l'air à travers des échantillons en utilisant des conditions spécifiques de débit à 98 °C afin d'accélérer le processus d'oxydation (Velasco et Dobarganes 2002). En suivant certains intervalles, les peroxydes et les hydroperoxydes formés sont déterminés par le titrage avec de l'iode. La valeur AOM est définie comme le nombre d'heures nécessaires pour atteindre une concentration en peroxyde de 100 meq par kg d'échantillon. Plus l'échantillon est stable, plus long sera le temps requis. La méthode a comme inconvénient sa lenteur puisqu'une huile stable peut exiger 48 heures ou plus avant d'atteindre la concentration en peroxyde requise. Malgré la diminution de son emploi, elle s'utilise encore pour déterminer la stabilité des huiles à l'autooxydation. Nergiz et Unal (1991) ont utilisé cette méthode afin d'évaluer l'efficacité de l'extraction de polyphénols en tenant compte de la stabilité à l'oxydation de l'huile d'olive. Les auteurs ont

démontré que la présence des phénols est un facteur très important dans la stabilité de l'huile ; l'huile ayant la plus grande quantité de phénols est celle qui est la plus stable vis-à-vis de l'oxydation.

La méthode du four de Schaal (Schaal oven test) est une autre procédure qui détermine la stabilité des huiles dans des conditions accélérées. Ce test est la plus simple des méthodes accélérées et consiste à chauffer un échantillon dans un récipient fermé à 63 °C. L'échantillon est donc, périodiquement surveillé jusqu'au moment d'avoir une apparence de rancidité, et l'indice de peroxyde peut être déterminé (Velasco et Dobarganes 2002). Parfois, cette méthode requiert de longs intervalles de temps ; elle pourra être substituée par des méthodes plus sophistiquées qui utilisent une surveillance continue des changements de masse et d'enthalpie tels que l'analyse thermogravimétrique (TGA) et la calorimétrie différentielle (DSC). En effet, les méthodes d'analyse thermique ont été employées dans le but de caractériser l'activité antioxydante à des températures élevées. Kowalski (1991) a utilisé la calorimétrie différentielle pour évaluer la stabilité des huiles végétales en chauffant les échantillons jusqu'à 360 °C. Litwinienko (1997) et son équipe ont aussi examiné la cinétique d'oxydation thermique de l'acide linoléique dans des conditions non isothermiques en utilisant la DSC (50-300 °C). Les auteurs ont constaté la facilité de la méthode qui est relativement simple et rapide permettant d'examiner l'efficacité des antioxydants phénoliques. Cette technique a également été employée afin de mesurer l'efficacité de divers antioxydants commerciaux et de phénols dans le squalène (Breese et al., 2000).

L'analyse thermogravimétrique (TGA), malgré le fait d'être une méthode bien connue permettant d'étudier l'absorption de l'oxygène dans l'industrie des polymères, a suscité une attention limitée pour évaluer la stabilité oxydante. Dans un travail initial, Nieschlag et al (1974) ont estimé la stabilité oxydative d'échantillons d'huiles de crambe par TGA. Les changements de masse sous un environnement d'oxygène, avec une vitesse de chauffe

déterminée, ont été continuellement surveillés. L'évaluation de la résistance de l'huile à l'oxydation a été obtenue en mesurant le pourcentage de gain de poids dû au processus d'oxydation. Gennaro et al (1998) ont employé la TGA afin d'estimer l'effet des antioxydants sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. L'analyse thermogravimétrique a montré une reproductibilité élevée, s'avérant ainsi être une technique fiable pour évaluer la stabilité à l'oxydation des huiles et des graisses avec ou sans antioxydants. Rudnik et collaborateurs (2001) ont étudié la stabilité oxydative de l'huile de lin par des essais classiques (détermination de l'indice de peroxyde et la méthode Rancimat) et par des méthodes d'analyse thermique. Les résultats obtenus par TGA et DSC ont été en accord avec ceux obtenus par ces méthodes dites classiques. Par conséquent, ils ont conclu que les méthodes d'analyse thermique peuvent être employées pour prédire la stabilité oxydative d'huiles végétales et des acides gras, aussi bien que pour évaluer l'efficacité antioxydante des additifs synthétiques ou des extraits naturels.

1.6.4 Autres méthodes

Une autre méthode très employée afin de mesurer la capacité antioxydante est la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) qui est basée sur les capacités réductrices des antioxydants évalués. À l'origine, cette méthode consiste à ramener l'ion ferrique à l'ion ferreux in vitro. À pH 3,6 et à 37 °C, les antioxydants réduisent stoechiométriquement le complexe Fe (III)/tripyridyltriazine, en excès, en un complexe bleu de Fe (II), avec une augmentation de l'absorbance à 593 nm. La capacité antioxydante est considérée comme étant la capacité réductrice des antioxydants vis-à-vis du Fe (III). La valeur FRAP est déterminée en rapportant l'absorbance de l'échantillon à l'absorbance de la référence (celle du Fe (II)) durant une réaction de 4 min (Diouf 2003).

Les protéines hautement fluorescentes β -phycoérythrine et R-phycoérythrine ont aussi été utilisées afin de mesurer l'activité antioxydante des polyphénols. Les radicaux peroxyde

généérés par décomposition thermique de l'amorceur 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochlorure (AAPH), à 37°C provoquent la perte de fluorescence de ces protéines. L'addition d'un antioxydant réagissant rapidement avec les radicaux peroxydes empêche la perte d'intensité de la fluorescence des protéines proportionnelle à l'activité antioxydante (Antolovich et al., 2002). Cette méthode intègre deux mesures selon la technique de la courbe d'affaiblissement de fluorescence : la première est le degré auquel un échantillon empêche l'action d'un oxydant, donné par la pente de la courbe pendant l'inhibition, et la seconde est la durée de l'inhibition. Cette méthode est connue sous le nom de méthode de la capacité d'absorbance de radicaux oxygénés (oxygen radical absorbance capacity, ORAC). Wang et collaborateurs (1996) ont étudié l'activité antioxydante de 12 fruits et 5 jus de fruits par cette méthode. La fraise et le jus de raisin ont eu la plus grande activité ORAC qui est attribuée à la présence de quantités importantes de vitamine C, de vitamine E, de β -carotène, de flavonoïdes et de phénols de petit poids moléculaire.

1.7 Antioxydants et bouleaux

Quant au genre *Betula*, il est possible de constater que même s'il existe des études qui ont déterminé l'activité antioxydante de quelques essences européennes, on observe le manque de travaux concernant les espèces américaines. En effet, *Betula pendula* est encore une fois l'essence la plus analysée (Willfor et al., 2003 ; Calliste et al., 2001 ; Kahkonen et al., 1999 ; Abdullin et al., 2002). D'autres études portent sur *Betula pubescens* (Kahkonen et al., 1999) et *Betula platyphylla* var *japonica* (Matsuda et al., 1998 ; Ju et al., 2004). Les résultats de ces travaux montrent que les extraits de bouleaux possèdent des vertus thérapeutiques comme antioxydants. Kähkönen et son équipe (1999) ont effectué une étude des propriétés antioxydantes des extraits de feuilles de *Betula pubescens*. Dans la même recherche, ces derniers ont aussi évalué le potentiel des feuilles, du phloème et de l'écorce de *Betula pendula*. Les auteurs ont comparé l'activité antioxydante de 92 extraits phénoliques

appartenant à des plantes comestibles et incommestibles par la méthode de détermination de diènes conjugués dans le linoléate de méthyle. Parallèlement, la teneur en phénols totaux a aussi été déterminée. Contrairement à ce à quoi on s'attendait, dans certains sous-groupes, les auteurs n'ont trouvé aucune corrélation entre la teneur en phénols et l'activité antioxydante. Cependant, l'extrait du phloème de *Betula pendula* ayant une haute quantité de phénols a montré la plus grande activité antioxydante comparée aux autres espèces étudiées. L'espèce *Betula pendula* fut aussi étudiée par deux autres chercheurs, notamment par Willför et collaborateurs (2003) qui ont examiné le potentiel antioxydant du bois de cœur d'un spécimen de cette essence, et l'équipe de Calliste (2001) qui ont étudié son écorce. Selon les travaux de Willför (2003) l'activité antioxydante des extraits, en utilisant un mélange acétone/eau (95 :5 v/v), a été analysée à partir de leur capacité d'inhiber le *ter*-butylhydroperoxyde (t-BuOOH) dans des microsomes de foie de rat *in vitro*. Les auteurs ont aussi évalué leurs propriétés antioxydantes comme piègeurs des radicaux peroxyde et superoxyde par un test de chimiluminescence. L'extrait de cette essence a montré une capacité antioxydante adéquate sur t-BuOOH voire supérieure à celle du butylhydroxyanisole (BHA) utilisé comme référence. Également, leur capacité antioxydante comme piègeur du radical peroxyde *in vitro* a été supérieure à celle du Trolox employé comme référence. Selon l'étude de Calliste, la capacité antioxydante de l'extrait d'écorce de *Betula pendula* a été évaluée en utilisant la RPE avec les radicaux DPPH, hydroxyle et superoxyde. Les résultats de cette recherche montrent que les extraits de cette essence présentent une forte activité antioxydante plus importante que celle de *Vitis vinifera*, essence employée comme référence.

Une autre espèce de bouleau, cette fois-ci japonaise, fut amplement étudiée au sein de la littérature, *Betula platyphylla*, une espèce retrouvée au Japon, en Chine, en Corée et en Sibérie. Matsuda (1998) et son équipe ont évalué le potentiel antioxydant des constituants aromatiques de l'écorce d'un spécimen prélevé au Japon. Les auteurs ont utilisé le test TBA et

une méthode mettant en jeu le chlorure de nitrotétrazolium (NTB) pour laquelle l'absorbance à 560 nm est proportionnelle à la quantité de $O_2^{\cdot -}$ qui n'a pas réagi avec l'antioxydant. Le pourcentage d'inhibition a été calculé par rapport à la formation de $O_2^{\cdot -}$ en absence d'antioxydants. Les résultats ont montré une forte activité antioxydante de l'extrait dans le méthanol 50 % par les deux méthodes.

La plus récente et la plus complète des études sur le sujet fut effectuée par Ju (2004) et son équipe. Ces derniers ont aussi étudié le potentiel antioxydant et anticancérigène des extraits des écorces de *B. platyphylla*. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant la méthode DPPH, ainsi que celle au chlorure de nitrotétrazolium (NTB) sur des enzymes antioxydantes. Les résultats ont montré un effet relativement élevé de l'extrait en comparaison à la référence par le test du DPPH. En plus, l'extrait de *B. platyphylla* var. *japonica* a augmenté l'activité de trois enzymes antioxydantes, à savoir le superoxyde dismutase, catalase et glutathione peroxidase.

Les propriétés antioxydantes des extraits de *Betula alleghaniensis* et *Betula papyrifera* dans un mélange méthanol/eau et dans le dichlorométhane ont été étudiées par Lavoie (2005) en utilisant trois techniques d'extraction, à savoir la macération, l'extraction par soxhlet et l'extraction assistée par ultrasons. Une technique basée sur l'oxydation du linoléate de méthyle induite par AIBN (2,2'-azobis (2-méthylproprionitrile) a été employée comme méthode antioxydante. Les résultats ont montré que les extraits obtenus avec le méthanol par macération et avec le dichlorométhane par soxhlet ont eu une activité antioxydante significative dans les deux essences analysées. Cependant, les extraits obtenus par ultrasons n'ont pas montré un bon comportement antioxydant malgré leur teneur élevée en phénols.

Ainsi, d'après la revue de littérature, les essences appartenant au genre *Betula* ont démontré une capacité antioxydante appropriée, qui a été en général bien corrélée avec la teneur en

phénols. Cependant, il est possible de constater l'absence d'études approfondies sur des essences américaines, voire le bouleau jaune.

OBJECTIFS, HYPOTHÈSES ET MÉTHODOLOGIE

L'hypothèse de départ de ce travail a été supportée par les résultats de Julkunen-Tiito (1996) et son équipe, qui ont constaté la présence du salidroside et d'autres polyphénols dans les jeunes tiges de bouleau jaune. De ce fait, les extraits polaires de ramilles de cette essence devraient aussi présenter un profil polyphénolique intéressant. Ces biomolécules, en tant qu'antioxydants reconnus, attribueraient aux extraits des effets antioxydants à différentes températures.

Les objectifs de cette étude sont donc orientés vers la caractérisation chimique des extraits phénoliques de ramilles de cet arbre ainsi que sur l'évaluation de leurs propriétés antioxydantes. Pour mener à bien ce projet de recherche, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Faire une caractérisation chimique des extraits de ramilles du bouleau jaune en ce qui concerne l'identification et la quantification de molécules polyphénoliques présentes.
- Vérifier si les extraits du bouleau jaune possèdent un potentiel en tant qu'agents antioxydants qui puisse s'avérer intéressants pour l'industrie alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique.

La méthodologie de ce travail correspond à l'exécution de différentes procédures expérimentales, nous permettant d'obtenir des résultats conformes aux objectifs énoncés précédemment. Une explication détaillée de la procédure expérimentale utilisée est fournie dans les articles qui correspondent aux chapitres 2 et 3.

Le choix du bouleau jaune est bien simple dans le contexte actuel, car aucune étude approfondie des polyphénols extractibles des ramilles de cet arbre n'a été effectuée et jusqu'à maintenant il n'existe aucun travail publié portant sur ses propriétés antioxydantes. Aussi, l'importance du bouleau jaune au niveau socio-économique de la province du Québec pourra générer des revenus d'appoint ou supplémentaires à son industrie forestière.

Les études de base sur cette essence ont été effectuées sur des ramilles de trois spécimens prélevés dans la municipalité de St-Cyrille de Lessard dans la région de Chaudière-Appalaches, province du Québec. Les ramilles ont été séchées puis broyées et enfin extraites par macération en employant comme solvant un mélange d'acétone/eau (70/30, v/v). De plus, des extractions liquide-liquide ont été effectuées avec le ter-butyle-éther et l'acétate d'éthyle dans le but de séparer les différents types de polyphénols dans des fractions en fonction de leur polarité différente. Cette étape nous a aussi permis de faciliter les analyses chimiques. La méthode d'extraction a été choisie en raison de sa facilité et du fait que cette technique est relativement peu coûteuse. En plus, elle est réalisée à la température ambiante ce qui présente un avantage quant à la conservation de l'intégrité des molécules polyphénoliques ; en effet, les polyphénols sont susceptibles d'être affectés par la température et par conséquent leurs propriétés. Les analyses d'identification chimique ont été effectuées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Selon la revue bibliographique, la CLHP en phase inverse combinée à la spectroscopie ultraviolette et visible (UV-Vis) est la méthode la plus commune pour l'identification et la quantification des différents composés phénoliques. De plus, la teneur en lignine (lignine Klason plus lignine acide soluble) des ramilles a été déterminée afin de pouvoir faire des comparaisons avec la teneur en lignine des autres parties de l'arbre décrite dans la littérature

Une fois les analyses d'identification et quantification des composés phénoliques effectuées par CLHP en utilisant deux systèmes d'élution binaires caractérisés par un solvant A polaire acidifié (l'acide acétique 5% et l'acide orthophosphorique 5 %) et un solvant B organique moins polaire (100% acétonitrile) dans deux colonnes en phase inversée (Jones Chromatography Lichrosorb RP 18 et Zorbax SB-C18 60 x 4,6 mm ID), on a évalué la teneur en polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu afin de pouvoir établir des relations entre la teneur en phénols et les propriétés antioxydantes des extraits. Les propriétés

antioxydantes des extraits et de leurs fractions ont été évaluées selon quatre techniques *in vitro* qui ont été réalisées à des températures différentes. Plusieurs méthodes de mesure de l'activité antioxydante ont été utilisées, car il est connu que la majorité des antioxydants naturels sont multifonctionnels, donc un protocole d'évaluation de l'activité antioxydante fiable exige la mesure plus que d'une propriété.

La capacité antioxydante à température ambiante a été examinée en utilisant deux méthodes basées sur la réactivité des extraits avec un radical libre le 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyle (DPPH). La méthode du DPPH a été utilisée par de nombreux auteurs, du fait de sa rapidité et sa reproductibilité. La technique de mesure avec le radical DPPH est relativement simple, car il s'agit d'un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution.

Deux autres méthodes, la calorimétrie différentielle (DSC) et la thermogravimétrie (TG), ont été employées pour l'étude de la capacité antioxydante des extraits à haute température. En fait, les méthodes d'analyses thermiques sont reconnues pour être rapides et reproductibles si on les compare à d'autres méthodes accélérées par exemple la méthode du four de Schall et celle du Rancimat. De plus, dans certains cas, ils peuvent être un reflet des conditions auxquelles les huiles et les graisses sont soumises lors de leur production, de la fabrication des aliments ou de leur utilisation domestique comme huile de friture.

CHAPITRE 2. Characterisation of phenolic compounds from yellow birch twigs extracts.

García-Pérez Martha-Estrella, Diouf Papa Niokhor, Stevanovic Tatjana*

Centre de Recherche sur le Bois, Département des sciences du bois et de la forêt, Faculté de foresterie et géomatique, Université Laval, Québec G1K7P4, Canada.

Publication: Cette article sera soumis à la revue “Journal of Ethnopharmacology”

* Corresponding author. Tel: + 1 418 6562131#7337; Fax: + 1 418 6563177.
E-mail adress: tatjana.stevanovic@sbf.ulaval.ca (Tatjana Stevanovic).

Résumé

Les composés phénoliques des ramilles du bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*) ont été extraits avec un mélange acétone/eau (70/30 v/v). Cette étape a été suivie d'une extraction liquide-liquide en utilisant l'éther de pétrole, le t-butyle-méthyle éther et l'acétate d'éthyle. Le rendement du processus d'extraction et la teneur en lignine des ramilles ont également été déterminés. La chromatographie liquide à haute performance, HPLC, couplée à un détecteur à barrette de diodes a été employée pour identifier et quantifier un total de 8 composés phénoliques présents dans l'extrait brut et dans ses fractions. L'analyse chimique a indiqué la présence de sept composés: le thymol, l'eugénol, l'acide salicylique, l'épicatéchine, le gaïacol, la vanilline et la taxifoline qui n'avaient pas été identifiés précédemment pour cette espèce. De plus, le thymol et la taxifoline ont été identifiés pour la première fois dans le genre *Betula*.

Abstract

Phenolic compounds soluble in an aqueous acetone solution were extracted from yellow birch (*Betula alleghaniensis*) twigs. This step was followed by solvent fractionation using petroleum ether, t-butyl-methyl ether and ethyl acetate. The yield of extractives and the content of lignin for twigs were also determined. High-performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection was used to identify and quantify a total of 8 phenolic compounds in crude extracts and in its fractions. The analysis revealed the presence of seven compounds, thymol, eugenol, salicylic acid, (-)-epicatechin, guaiacol, vanillin and taxifoline which have not been reported previously for this species. Additionally, thymol and taxifoline were identified for the first time for the *Betula* genus.

Key words: phenolic compounds, twigs, *Betula alleghaniensis*, yellow birch

2.1 Introduction

Yellow birch (*Betula alleghaniensis*) is a common tree in North America. It grows from the northern United States to the southern Canada. It is the emblem tree of Quebec and the second most important hardwood specie exploited by the wood industry. Its industrial use generates vast quantities of solid residues like small branches which at present does not have a commercial value (Lavoie and Stevanovic 2005).

Previous studies have demonstrated the presence of phenolic molecules in *Betula* genus. These studies have been carried out using foliage, wood, stems and barks of European species, being *Betula pendula* the most commonly studied tree (Kuokkanen et al., 2001; De la Rosa et al., 2001; Laitinen et al., 2000; Salminen et al., 2002; Dallenbach-Toelke et al., 1986; Ossipov et al., 1996). However, only few phenolic compounds have been identified in North American species, particularly in *Betula alleghaniensis*. Triterpenes and phytosterols have been identified as the most valuable compounds present in lipophilic extract from solid wood and industrial sawdust of yellow birch. Phenols such as syringaldehyde, chlorogenic acid and salidroside have been also found in dichloromethane extract of yellow birch wood but in lower concentrations (Lavoie & Stevanovic, 2006). Keinänen et al (1999) compared the foliar phenolic composition of several birch species. (+)-Catechin, 3-caffeoylquinic acid, 3-coumaroylquinic acid, quercetin-3-arabinopyranoside, kaempferol-3-rhamnoside and apigenin derivatives were identified in yellow birch extracts. Julkunen-Tiitto et al (1996) also examined the presence of phenolics and terpenoids in seedlings of several birch species. Salidroside and (+)-catechin were the only phenolic compounds found in methanolic extracts of *Betula alleghaniensis*. The presence of rhododendrin in the yellow birch inner bark has been confirmed by Santamour and Lundgren (1997).

Polyphenols are a group of important bioactive molecules showing activities against allergies, inflammation, viruses, hypertension, arthritis, mutations, and cancer (Hertog et al., 1992; Middleton 1996; Robards and Antolovich 1997). Their activity and significance for the cosmetics, foods and pharmaceutical industry are the main driving force behind important research efforts to find new natural sources of polyphenols. One alternative source of these bioactive molecules could be the solid wastes from the forest industry. The valorisation of these residues could help to increase the economic viability of this sector.

The main goal of this study is to identify and quantify phenolic compounds in yellow birch twigs aqueous acetone extracts and in its fractions. Additionally, the amounts of lignin are determined in order to provide more information about the chemical composition of yellow birch twigs.

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Twigs Samples

Yellow birch twigs employed in this study were collected in September 2005, near the town of St-Cyrille de Lessard in the Chaudière-Appalache region of Quebec. Three twigs samples from the same number of trees were collected. All samples were immediately placed on ice and then frozen at -15 °C until extraction in the laboratory. Before the extraction, the foliage was separated from the twigs which were cut in sections of 5 mm. These sections were oven dried at 45 °C for 7 days. Subsequently, dry twigs were ground in a laboratory grinder (Cyclotec 1093 sample mix Tecator) to produce a meal of adequate granulometry for chemical analyses (40-60 mesh). The twing meal was preserved at ambient temperature until extraction. The moisture content was determined by oven drying the samples during 24 h at 100 °C.

2.2.2 Standards and solvents

HPLC grade solvents such as tetrahydrofuran (THF), ethanol, toluene, acetone, trifluoroacetic acid, acetic acid, acetonitrile, petroleum ether, t-butyl-methyl ether and ethyl acetate were purchased from Fisher-Scientific. The identification and quantification of phenolic compounds were carried out using the following commercial standards: chlorogenic acid, (-)-epicatechin, salicylic acid and thymol (Sigma Aldrich), quercetin (Aldrich), kaempferol (Indofine, chemical company Inc.), salidroside (Sequoia Research, ltd), guaiacol (Eastman), vanillin (Fisher Scientific) and taxifolin (Chromadex),

2.2.3 Extraction and Solvent fractionation

The yellow birch twig meal (20g) was extracted in three consecutive steps with 200 ml of a 70 % acetone aqueous solution, under continuous agitation (220 rpm) at room temperature for 24 h. The agitation was stopped and the supernatant collected at the end of each extraction step. A fresh solution containing 70 % of aqueous acetone was added to the solid remaining after each extraction step. The suspension resulting from the last extraction step was vacuum filtered through Whatman N°. 4 paper on a Büchner funnel. The solid was washed with 100 ml of the same acetone solution. All extracts were combined and acetone removed at 40 °C using a rotary vacuum evaporator. The aqueous layer was freeze-dried to yield an aqueous acetone extract. The extracts were suspended in water (1:50 w/v), defatted with petroleum ether and sequentially partitioned with t-butyl-methyl ether (3 x 50 ml) and ethyl acetate (3 x 50 ml) to obtain three different fractions: t-butyl-methyl ether fraction (TBME_f), ethyl acetate fraction (EA_f) and aqueous fraction (A_f) as depicted in Figure 2.1.

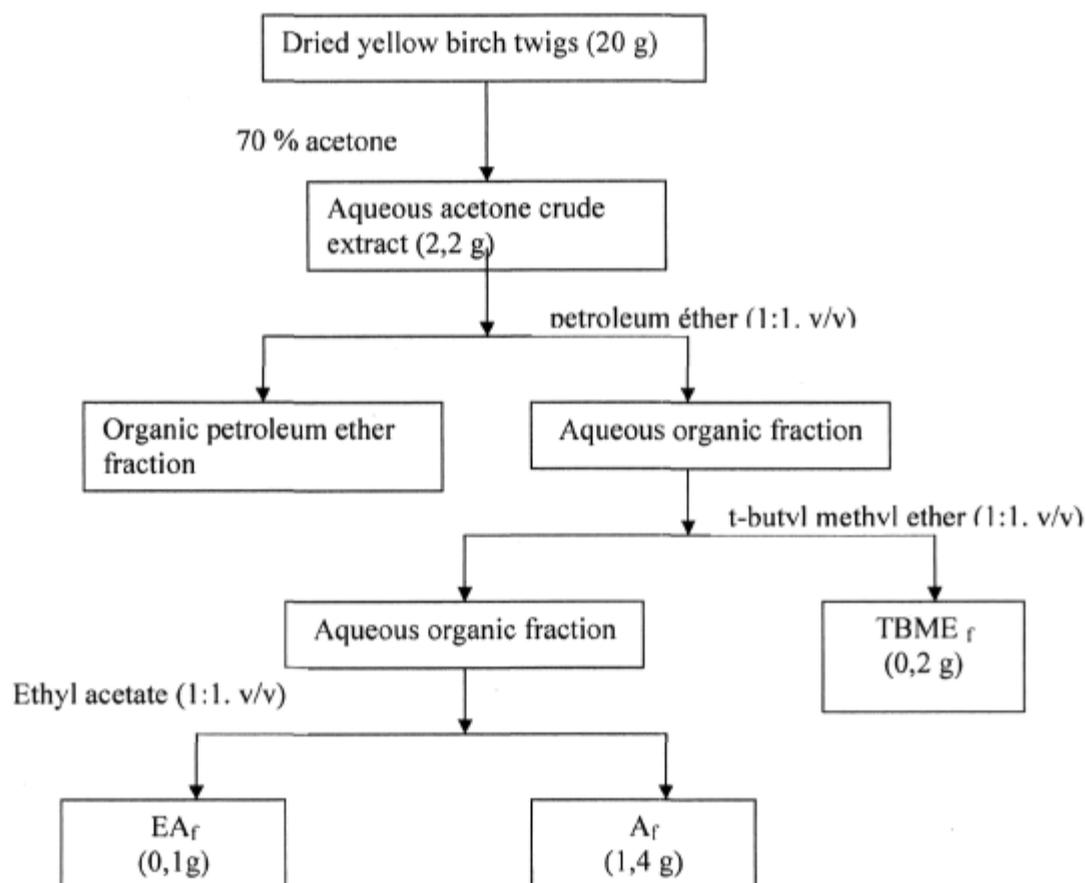


Figure 2.1. Scheme of solvent fractionation of yellow birch twigs extract.

2.2.4 Chromatographic system

The HPLC system was an Agilent Technologies Series 1100 instrument with a quaternary pump (Agilent 1100 Series) and autosampler (Agilent 1100 Series). A photodiode array detector (Agilent 1100 Series) coupled with an HP data system-personal computer was used for recording chromatograms and UV-Vis spectra. The compounds were separated by three methods, which we shall call A, B and C. In all of them the column temperature was maintained at 30 °C and the injection volume was 20 µl. Retention times and UV-Vis spectra of the peaks were compared in all cases with commercial standards.

a) Method A

A 5- μ m Zorbax ODS column (250 x 4,6 mm I.D) was used in this method. The column was saturated with a solution containing 2.4 % tetrahydrofuran (THF) in water for 10 minutes before injection. The solvents used were an aqueous solution containing 2.4 % THF (Solvent A) and Methanol (Solvent B). The elution was in isocratic mode. The analysis was monitored at 225 and 280 nm using a carrier liquid flow rate of 2ml/min. Samples were purified before the test on Varian Bond Elut C₁₈ octadecyl (500 mg) solid phase extraction columns. After purification, 3 ml of Methanol were passed through the column and the eluent was also used for HPLC analysis (C₁₈ A).

b) Method B

Samples were purified by using the Varian Bond Elut C₁₈ octadecyl (500 mg) solid phase extraction column and were also analysed without purification. Afterwards, they were hydrolyzed in order to recognize the aglycones. The acid hydrolysis was carried out by the method proposed by Bloor (2001) with some modifications. In fact, two approaches were used. In both of them, 700 μ l of samples in methanol (crude extract 1, 5 mg/ml; fractions 1mg/ml) were placed in a propylene tube and the solvent was evaporated under a nitrogen atmosphere. Afterwards, 300 μ l of a trifluoroacetic acid (TFA): methanol solution (1:1 v/v) was added to the samples (first approach). Then, the extracts and the acid were sealed in a screw-top polypropylene tube and heated on a heating bath at 45 °C for 30 min. The samples were then examined by HPLC and the phenolic compounds identified by comparison with the standards. The second approach differs in the type of acid employed. In this case, 300 μ l of a 2N HCl: methanol solution (1:1 v/v) was added to the samples.

A 10- μ m Jones Chromatography Lichrosorb RP 18 column (250 x 4,6 mm I.D) was used. The solvents were 0.7 ml/min of an aqueous solution containing 5 % of acetic acid (Solvent A)

and acetonitrile as solvent B. The gradient elution employed is shown in Table 2.1. The analysis was monitored at 254, 280, 340 and 360 nm.

Table 2.1. HPLC gradient elution by Method B

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
Initial	95	5
10	95	5
60	50	50
80	30	70
90	95	5

(Solvent A: 5 % aqueous acetic acid; Solvent B: 100% acetonitrile)

c) Method C

The sample preparation in method C was similar to the one described previously for method B. However, some chromatographic conditions were modified. The compounds were separated on a 250 mm x 4,6 mm Zorbax SB-C₁₈ column (5 µm). The solvents employed were an aqueous solution of 5 % orthophosphoric acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The samples were eluted at 0.7 ml/min by using the gradient elution shown in Table 2.2. The analysis was monitored at 254, 280, 340 and 360 nm.

Table 2.2. HPLC gradient elution by Method C

Time (min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
Initial	95	5
10	95	5
60	50	50
80	30	70
90	15	85

Solvent A: aqueous 5 % orthophosphorique acid; Solvent B: 100% acetonitrile.

2.2.4 Lignin Determination

Before lignin determination the twig meal was extracted using a Soxhlet apparatus with toluene- ethanol (2:1 v/v), followed by hot water extraction. The extracted samples were air-dried for three days and the moisture content determined. The determination of the total lignin content (Klason lignin plus acid-soluble lignin) was carried out using a modified Klason lignin standard procedure (TAPPI T 13m-54, ASTM D-1106). In fact, samples were placed in

an autoclave in order to determine the Klason lignin. Acid-soluble lignin was measured by spectrophotometry of the filtrate at 205 nm in accordance with TAPPI UM 250.

2.3 Results and Discussion

2.3.1 Extraction and solvent fractionation

The yields for twigs samples extraction did not vary much between the specimens. Only the specimen 3 showed a discrete difference, exhibiting lower values (Table 2.3). These similarities are common in trees collected from the same place. It is clear that the environmental conditions have an important influence in the production of metabolites, so it could be expected that the extraction yields of plants growing in the same place be very similar (Graglia et al., 1996). Lavoie and Stevanovic (2006) attributed the large differences observed in the extraction yields of industrial yellow birch sawdusts to the high heterogeneity of the samples, which were from trees grown in different regions.

Table 2.3. Extraction Yields of yellow birch twigs in aqueous acetone.

<i>Samples</i>	<i>Extraction yields of Betula alleghaniensis twigs* (%)</i>		
	<i>Specimen 1</i>	<i>Specimen 2</i>	<i>Specimen 3</i>
1	8,6	7,7	5,9
2	8,7	8,8	7,0
3	9,0	10,8	7,4
Average yield	8,8 ± 0,2	9,1 ± 1,5	6,8 ± 0,7

*This yield is based on dry twigs meal.

Other authors have used the solvent fractionation in order to extract selectively different kind of phenols. Senevirathne et al (2006) employed the solvent fractionation of 70 % methanol crude extract of *Ecklonia cava* by using as solvents *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate. Pescher et al (2006) also reported the use of the liquid/liquid extraction of 50 % ethanol and 80 % acetone crude extracts of plant materials like apple, pear, tomato and artichoke. In fact, these authors used a sequential extraction with butanol and butanone.

Figure 2.2 represents the yields obtained of each fraction based on the initial mass of the crude extract. The aqueous fraction was by far the most important fraction. In effect, water participates in the extraction of polar compounds from crude extract, so it could be expected that the highest concentrations found in this fraction is due to the high concentration of compounds soluble in water.

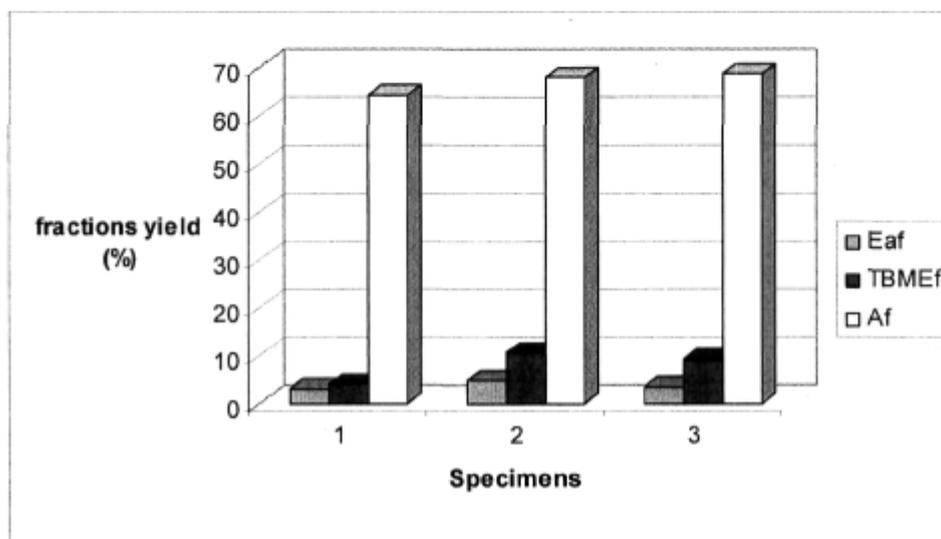


Figure 2.2. Yields of solvent fractionation of yellow birch twigs extraction

2.3.2 Lignin determination

Table 2.4 represents the lignin content in yellow birch twigs. It is known that the distribution of lignin within the cell wall and the lignin content of different parts of the same tree are not uniform. For example, high lignin values are characteristic for the lowest, highest and inner part of the stem, for softwood branches, bark and compression wood. In contrast, the lignin content of leaves are described as high or low, possibly depending on their state of development (Fengel and Wegener, 1984). In this study, the obtained value of total lignin is quite similar to those described in the literature for *Betula alleghaniensis* wood and for other species of *Betula* genus. For *Betula papyrifera* and *Betula verrucosa* wood the total lignin

contents reported are 22 % and 19,4 % respectively (Fengel and Wegener, 1984), while for yellow birch wood from trunk a value of 23,8 % is reported (Panshin and Zeeuw, 1980).

Table 2.4 Lignin content in yellow birch twigs.

Average of Klason lignin (%)	Average of Acid-soluble lignin (%)	Total Lignin in twigs (%)
20,3 ± 1,4	2,5 ± 0,2	22,8

2.3.3 Identification and quantification of phenolic compounds of yellow birch twigs

A total of 8 phenolic constituents in the aqueous acetone extract and its fractions were identified and are listed in Table 2.5. The chemical structures of these compounds are presented in Figure 2.3. (-)- Epicatechin produced during acid hydrolyses of crude extract was the most important phenolic compound identified. The second and third most important phenolic constituents were the salicylic acid and the guaiacol. Other compounds present in high concentrations in the hydrolysed ethyl acetate fraction were eugenol and thymol. Salidroside, vanillin and taxifolin can be considered as minor compounds in yellow birch twigs.

Majority of the phenolic compounds identified in this work are bioactive molecules. For exemple, (-)-epicatechin can reduce the risk of four of the most common health problems: stroke, heart failure, cancer and diabetes (Quine and Raghu 2005; Li and Jiang 2007; Shah and Dore 2007). Schroter et al (2006) demonstred that the human ingestion of (-)-epicatechin is linked to an enhanced flow mediated vasodilatation of conduit arteries and augmented microcirculation observed after the consumption of flavonol-rich cocoa.

On the other hand, salicylic acid is a key ingredient of some skin-care products for the medical treatment of acne, psoriasis, calluses, corns and warts (Rougier and Wen 2007;

Chantalat et al., 2007; De Leeuw et al., 2006). Thymol, another compound found in yellow birch extracts, is reputed for its properties as antiseptic and anti-inflammatory. In fact, it is the main constituent of the *Lippia sidoides*, a plant widely used by the folk medicine of Brazil. The literature reveals that the leaf essential oil of this plant can reduce the induced ear acute edema inflammation in mice, in a similar way to indomethacin. Moreover, it is also active against the acute ethanol-induced gastric lesions at a dose of 10 mg/kg (Barros-Monteiro et al., 2007).

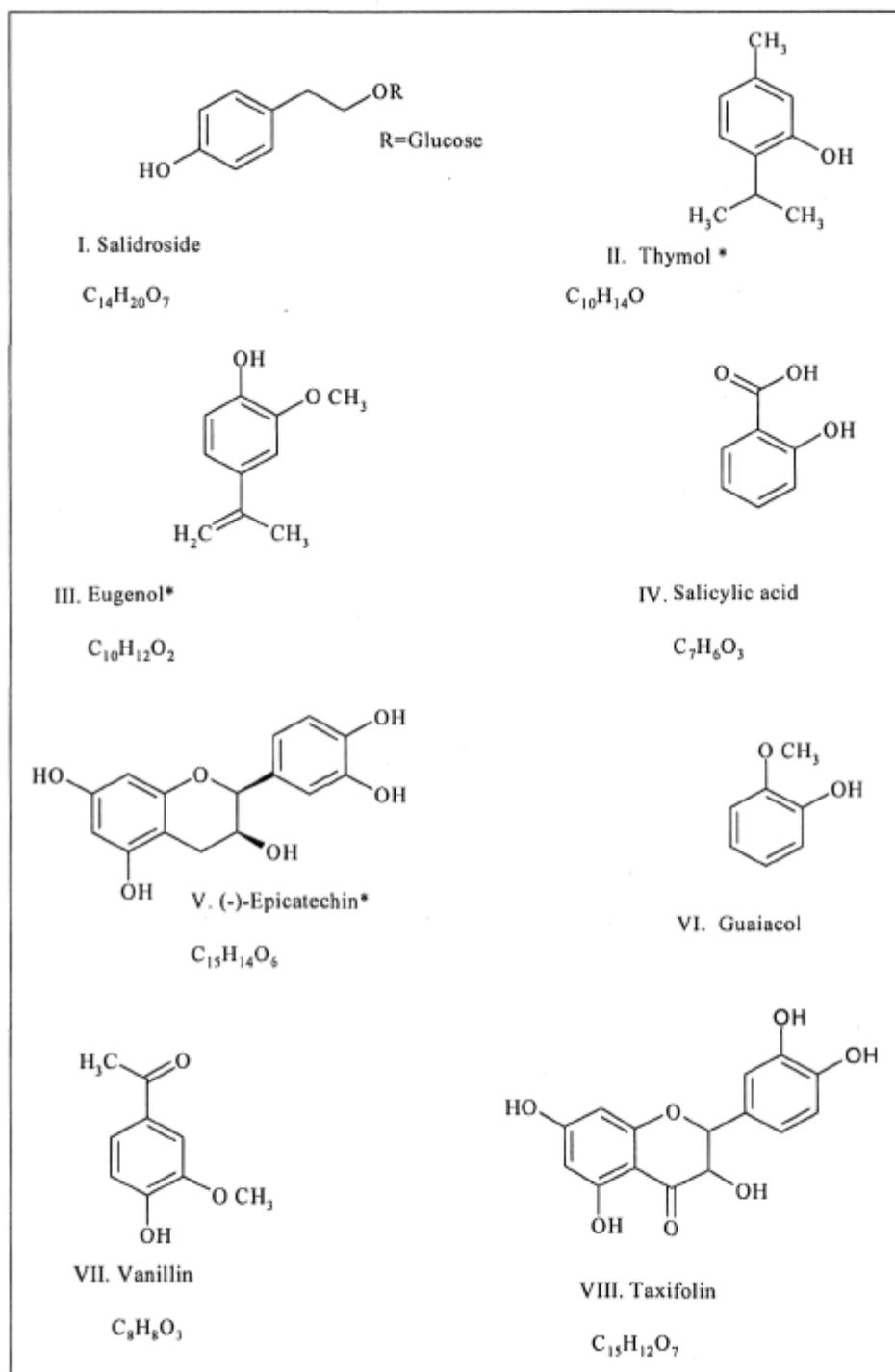


Figure 2.3 Structures of the phenolic compounds identified in extracts of *B. alleghaniensis* twigs. * Aglycones released after acid hydrolyses.

Eugenol is known by its antibacterial effects. In fact, it has been compared with others spice components like thymol; menthol and anethole against *Salmonella typhimurium*,

Staphylococcus aureus and *Vibrio parahaemolyticus*. Of the spice components tested, eugenol was found to be the most effective antibacterial agent followed by thymol, anethole and menthol (Karapinar and Esen-Haktug 1987). Furthermore, salidroside is recognized by its ability to enhance the capacity of haemoglobin to carry oxygen and by its excellent properties as antioxidant (Yang et al., 2007; Cao et al., 2006). Salidroside is the most important constituent of *Rhodiola rosea*, herb used by the traditional medicine to treat fatigue, depression, anaemia, impotence, infections and nervous system disorders (Zhou et al., 2007). Taxifolin, which is present in low concentrations in the TBME fraction, is also a bioactive molecule. Some works have shown that taxifolin, a component of silymarin, can suppress the proliferation of a variety of tumour cells (e.g., prostate, breast, ovary, colon, lung, bladder) inhibiting the functions of some inflammatory transcription factors (Goetz et al., 1999; Agarwal et al., 2006). Lavoie and Stevanovic (2006) have also identified other bioactive compounds in lipophilic extracts of this specie. Majority of them belong to the family of triterpenoids, sterols and fatty acids and have an effect on human health. Betulinic acid, one of the most studied compounds by these authors, is a molecule active against HIV (Yu et al., 2005). Additionally, betulonic acid, the major component of lipophilic yellow birch extracts, has shown anti-tumour and anti-HIV properties (Pezzuto et al., 1998).

The obtained results of this work and those reported in the literature confirm that yellow birch represents an important source of bioactive molecules. Phenolics identified provide additional information about the therapeutic value of this tree which had been used by the Native North American as a medicinal plant (Chandler et al., 1979).

Table 2.5. Average concentration of phenolic compounds in yellow birch twig crude extract and its fractions in relation to the method used for its identification.

#	Retention time (min)	Phenolic compound	mg.g ⁻¹ of extract*	mg. g ⁻¹ of twigs*	Sample where the compound was identified	Method
I	2.63	Salidroside	3.75	0.33	Crude extract (C ₁₈ A)	A
II	63.01	Thymol glycoside	6.74	0.02	Hydrolyzed EA _f	B first approach
III	52.46	Eugenol glycoside	9.47	0.03	Hydrolyzed EA _f	B first approach
IV	34.41	Salicylic Acid	11.06	1.49	Crude extract	B
V	22.82	-(-) Epicatechin glycoside	29.73	4.82	Hydrolyzed Crude extract	B second approach
VI	37.81	Guaiacol	8.01	1.30	Purified crude extract with Bond elut C18	C
VII	32.96	Vanillin	2.76	0.45	Purified crude extract with Bond elut C18	C
VIII	36.33	Taxifolin	0.47	0.0034	TBME _f	C

*The results are means of three replicates on a dry weight basis.

As can be observed in Table 2.6, some of the compounds identified in this study have been already found in other birch species. For instance, salidroside, a phenolic compound widely distributed in birches, has been identified in the twigs, sawdust and wood from trunks of *Betula alleghaniensis* (Julkunen-Tiito et al., 1996; Lavoie and Stevanovic 2006). However, the amounts of salidroside reported for yellow birch in other studies are different to those found in this study. Thus, Julkunen-Tiito et al (1996) found higher quantities of this compound (3.09 mg.g⁻¹) in twigs of yellow birch seedlings. In contrast, Lavoie and Stevanovic (2006) reported lower amounts in wood from trunks (0.051 mg. g⁻¹) and sawdust (0.084 mg.g⁻¹) of this species. These differences could be attributed to differences between tissues employed in different studies and the influence of growth condition of plants on the phenolic production. It has been proved that abiotic and biotic factors, e.g., fertilization, age,

defoliation, elevated CO₂, ozone, UV light, and pollution affect the phenolic production in birches (Lavola 1998; Keinänen et al., 1999).

On the other hand, the rest of compounds herein identified have not been described previously for yellow birch, and two of them are described for the first time for *Betula* genus.

Eugenol has been identified by Matsuoka et al (1993) as a volatile flavour compound emitted by *B. platyphylla* bark. Additionally, this compound has been also identified as a component of the essential oils obtained from leaves, branches and buds of *B.pendula*, *B.browicziana* and *B. medwediewii* growing in Turkey (Can-Baser and Demirci 2007).

On the other hand, salicylic acid has been reported in *B. lenta* as salicylic-acid primvercoside (Duke 1983). Salicylic acid does not appear in nature in large amounts, but methyl salicylate, one of its derivatives, can be obtained in large quantities from the essential oil of sweet birch (*B.lenta*) bark (Le Grand et al., 2005). Lavoie (2005) has also described the presence of great amounts of methyl salicylate in the foliage of yellow birch.

The presence of (+)-catechin has been highly documented in birches (Mammela 2001; Kuokkanen et al., 2001; Julkunen-Tiito et al., 1996; Pan and Lundgren 1994). This compound has been also found in the stems and foliage of *Betula alleghaniensis* (Julkunen-Tiito et al., 1996; Keinänen et al., 1999). In contrast, its epimer (-)-epicatechin has been less described in *Betula* genus and it was not possible to find any report about its presence in *B.alleghaniensis*. Riipi et al (2002) identified the (-)-epicatechin in mountain birch (*Betula pubescens* ssp *czerepanovii*) leaves. These authors studied the seasonal changes in leaves chemistry of this specie. Results showed that (-) epicatechin concentrations remained low through the season, but others phenolic metabolites such as proanthocyaninids increased during the leaf growth season. In addition, Tegelberg et al (2002) reported the presence of (-)-epicatechin in silver birch (*B.pendula*) bark and considered the influence of long-term UV-B exposure on the concentration of phenolics. The (-)-epicatechin content of dry silver birch bark at ambient

radiation was 2.08 mg. g^{-1} and this amount increased in response to elevated UV radiation. Laitinen et al (2004) studied the variation in bark chemistry between and within 19 European white birches clones and its implications on the resistance to the mountain hare (*Lepus timidus*). This work demonstrated the presence of (-)-epicatechin in the dry white birch bark in similar quantities (3.67 mg.g^{-1}) to those found by Tegelberg et al (2002) for the silver birch bark. A significant variation for this compound between clones was observed. It was proved that the environment may modify the quantities of chemical constituents implicated in the chemical defence of trees.

Guaiacol has also been identified as a constituent of *Betula pendula* essential oil (Food Chemical Codex 1972). Huber et al (2000) utilized the coupled gas chromatographic-electroanthennographic detection analysis to determine the release of bark volatiles of six angiosperms native to British Columbia, Canada. The resulting volatiles were analysed for antennal responses in five species of bark beetles, a coniferophagous which lives in the inner bark of the host trees. The guaiacol was identified in barks of black cottonwood (*Populus trichocarpa*), trembling aspen (*P. tremuloides*) and bigleaf maple (*Acer macrophyllum*). On the contrary, it was not reported for paper birch (*B.papyrifera*), the only studied specie belonging to *Betula* genus. In general, guaiacol has been rarely identified as a free molecule in birches extractives; however its presence has been widely reported as a result of lignin decomposition during wood pyrolysis (Murwanahsyaka et al., 2001; Hosoya et al., 2007).

Vanillin has also been found in methanol extracts of *B. pendula* wood from two trees. However, the values of concentrations obtained for this compound in this species were rather small ($0,01 \text{ mg.g}^{-1}$) (Hiltunen et al., 2006).

The results depicted in Table 2.6 illustrate the presence of two compounds (thymol and taxifoline) previously identified for other trees but described for the first time in the *Betula* genus. The presence of thymol methyl ether has been reported in *Populus trichocarpa* bark

(Huber et al., 2000) whereas taxifolin, taxifolin-*O*-hexoside and taxifolin-*O*-pentoside displayed the most abundant peaks in beech dust (*Fagus sylvatica*) chromatograms (Mammela 2001). Moreover, taxifolin is a well documented constituent of conifer barks (Lavola et al., 2003; Faccoli and Schlyter 2007; Mun and Ku 2006).

Table 2.6. Occurrence of identified yellow birch phenolic compounds in tissues of birch species.

Phenolic compound	Birch species	Tissue	Reference
Salidroside	<i>B.nana</i>	Foliage	Graglia et al., 2001
	<i>B.plathyphylla</i>	Foliage Stems	Shen et al., 1999 Julkunen-Tiito et al., 1996
	<i>B.pendula</i>	Foliage Stems Bark	Kuokkanen et al., 2001 Vainiotalo 1991 Smite et al., 1995 Tegelberg et al., 2002
	<i>B.alleghaniensis</i>	Stems Wood	Julkunen-Tiito et al., 1996 Lavoie and Stevanovic 2006
	<i>B.maximowicziana</i>	Stems	Julkunen-Tiito et al., 1996
	<i>B.grossa</i>		
<i>B.pubescens</i>			
Thymol** glycoside	<i>Not reported previously neither as free molecule nor as aglycone.</i>		
Eugenol* glycoside	<i>B.plathyphylla</i>	Bark	Matsuoka et al., 1993
	<i>B.pendula</i>	Foliage Branches Buds	Can-Baser and Demirci 2007
	<i>B.browicziana</i>		
	<i>B.medwediewii</i>		
Salicylic acid *	<i>B.lenta</i>	Foliage	Duke 1983
(-)-Epicatechin* glycoside	<i>B.pubescens</i>	Foliage	Riipi et al.,2002
	<i>B.pendula</i>	Bark	Tegelberg et al., 2002 Laitinen et al., 2004
Guaiacol*	<i>B.pendula</i>	Bark Wood	Food Chemical Codex (1972)
Vanillin*	<i>B.pendula</i>	Wood	Hiltunen et al., 2006
Taxifoline**	<i>Not reported previously</i>		

*New compounds not reported previously for yellow birch tissues

** New compounds not reported in birch species.

Results of this work provide new information about the phenolic profile of yellow birch twigs extracts, however many compounds of unknown nature still need to be identified. At the same time, some phenolics previously reported for this specie like chlorogenic acid (Lavoie and Stevanovic 2006), quercetin and kaempferol (Keinanen et al., 1999) could not be identified in the extracts by the methods used. The only way to identify the unknown compounds is using more standards or other techniques like gas chromatography (GC), liquid chromatography coupled with mass spectrometry or nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The combination of these techniques could contribute to the better identification of these natural metabolites, adding more information about the phenolic composition of yellow birch twigs samples and its pharmaceutical potential.

2.4 Conclusions

Results of this work show the significance the yellow birch as source of bioactive molecules. The analysis of the aqueous acetone extract of yellow birch twigs and its fraction revealed the presence of eight phenolic compounds; seven of which are identified for the first time in *B.alleghaniensis* and other two are firstly reported for *Betula* genus. The identification of biomolecules in yellow birch twigs and its potential utilisation in medicaments, foods and cosmetics could represent an interesting avenue for the wood industry. Combination of various analytical methods such as NMR, MS, LC and GC is needed to expand the phenolic profile of this tree. Additional studies using other parts of this plant with other solvents and extraction procedures could also contribute to a better understanding of the most valuable tissues of this species.

CHAPITRE 3. Comparative study of antioxidant capacity of yellow birch twigs extracts at ambient and high temperatures

García-Pérez Martha-Estrella, Diouf Papa Niokhor, Stevanovic Tatjana*

Centre de Recherche sur le Bois, Département des sciences du bois et de la forêt, Faculté de foresterie et géomatique, Université Laval, Québec G1K7P4, Canada.

Publication: 2008. *Food Chemistry*. 107: 344-351

* Corresponding author. Tel: +1 418 6562131#7337; Fax: +1 418 6563177.
E-mail adress: tatjana.stevanovic@sbf.ulaval.ca (Tatjana Stevanovic).

Résumé

La capacité antioxydante des extraits de ramilles du bouleau jaune (*Betula alleghaniensis*) à partir d'une extraction à l'acétone/eau (70/30 v/v) et de ses fractions a été déterminée à température ambiante et à une gamme de températures élevées. La capacité antioxydante à température ambiante a été examinée en utilisant deux méthodes basées sur la réactivité des extraits avec un radical libre, stable en solution, le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). La calorimétrie différentielle (DSC) et la thermogravimétrie (TG) ont été employées pour l'étude de la capacité antioxydante des extraits à haute température. Un antioxydant synthétique, couramment utilisé dans l'industrie alimentaire et cosmétique, le BHT (2,6-di-ter-butyl-4-méthyl-phénol) a servi de référence afin de valider le réel potentiel antioxydant des extraits phénoliques étudiés. Parmi les échantillons, la fraction obtenue grâce à l'acétate d'éthyle et la fraction aqueuse ont montré les capacités antioxydantes les plus élevées dans les analyses du DPPH. Par contre, la fraction éther et l'extrait brut ont montré une activité antioxydante plus élevée à températures élevées. L'antioxydant commercial BHT a montré le meilleur comportement antioxydant dans la plupart des essais réalisés, avec comme seule exception la méthode cinétique du DPPH. Les résultats de cette étude confirment que l'activité antioxydante est une propriété qui dépend fortement des conditions d'oxydation utilisées dans les essais.

Abstract

The antioxidant capacity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) twigs aqueous acetone extract and its fractions was evaluated at ambient and at elevated temperatures. The antioxidant activity at room temperature was studied by methods based on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG) were employed at high temperatures. The commercial antioxidant 2,6-di-ter-butyl-4-methyl-phenol (BHT) was used as reference. Among samples, the ethyl acetate and aqueous fractions exhibited the highest antioxidant capacity in DPPH assays. The ether fraction and crude extract showed more antioxidant activity at high temperatures. The commercial antioxidant BHT exhibited the best antioxidant behavior in most of the reported tests. The only exception was in the kinetic method with DPPH. The results of this study confirm that antioxidant activity is a property that strongly depends on the oxidation conditions used in the particular oxidation test.

Keywords: *Betula alleghaniensis*; Twigs extracts; Antioxidant activity; DPPH; Lipid peroxidation; Thermoanalytical analysis.

3.1. Introduction

The content of phenols in food and beverages is correlated with a reduced incidence of several diseases. There is a considerable amount of epidemiological evidences indicating to a relation between fruit and vegetables rich diets in and a decreased risk of certain forms of cancer. The role of polyphenolic compounds from higher plants as antioxidants, antimutagenic, antiinflammatory and antimicrobial agents is widely recognized (Lee et al., 1995; Hatano et al., 2002). The health impact of antioxidants in foods and the hazardous effects of synthetic preservatives have led to an active research in the field of natural antioxidants.

Previous studies of lipophilic extracts from foliage and wood of yellow birch (*Betula alleghaniensis*) have proved the presence of bioactive molecules in high concentrations (Lavoie & Stevanovic 2005; Lavoie & Stevanovic 2006). These results demonstrate that the extracts of yellow birch are rich in phenolic compounds and as such could be used as sources of natural antioxidants.

There are several tests to measure antioxidant capacity. Usually these methods are based on the oxidation of a more or less complex substrate or on the reactivity towards reference free radicals (Huang et al., 2005). Sanchez-Moreno and Larrauri (1998) classified antioxidant tests in food and biological system in two groups. The first group includes assays used to evaluate lipid peroxidation in lipoproteins or lipids in which the degree of oxidation inhibition under standard conditions is measured. The second group is formed by assays measuring the free radical scavenging capacity.

The tests most commonly used to measure the free radical scavenging capacity are those involving chromogen compounds of a radical nature. The presence of antioxidants leads to the disappearance of these radical chromogens. Generally, these methods are preferred for their sensitivity and speed. The free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) is widely used

for these purposes. It is a stable free radical; easy to manipulate. The antioxidant activity is generally reported as the concentration of antioxidant needed to decrease by 50 % the initial DPPH concentration at a fixed time (Cuvelier et al., 1992). Other methods measure the constant rate of the DPPH reaction in the presence of antioxidants (Diouf et al., 2006; Rousseau-Richard et al., 1990). These methods are commonly performed at room temperature.

Lipid peroxidation at higher temperatures can be evaluated by accelerated oxidation stability tests. Such tests are often highly relevant if the conditions used in the oxidation tests are similar to the ones the oils and fats encounter during processing or use (Antolovich et al., 2002). The effect of natural and synthetic antioxidants is evaluated upon inhibition of lipid oxidation, by determination of peroxide concentrations or by measurement of rate of oxygen consumption.

Thermoanalytical methods have been used to characterize the antioxidant behavior at high temperatures. Kowalski (1991) used differential scanning calorimetry (DSC) to evaluate the antioxidant activity of vegetable oils and lard by heating the samples up to 360 °C. Two samples of highly rancid rapeseed and sunflower oils inhibited with BHT and propyl gallate were also studied. Litwinienko et al (1997) investigated the kinetic features of linoleic acid thermoxidation under DSC non-isothermal conditions (50-300 °C). The authors found that DSC is a relatively simple, convenient and fast method to screen the efficiency of phenol antioxidants. This technique was also used to measure the efficiency of various commercial hindered phenol antioxidants in squalene (Breese et al., 2000).

In spite of being a well known method to study the oxygen absorption in the polymer industry, thermogravimetric analysis (TGA) has received limited attention for evaluating oxidative stability in the food industry. Nieschlag et al (1974) estimated the oxidative stability of crambe oils samples by TGA. The weight change in an oxygen environment was monitored

under controlled heating rates. An estimation of oil resistance to oxidation was obtained by measuring the percent weight gain due to oxidation. Gennaro et al (1998) used TGA to estimate the effect of antioxidants on oxidative stability of virgin olive oil. This technique was also used by Van-Aardt et al (2004) to study the oxidative stability of various edible oils and triacylglycerides and the effect of α -tocopherol, ascorbic acid and synthetic antioxidants in trinolein. TGA showed high reproducibility and proved to be a valuable technique to evaluate oxidative differences between oils and fats with and without antioxidants. Rudnik et al (2001) studied the oxidative stability of linseed oil by the classical tests based on determination of peroxide value by Rancimat and thermoanalytical methods. The results obtained by TG and DSC matched those obtained using the peroxide value and Rancimat methods. Therefore they concluded that thermoanalytical methods can be suitable for the prediction of oxidative stability of vegetable oils and for evaluating the antioxidant efficiency of food additives.

Because most of natural antioxidants and phytochemicals are multifunctional compounds, several methods covering various oxidation conditions should be tested to evaluate their antioxidant properties (Frankel & Meyer, 2000). That explain why the use of several techniques to measure the antioxidant capacity of natural products is becoming a common feature in recent publications (Senevirathne et al., 2006; Mathew & Abraham, 2006).

The aim of this study is to analyse the antioxidant capacity of yellow birch twigs aqueous acetone extract and its fractions by several antioxidant methods and to correlate the results with the total phenol content of the studied extracts.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Chemicals

Folin-Ciocalteu phenol reagent (FCR), gallic acid monohydrate, sodium carbonate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,6-di-ter-butyl-4-methyl phenol (BHT) were

purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The azo-bis-isobutyronitrile (AIBN) from Merk and the methyl linoleate (MeL) from Tokyo Kasei Kogyo Co.ltd were used. Petrol ether, t-butyl-methyl ether, ethyl acetate and acetone were obtained from Fisher Scientific Chemicals (Tustin, CA).

3.2.2 Extraction

The extraction and solvent fractionation procedures were performed as described in 2.2.3. As result of these procedures, three different fractions were obtained: t-butyl-methyl ether fraction (TBME_f), ethyl acetate fraction (EA_f) and aqueous fraction (A_f)

3.2.3 Total phenols content

The total phenols content in crude extract and its fractions was determined by the Folin-Ciocalteu method (Singleton & Rossi, 1965). This method uses the Folin reagent diluted 10 times in water and a sodium carbonate solution (75 g.l⁻¹). The samples (0,3 g.l⁻¹) were mixed with Folin reagent and the sodium carbonate solution. The final solution was heated at 50 °C during 10 minutes after which the absorbance at 765 nm was read. A standard curve generated with gallic acid was used for calibration. Total phenol content was expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per grams of extract.

3.2.4 Evaluation of antioxidant capacity

The antioxidant capacity of extracts at ambient temperature was evaluated using two free radical (DPPH) assay approaches. Tests at high temperatures were carried out by thermoanalytical methods.

3.2.4.1 Methods at ambient temperature

a) Kinetic DPPH method

The kinetic DPPH method is one of the most frequently used rapid kinetics techniques to measure antioxidant activity. Small volumes of solutions are transferred by high performance

syringes to a high efficiency mixer. The rate constant is used to estimate the mobility of hydrogen atom from phenol (ArOH) and is used as an estimate of antioxidant capacity (Diouf et al., 2006). With an excess of ArOH, it is easy to measure the pseudo-first order rate constant of the reaction with DPPH.



Methanolic solutions of $2 \cdot 10^{-4}$ M DPPH and 2 g.l^{-1} of extracts were mixed in the “Rapid Kinetics Accessory” SFA-11 (HI-TECH Scientific, SALISBURY, England) and the absorbance of DPPH at 516 nm was monitored. The rate constant of the hydrogen atom transfer pseudo-first order reaction, k_a , was estimated using the kinetic software of UV-visible spectrometer (Varian model Cary 50). These results were verified by the Guggenheim method (Ahmad and Hamer, 1964; Diouf et al., 2006). Higher rate constant values correspond to higher antioxidant capacities.

b) Equilibrium DPPH method

The equilibrium DPPH method is widely used to study the antioxidant activity and consists in measuring the concentration of an extract or compound necessary to reduce by 50 % the initial concentration of DPPH (C_{50}) (Diouf et al., 2006; Mathew & Abraham, 2006). All tests were carried out at equilibrium conditions. A solution of $2 \cdot 10^{-4}$ M of DPPH in methanol was mixed with the studied samples. The reaction progress was monitored following the absorbance at 516 nm for 30 min at 30 °C. The solution color faded as the reaction progressed. The remaining percentage of DPPH (DPPH_R) was calculated as $(\text{DPPH}_R) (\%) = (\text{DPPH}_T) / (\text{DPPH}_0) \times 100$ where (DPPH_T) is the concentration of DPPH at 30 min time and (DPPH_0) is the initial concentration. The percentage of DPPH remaining was plotted versus different concentrations of crude extract and fractions in order to obtain the amount of antioxidant needed to decrease by half the initial DPPH quantity. Lower values of C_{50} indicate higher antioxidant capacity.

3.2.4.2 *Methods applied at high temperatures*

The crude extract and its fractions were placed under vacuum/N₂ flow to dryness and the residue was dissolved in 0.3 ml of methanol to 30 g.l⁻¹ final concentration. Methanol was chosen because it is a good solvent for the polyphenols and it is miscible in methyl linoleate (MeL). The resulting solution was added to 3 g of MeL containing 10⁻² M of AIBN. Preliminary experiments showed that 0.3 ml of pure methanol does not have any effect on MeL oxidation. The equivalent amount of BHT in methanol was used in order to compare the results with those obtained for natural antioxidants.

a) DSC measurements

Differential Scanning Calorimetry (DSC) is commonly used to investigate processes which involve enthalpy changes. Lipid oxidation being an exothermic process, the DSC is a convenient apparatus for recording the heat released. The temperature of the onset point (OIT*_{DSC}) is determined as the temperature at which the oxidation process begins. For a constant value of heating rate the OIT*_{DSC} is characteristic for the given substance.

A Mettler Toledo DSC 822° was used to carry out the tests. All samples were studied at a heating rate of 2 °C.min⁻¹ from 25 to 170 °C under an oxygen flow of 50 ml.min⁻¹. 5.5 ± 0.5 mg of each sample were analysed in a standard 40 µl aluminium pan. OIT*_{DSC} can be determined by two procedures: the first one, using the tangents intersection point in the thermograms and the second one from the second derivative of the first peak (Breese et al., 2000). Results obtained by the two procedures were very close, but the second derivative data were less scattered and therefore this method has been chosen for the OIT*_{DSC} determinations. Higher values of OIT*_{DSC} correspond to samples with higher oxidation stability.

b) Thermogravimetric method

Thermogravimetric analysis (TGA) is also used to estimate the resistance of certain materials to oxidation. The weight gained by the sample as a result of oxygen uptake can be used as a

good indicator of oxidation stability. This technique also allows measuring the onset temperature at which oxygen uptake starts (OIT*_{TGA}).

The experimental conditions used to prepare the studied samples were similar to those employed in the DSC method. All tests were performed in the presence of oxygen and nitrogen at flow rates of 50 ml.min⁻¹ using a Mettler Toledo thermobalance (TGA 850, TGA/SDTA 851^o). Measurements were performed using approximately 20 mg of samples at a heating rate of 2 °C.min⁻¹ from 25 to 170 °C. All tests were performed three times.

The mass gained due to oxygen uptake was calculated as follows: $\Delta_t = (TG_t O_2 - TG_t N_2)$ (mass %) where $TG_t O_2$ is the mass percent of sample in time t under O_2 environment and $TG_t N_2$ corresponds to mass percent of sample in time t but under N_2 environment. OIT*_{TGA} represents the temperature at which the mass starts to increase and was determined from the tangents intersection point in the mass gain Δ (mass %) curve. Higher values of OIT*_{TGA} and lower oxygen mass gains correspond to samples with more resistance to oxidation.

3.2.5 Statistical analysis

The experimental results are expressed as means \pm SD of three measurements. The results were processed using Microsoft Excel 2003 and the data were analysed by an analysis of variance (ANOVA) ($p \leq 0.05$) and means separated by Duncan test. Results were processed by SAS program 8.2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC., USA).

3.3 Results and discussion

3.3.1 Total phenols content

The total phenols content in crude extract and in all fractions determined by the Folin-Ciocalteu method are presented in Table 3.1. This parameter was solvent dependant. The most polar fractions (EA_f and A_f) exhibited the larger phenol contents followed by the crude extract and $TBME_f$ respectively. Senevirathne et al (2006) studied the antioxidant potential of

different fractions of methanolic extract of *Ecklonia cava* and also reported the total phenols content by the Folin-Ciocalteu method. Among the organic solvent fractions, ethyl acetate fraction also exhibited the highest level of total phenols. Organic chloroform fraction and methanolic extract also showed high content of phenolic compounds.

It is clear that different solvents allow extracting different kinds of phenolic compounds. Thus, the most polar fractions should contain a higher amount of hydrophilic phenols and condensed tannins while TBME_f may include the hydrophobic phenolic compounds of low-molecular-weight. Phenolic compounds of both kinds are present in crude extract.

3.3.2 Antioxidant properties at ambient temperature

The results obtained for k_a and C_{50} determination by the DPPH reaction in the presence of crude extract, its fractions and BHT are presented in Table 3.1. It can be observed that the antioxidant activities vary widely between the fractions. Results of kinetic DPPH method show that aqueous fraction exhibited the most rapid reaction rate followed by EA_f and BHT which exhibited equivalent results. Crude extract and TBME_f were less efficient. By the equilibrium method, the BHT and EA_f were the samples with the best antioxidant activity followed by A_f, crude extract and TBME_f respectively. In general, fractions with higher content of phenols showed better antioxidant capacities by both of methods (figure 3.1). These results agree with those of Senevirathne et al (2006) that found an increase in DPPH radical scavenging capacity towards the ethyl acetate fraction with increasing the solvent polarity and the content of total phenols.

Table 3.1. Antioxidant capacities of crude extract, BHT and different fractions of *Betula alleganiensis* twigs.

	Total phenols content (mg.g ⁻¹)	Antioxidant capacity			
		DPPH k _a (min ⁻¹)	DPPH C ₅₀ (mg.l ⁻¹)	OIT* _{DSC} (°C)	OIT* _{TGA} (°C)
Crude extract	94.4	1.8 ^c	57.5 ^b	122.0 ^b	94.6 ^b
TBME _f	59.6	0.4 ^d	140.5 ^a	122.5 ^b	96.8 ^b
EA _f	226.8	2.0 ^b	19.8 ^d	120.9 ^{b,c}	90.2 ^{b,c}
A _f	99.9	2.3 ^a	37.7 ^c	119.1 ^{c,d}	89.4 ^{b,c}
BHT	-	1.9 ^{b,c}	8.4 ^e	140.4 ^a	144.9 ^a
MeL	-	-	-	118.3 ^d	85.4 ^c

Each value in table represents the means for three determinations. Different superscript letters mean significant differences ($p \leq 0.05$). TBME_f = ter-butyl-methylether fraction; EA_f = ethyl acetate fraction; A_f = aqueous fraction; BHT = 2,6-di-ter-butyl-4-methyl phenol; MeL = methyl linoleate.

However, though the A_f exhibited less than half phenols than EA_f, its rate constant was higher. This behavior can be explained by the nature of phenols in this fraction allowing a higher mobility of hydrogen atom from phenols. In fact, nature of phenols is also a factor influencing the antioxidant activity.

Brand-Williams et al (1995) related the activity of a potential antioxidant with its structural characteristics. They suggested that for certain phenolic compounds a rapid reaction with DPPH corresponded to the number of available hydroxyl groups. Goupy et al (2003) suggested that the ability of different dietary polyphenols to transfer labile H atoms to DPPH radical is strongly related to their structural characteristics. They found that in some cases this ability is favored by substitutions in the aromatic rings. The authors also confirmed that for caffeic acid, chlorogenic acid and some oligomers, the rate constants of for first H atom abstraction by DPPH is sensitive to steric hindrance. The overall mechanism in the case of natural extracts is usually more complex due to interaction of different compounds. Thus, the

antioxidant capacity of natural extracts should be attributed to the total phenols content, the functional groups of these phenols and to the synergism between molecules.

The reaction mechanism between BHT and DPPH has been described by Brand-Williams et al (1995). This mechanism involves the donation of second hydrogen following electron delocalization onto the para-substituted group. McGowan et al (1959) also demonstrated that compounds with a hydroxyl group sterically hindered by a t-butyl group present higher antioxidative efficiency.

The results obtained by equilibrium DPPH method show a better correlation with total phenol contents than those obtained by kinetic DPPH method (Fig. 3.1). The Folin Ciocalteu assay is commonly used for the determination of the total phenols content but measures a sample's reducing capacity. This is not surprising if one considers the similarity of chemistry behind equilibrium DPPH method and Folin Ciocalteu assay. One can thus consider that kinetic method evaluates antiradical activity, while equilibrium method is more representative for the evaluation of antioxidant activity: the hydrogen atom transfer is a necessary but not sufficient condition to confer a compound the antioxidant effectiveness.

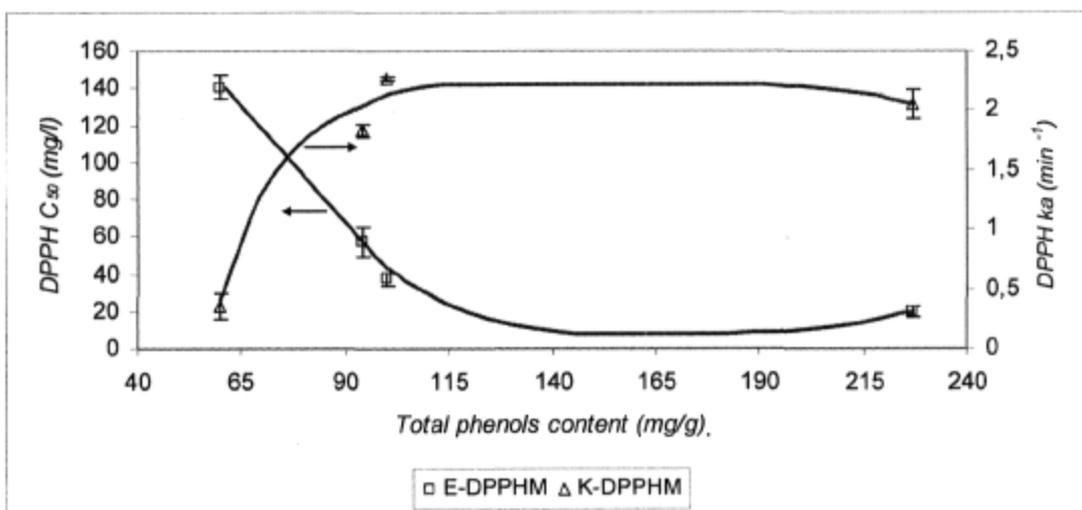


Figure 3.1. Correlation between total phenols content and the k_a obtained by kinetic DPPH method (K-DPPHM) and C_{50} obtained by equilibrium DPPH method (E-DPPHM).

Kinetic DPPH method can be used to evaluate the reactivity of antioxidants with DPPH. Hence, it is more suitable for determining the antiradical activity. However, results of equilibrium method are partly influenced by the involvement of oxidative transformation products of the antioxidants. In fact, it takes into account not only the reactions that lead to hydrogen atom transfer but also the effect of reversible reactions. Therefore this method seems to be better suited for the evaluation of the antioxidant capacity of samples at ambient conditions.

3.3.3 Methods at high temperatures

3.3.3.1 DSC measurements

In the DSC method, the MeL oxidation was observed as a sharp increase in the energy flow due to the exothermic nature of the oxidation reactions. Methyl linoleate oxidation is a radical process which proceeds via a chain reaction including induction, propagation and termination steps (figure 3.2). Induction period is a preparatory stage in which the chemical compounds needed for the full development of oxidation are formed. This period is considered as a relative measure of oxidative stability. During the induction period, alkyl radicals are formed which undergo reaction with oxygen molecules to form hydroperoxides and peroxide radicals during the propagation phase. Termination proceeds via association of two radicals to form a stable adduct (Brand-Williams et al., 1995).

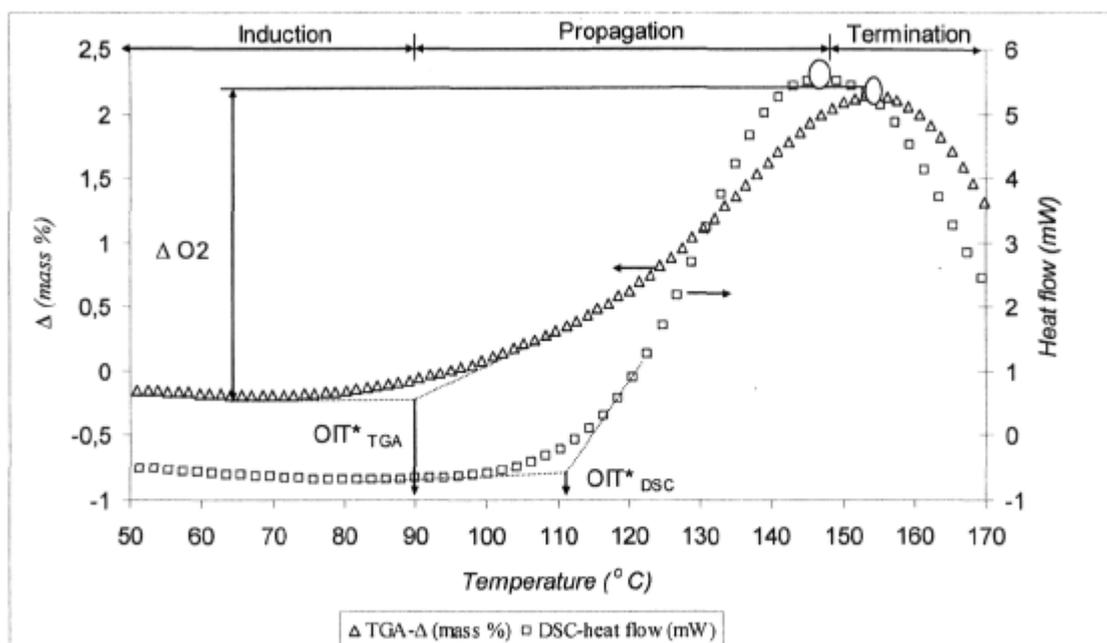


Figure 3.2. Typical thermoanalytical curves obtained for methyl linoleate oxidation by DSC and TGA methods. OIT^*_{TGA} = onset temperature by TGA method; OIT^*_{DSC} = onset temperature by DSC method; ΔO_2 = maximum oxygen gain by TGA method.

OIT^*_{DSC} values determined by the DSC method are presented in Table 3.1. Among samples, the commercial antioxidant offers the most important protection against thermal oxidation of MeL. Only the TBME_f and EA_f as well as the crude extract exhibited significant antioxidant effects. These results agree with those obtained by Kulisic et al (2006) who compared the antioxidant activity of natural extracts from oregano, thyme and wild thyme with BHT using several antioxidant methods. The authors also found an enhanced antioxidant capacity of BHT compared to natural samples by Rancimat assay at 100 °C. It is clear that BHT is a pure compound; therefore it can act without interference of other substances. In contrast, in the case of natural samples the chemical complexity and the relative dilution of active substances in the presence of others, less active or inactive, can influence the antioxidant activity. Additionally, the temperature effect on the integrity of molecules in the extracts and the lower

affinity of natural compounds for MeL when the solvent is evaporated constitute other factors which could explain the lower antioxidant capacity of the studied extracts.

The results obtained by the DSC method differ from those obtained by DPPH methods at room temperature but are similar to some results reported in the literature. Brand-Williams et al (1995) compared the antiradical activities of various antioxidants, including isoascorbic and ascorbic acids by DPPH test. The authors also determined the activity of samples by an accelerated autoxidation test using MeL at 110 °C under an oxygen saturated atmosphere. Ascorbic acid and isoascorbic acid reacted rapidly with DPPH; however they showed no or little antioxidant activity in the MeL test at high temperature. The authors explained these results as a consequence of harsh conditions of MeL test combined with a poor affinity of the substrate for the solvent. In general, it is known that the protection predicted at high temperatures for an antioxidant will be usually less than that found at lower temperatures.

In spite of the complications of tests using elevated temperatures, they are important since food processing involves heat (e.g. deep-fat frying and microwave heating) and lipid oxidation is one of the major deteriorative reactions of heated oils resulting in a significant loss of quality.

3.3.3.2 Thermogravimetric method

Figure 3.2 represents a typical curve of MeL oxidation in which an induction period characterized by a minimal mass change is followed by a rapid mass increases due to oxygen uptake. A final temperature (T_f) at which the oxygen mass gained reaches a maximum (Δ mass, %) can be clearly identified. The maximum mass gained is known to be an important index of lipid autoxidation extent (Gennaro et al., 1998). The sample stops adsorbing oxygen at temperature beyond T_f .

Results of onset temperatures determination are shown in Table 3.1. The OIT^*_{TGA} values obtained for A_f and EA_f are not significantly different from those obtained for MeL. Among

samples, BHT also shows the most important protection against thermoxidation of MeL followed by TBME_f and crude extract. As the oxidation conditions are similar to those used in DSC measurements, these results can be explained using the same argumentations.

The results obtained by measuring weight gain percent as a function of oxygen uptake are presented in Figure 3.3. It is interesting to note that while the tested natural samples show less weight gain than MeL, BHT reached a greater weight gain. Even, it was impossible to observe the point of maximum gain at the examined temperatures intervals. It is supposed that samples containing BHT should continue gaining weight at higher temperatures. In fact, it can be noted that even if the BHT addition increases significantly the induction oxidation temperature compared to MeL alone, it tends to lose its protective action in further steps of oxidation. This effect is contrary to expected results if one only analyses the onset of temperature. In fact, Gennaro et al (1998) found similar results for BHT and caffeic acid in olive oil stability. These two antioxidants caused only an increase of onset temperature showing in some cases an increase or no variations in Δ % values.

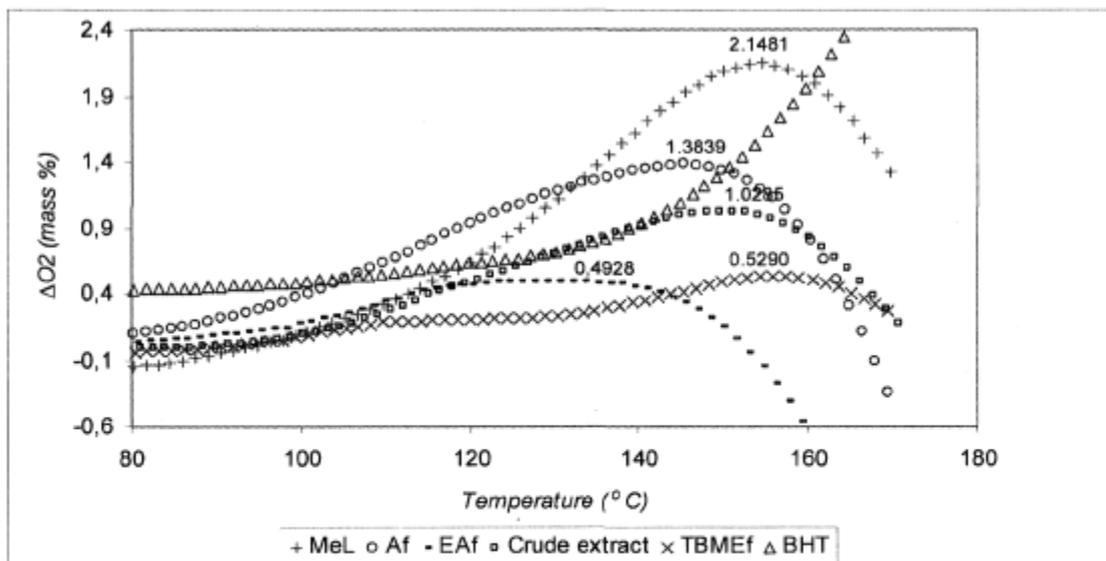


Figure 3.3 Comparison of methyl linoleate oxidation with and without antioxidants.

MeL= methyl linoleate; Af = aqueous fraction; EAf = ethyl acetate fraction; TBMEf = ter-butyl-methylether fraction; BHT = 2,6-di-ter-butyl-4-methyl phenol.

In spite of the lower antioxidant capacity of natural extracts than BHT as determined by thermoanalytical methods, less polar fractions exhibited better antioxidant behaviours than polar fractions. These results contrast with the “polar paradox” theory described by Porter (1993). According to this paradox, lipophilic antioxidants are more active in oil-in-water emulsions whereas polar antioxidants are more active in bulk oil systems. Other authors have found similar problems to evaluate their results according this theory. Torres de Pinedo et al (2007) investigated the structure-activity relationships of synthetic phenolic-based derivatives as potential antioxidants by Rancimat method at 120 °C. Neither these authors found a clear correlation between the polarity of the compounds and their radical-scavenging activity. Khan and Shahidi (2000) also reported that the behaviour of endogenous antioxidants in borage and evening primrose oil-in-water emulsions was very difficult to evaluate according to this theory. In fact, there is only a limited knowledge on how partitioning of natural extracts influence the antioxidant effectiveness in the bulk oils and heterophasic systems at high temperatures. The majority of the investigations taking into account this theory uses the temperatures below 60 °C and employs synthetic pure compounds or phenolic compounds isolated from natural extracts.

Results also show that there is no correlation between the OIT*_{TGA} and OIT*_{DSC} and the phenols content determined by the Folin-Ciocalteu method. In fact, among the natural samples, the ether fraction and the crude extract possess less phenols and yet their addition causes the greatest onset temperatures. These results suggest that not only the amount of phenols in samples is important to evaluate the antioxidant capacity in accelerated conditions, but other factors like their susceptibility at high temperatures and their affinity towards substrate have to be taken into account to explain the antioxidant capacity.

The tendencies of dynamical TG results are well correlated with those obtained by dynamical DSC measurements (Figure 3.4). However, OIT^*_{TGA} values are generally lower than OIT^*_{DSC} . DSC monitors changes in enthalpy while TGA measures the mass gain as a function of oxygen uptake. These processes are associated, but there is certain delay between the absorption of oxygen, measured by TG, and the moment at which the oxidation reactions release energy as measured by DSC. This delay is controlled by the rate of oxidation reactions and by the response time of DSC instruments.

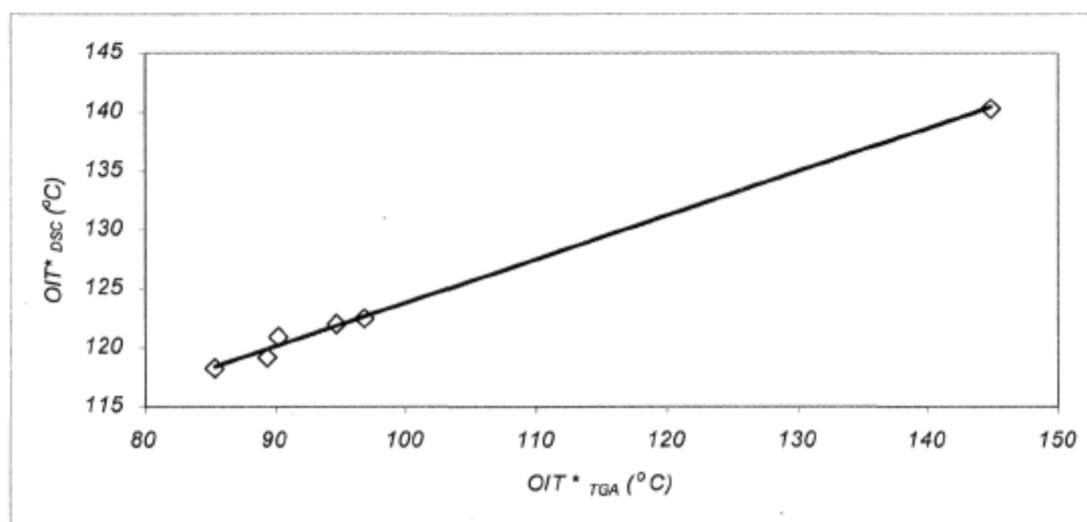


Figure 3.4. Correlation between DSC and TGA methods.

Results of this study demonstrate that the TGA is a suitable test for estimating the antioxidant capacity in the induction, propagation and termination period. So it can be used to study the protection of antioxidants during the whole oxidation.

3.4 Conclusions

Results of this work confirm that the antioxidant capacity depends on the method and test conditions used. It is clear that the activity and ranking of different antioxidants depend on whether they are tested at high or low temperatures. Oxidation mechanism can change at different temperatures.

Antioxidant activity is not necessarily correlated with high amounts of phenolic compounds. Total phenolic content measured by the Folin-Ciocalteu procedure does not give a full idea of the nature of the phenolic constituents in the extracts. Thus, the antioxidant capacity of an extract cannot be predicted solely on the basis of this determination.

On the basis of this study, polar fractions exhibited better antioxidant behaviors at low temperatures. On the contrary, less polar fractions showed enhanced antioxidant capacities at high temperatures. BHT showed the best general antioxidant behavior, however regulations specify a limited maximum of its addition to fats and oils. Natural antioxidants are generally recognized as safe when used in accordance with good manufacturing practice, and therefore are not limited.

These results are only a first estimate of the possibilities of the crude extract and fractions of *Betula alleghaniensis* Britton twigs extracts applications as antioxidants under certain conditions. Further studies are needed to confirm the antioxidant effects at different conditions. To utilize crude extract and fractions as a source of natural antioxidants further characterizations of the phenolic composition are required.

Acknowledgements

The authors are very grateful to the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada for the financial support to this project (research grant to TS) and to Mr. Yves Bédard for his technical advices.

Conclusions générales

Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de faire une caractérisation chimique des extraits polaires des ramilles du bouleau jaune. La teneur en lignine a été déterminée et on a constaté que les valeurs obtenues sont très proches de celles rapportées pour le bouleau jaune et pour d'autres essences appartenant au même genre. En outre, huit constituants phénoliques ont été identifiés dans les extraits étudiés parmi lesquels ont été l'epicatéchine, l'acide salicylique, le thymol, le salidroside et l'eugénol les plus intéressants au niveau de leur bioactivité. Ces résultats et ceux des études précédentes permettent de confirmer que le bouleau jaune peut être considéré comme une plante médicinale.

Cette recherche apporte une nouvelle connaissance concernant le profil phénolique du bouleau jaune. Ainsi, sept composés phénoliques parmi lesquels deux nouveaux pour le genre *Betula*, retrouvés dans cette espèce sont décrits pour la première fois. Cependant, dans les chromatogrammes analysés il y avait des pics importants qui n'ont pas été reconnus. L'utilisation d'autres standards, notamment des composés tels que le bétuloside, le platyphylloside, le rhododendrin, l'apigenin et certains types de lignanes, souvent retrouvés chez les bouleaux, pourront donner d'autres informations concernant le modèle phénolique présent dans cette essence. De plus, l'emploi de procédures d'extraction diverses utilisant des solvants de polarité différente, en combinaison à d'autres techniques d'identification chimique, pourrait apporter des résultats intéressants.

Concernant l'activité antioxydante des extraits de ramilles du bouleau jaune, les résultats ont montré que l'activité antioxydante a varié en fonction des conditions utilisées durant les tests d'oxydation. L'influence de la température a été un facteur particulièrement important, provoquant de fortes différences par rapport au comportement antioxydant des extraits analysés.

Même si l'antioxydant commercial a montré un meilleur comportement général dans tous les tests, les extraits naturels ont démontré une activité antioxydante adéquate. L'utilisation des antioxydants commerciaux est limitée, car leur addition aux matières grasses et aux huiles est réglementée. Par contre, les antioxydants naturels sont généralement considérés comme étant sécuritaires, surtout s'ils sont utilisés conformément aux bonnes pratiques de fabrication et leur utilisation n'est donc pas limitée.

Les résultats de ce travail ont aussi montré que même si la teneur en phénols totaux déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu donne une idée du potentiel antioxydant des extraits; cette méthode ne peut pas être utilisée pour prédire le comportement antioxydant. En effet, il s'agit d'une méthode générale qui ne donne pas d'information concernant la nature des molécules phénoliques qui se trouvent dans les extraits. Par conséquent, on ne pourra pas établir de relations *a priori* entre la quantité des phénols et l'effectivité des antioxydants dans toutes les conditions employées durant les tests d'oxydation.

Bien que les résultats présentés dans cette étude apportent des éléments concernant les possibilités des extraits du bouleau jaune comme antioxydants pour l'industrie pharmaceutique, alimentaire ou cosmétique, d'autres études en utilisant des systèmes hétérophasiques dans d'autres conditions doivent être menées afin de viser avec plus de précision leurs possibles applications. Par ailleurs, la détermination de l'innocuité des extraits demeure une exigence très importante pour leur utilisation future.

Bibliographie

- Abdulin, I.F., Turova, E.N., Gaisina, G. Kh., Budinok, G.K. 2002. *Use of electrogenerated bromine for estimating the total antioxidant capacity of plant raw materials and plant-based medicinal preparation.* Journal of Analytical Chemistry. 57 (6): 557-560
- Agarwal, R., Agarwal, C., Ichikawa, H., Singh, R.P., Aggarwal, B.B. 2006. *Anticancer potential of silymarin: From bench to bed side.* Anticancer research. 26 (6B): 4457-4498.
- Ahmad, M. et Hamer, J. 1964. *A pseudo-First-Order-Second-Order Kinetics Experiment. An illustration of the Guggenheim method.* Journal of Chemical Education, 41: 249-250.
- Amarowicz, R., Naczek, M., Shahidi, F. 2000. *Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 2755-2759
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D. 2000. *Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits.* The Analyst. 125: 989-1009.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonal, S., Robards, K. 2002. *Methods for testing antioxidant activity.* The Analyst. 127: 183-198
- Al-Bandak, G. et Oreopoulou, V. 2007. *Antioxidant properties and composition of Majorana syriaca extracts.* European Journal of Lipid science and technology. 109 (3): 247-255.
- Baldwin, I.T., Schultz, J.C., Ward, D. 1987. *Patterns and sources of leaf tannins variation in yellow birch (Betula alleghaniensis) and sugar maple (Acer saccharum).* Journal of Chemical Ecology. 13 (5): 1069-1078
- Bandoniene, D., Pukalskas, A., Venskutonis, P.R., Gruzdiene, D. 2000. *Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil.* Food Research International. 33: 785-791

- Barrera-Arellano D. et Steves, W. 1989. *Atividade antioxidante de substancias fenolicas em sistemas aquoso e lipidito*. Cienc. Tecnol. Aliment. 9:107-114
- Barros-Monteiro, M.V., Rocha de Melo-Leite, A.K., Medeiros-Bertini L., Maia de Morais, S., Sousa-Nunes-Pinheiro, D.C. 2007. *Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of Lippia sidoides Cham. Leaves*. Journal of Ethnopharmacology. 111:378–382
- Bloor, S.J. 2002 *Overview of methods for analysis and identification of flavonoids*. Methods in enzymology. 335: 3-17
- Bocco A., Cuvelier, H., Richard, H., Berset, C. 1998. *Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 2123-2129
- Bogdanov, S. 1989. *Determination of pinocembrin in honey using HPLC*. J. Apic. Res. 28: 55-57.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie. 30: 609-615.
- Breese, K.D., Lamèthe, J.F. and DeArmitt, C. 2000. *Improving synthetic hindered phenol antioxidants: learning from vitamin E*. Polymer Degradation and Stability. 70: 89-96.
- Brolis, M.; Gabetta, B.; Fuzzati, N.; Pace, R.; Panzeri, F.; Peterlongo, F. 1998. *Identification by high-performance liquid chromatography diode array detections mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography UV absorbance detection of active constituents of Hypericum perforatum*. J. Chromatogr. A. 825: 9-16.

- Budic-Letoc, I., Lovric, T., Pezo I., Klujzuric, J.G. 2005. *Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the babic grape variety*. Food Technology and Biotechnology. 43 (1): 47-53.
- Calliste, C.-A., P Trouillas, D.-P. Allais, A. Simon, J.-L Duroux. 2001. *Free Radical Scavenging Activities Measured by Electron Spin Resonance Spectroscopy and B16 Cell Antiproliferative Behaviors of Seven Plants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(7): 3321-3327
- Can-Baser, K.H., Demirci, B. 2007. *Studies on Betula essential oils*. ARKIVOC. VII. 335-348.
- Cao, G., Russell, R.M., Lischner, N., Prior, R.L. 1998. *Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women*. J.Nutr. 128: 2383-2390
- Cao, L.L., Du, G.H., Wang, M.W. 2006. *The effect of salidroside on cell damage induced by glutamate and intracellular free calcium in PC12 cells*. Journal of Asian natural products research. 8 (1-2): 159-165
- Celermajer, D.S., Sorensen, K.E., Gooch, V.M., Spiegelhalter, D.J., Miller, O.I., Sullivan, I.D., Lloyd, J.K., Deanfield, J.E. 1992. *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. Lancet. 340: 1111-1115
- Chafer, A., Pascual-Martí, C., Salvador, A., Berna, A. 2005. *Supercritical fluid extraction and HPLC determination of relevant polyphenolic compounds in grape skin*. Journal of Separation Sciences. 28 (16): 2050-2056
- Chandler, R.F., Freeman, L., Hooper, S.N. 1979. *Herbal remedies of the maritime Indians*. Journal of Ethnopharmacology. 1:49-68

- Chantalat, J., Chen, T., Stephens, T.J., Pappert, A. S. 2007. *Salicylic acid microgel complex provides significant acne benefits in foaming cleanser formulations*. Journal of the American academy of dermatology. 56 (2): AB24-AB24 Suppl. S
- Chen, J.H., Ho, C.T. 1997. *Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 2374-2378
- Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P., Dartigues, J.F. 2000. *Intake of flavonoids and risk of dementia*. Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale. Bordeaux. Fr. Eur. J. Epidemiol. 16(4) : 357-363.
- Corbo, M.R., Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M., Guerzoni, M.E. 2000. *Effects of Hexanal, trans-2-Hexenal, and Storage Temperature on Shelf Life of Fresh Sliced Apples*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 2401-2408
- Crozier, A., Lean, M. E. J., McDonald, M. S., Black, C. 1997. *Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 590-595.
- Csiklusna di Kiss, G.A., Forga'cs, E., Cserha'ti, T., Mota, T., Morais, H., Ramos, A. 2000. *Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (Capsicum annum L.) powders*. Journal of Chromatography A. 889: 41-49
- Cuvelier, M.E., Richard, H. and Berset, C. 1992. *Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.56: 324-325.
- Daigle, D. J., Conkerton, E. J. 1983 *Analysis of flavonoids by HPLC*. J. Liq. Chromatogr. 6: 105-118.
- Daigle, D. J.; Conkerton, E. J. 1988. *Analysis of flavonoids by HPLC: an update*. J. Liq. Chromatogr. 11: 309-325.

- Dallenbach-Toelke, K., Nyiredy, S., Gross, G. A., et Sticher, O. 1986. *Flavonoid glycosides from Betula pubescens and Betula pendula*. Journal of Natural Products. 49: 1155-1156
- Dalluge, J. J., Nelson, B. C., Brown Thomas, J., Sander, L. C. 1998. *Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. A. 793: 265-274.
- Da Silva, E.J.A., Oliveira, A.B., Lapa, A.J. 1994. *Pharmacological evaluation of the antiinflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice*. J. Pharm. Pharmacol. 46 (2): 118-122.
- Day, A.J et Morgan, M.R.A.. 2003. *Methods of polyphenol extraction from Biological fluids and tissues*. In Methods in polyphenol analysis. Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge: pp17-47
- De Cooman, L., Everaert, E., De Keukeleire, D. 1998. *Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties*. Phytochem. Anal. 9:145-150.
- De Leeuw, J., Tank, B., Bjerring, P.J., Koetsveld, S., Neumann, M. 2006. *Concomitant treatment of psoriasis of the hands and feet with pulsed dye laser and topical calcipotriol, salicylic acid, or both: A prospective open study in 41 patients*. Journal of the American academy of dermatology. 54 (2): 266-271
- De Pascual-Teresa, S., Treutter, D., Rivas-Gonzalo, J. C., Santos-Buelga, C. 1998. *Analysis of flavonols in beverages by high performance liquid chromatography with chemical reaction detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 4209-4213.
- De la Rosa T.M, R Julkunen-Tiito, T Lehto, PJ Aphalo. 2001. *Secondary metabolites and nutrient concentrations in silver birch seedlings under five levels of daily UV-B exposure and two relative nutrient addition rates*. New Phytologist. 150:121-131

- De Zwart, L.L., Venhorst, J., Groot, M., Commandeur, J.N.M., Hermanns, A., Meerman, J.H.M., Van Baar, B.L.M., Vermeulen, N.P.E. 1997. *Simultaneous determination of eight lipid peroxidation degradation products in urine of rats treated with carbon tetrachloride using gas chromatography with electron-capture detection*. Journal of Chromatography B. 694: 277-287
- Diouf, P.N. 2003. *Étude comparative de méthodes de mesure de l'activité antioxydante. Applications aux extractibles de bois. Liens avec la stabilité de la couleur du bois*. Thèse doctorat. Université Henri Poincaré. France.
- Diouf, P.N., Merlin, A. and Perrin, D. 2006. *Antioxidant properties of wood extracts and colour stability of woods*. Annals of Forest Science. 63 : 525-534.
- Direction du développement de l'industrie des produits forestiers-DDIPF. 2003. Profil des produits forestiers deuxième transformation. Approvisionnement en bois massif pour l'industrie québécoise du meuble.
- Druzynska, B., Stepniewska, A., Wolosiak, R. 2007. *The influence of time and type of solvent on the efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts*. Acta Scientiarum Polonorum. Technologie Alimentaria. 6 (1): 27-36.
- Duke J.A. 1983. Handbook of Energy Crops. electronic publication on the NewCROPS web site
- Engelhardt, U.H., Finger, A., Kuhr, S. 1993. *Determination of flavone C-glycosides in tea*. Z Lebensm Unters Forsch. 197: 239-244
- Escarpa, A., Morales, M.D et Gonzalez, M.C. 2002. *Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compounds using real samples by high-performance liquid chromatography–diode-array detection*. Analytica Chimica Acta. 460: 61-72.

- Escribano-Bailón et Santos-Buelga. 2003. *Polyphenols extraction from foods*. In Methods in polyphenol analysis. Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge. pp1-16
- Ewald, C., Fjelkner-Modig, S., Johansson, K., Sjöholm, I., Akesson, B. 1999. *Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas*. Food Chemistry. 64: 231-235.
- Faccoli, M., Schlyter, F. 2007. *Conifer phenolic resistance markers are bark beetle antifeedant and semiochemicals*. Agricultural and forest entomology. 9 (3): 237-245
- Fallico, B., Lanza, M.C., Maccarone, E., Nicolosi-Asmundo, C., Rapisarda, P. 1996. *Role of hydroxycinnamic acids and vinylphenols in the flavor alteration of blood orange juices*. Journal of Food Chemistry. 44:2654-2657
- Fengel, D., Wegener, G. 1984 *Wood chemistry ultrastructure reactions*. Walter de Gruyter. Berlin. New York . p185
- Ferguson, P.J., Kurowska, E., Freeman, D.J., Chambers, A.F., Koropatnick, D.J. 2004. *A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines*. Journal of Nutrition. 134: 1529-1535.
- Flamini, R., Vedova, A.D., Cancian, D., Panighel, A., De Rosso, M. 2007. *GC/MS-positive ion chemical ionization and MS/MS study of volatile benzene compounds in five different woods used in barrel making*. Journal of mass spectrometry. 42:641-646.
- FNAEC (Flora of North America Editorial Committee). Betulaceae, dans *Flora of North America, North of Mexico*, volume 3: *Magnoliophyta: Magnoliidae and Hamamelidae*. [En ligne]. <http://www.efloras.org>
- Food Chemicals Codex. 1972. 2nd ed. Prepared by the Committee on Specifications, Food Chemicals Codex, of the Committee on Food Protection. p. 97. National Academy of Sciences-National Research Council Publ. 1406, Washington, D.C.

- Frankel, E.N. 1985. *Lipid Oxidation: mechanism, products and biological significance*.
J.Am.Oil Chem.Soc. 61: 1908-1917
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P.L. 1995. *Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43: 890-894.
- Frankel, E.N., Huang, S.W., Prior, E., Aeschbach, R. 1996. *Evaluation of Antioxidant Activity of Rosemary Extracts, Carnosol and Carnosic Acid in Bulk Vegetable Oils and Fish Oil and Their Emulsions*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 72:201-208.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. 2000. *The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 1925-1941
- Frenkel, K., Chrzan, K. 1987. *Hydrogen peroxide formation and DNA base modification by tumor promoter-activated polymorphonuclear leukocytes*. Carcinogenesis. 8 (3): 455-460
- Fuchino, H., Tetsuya, S., Nobutoshi, T. 1995. *Chemical evaluation of Betula species in Japan. I. Constituents of Betula ermanii*. Chemical & pharmaceutical bulletin. 43 (11): 1937-1942
- Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M. 1995. *Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation*. American Journal of Clinical Nutrition. 61: 549-554
- Galati, E.M., Monforte, M.T., Kirjavainen, S., Forestieri, A.M., Trovato, A., Tripodo, M.M. 1994. *Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid (Note I): antiinflammatory and analgesic activity*. Farmaco. 40 (11): 709-712.

- Galvez, J., de la Cruz, J.P., Zarzuelo, A. ; Sanchez de la Cuesta, F. 1995. *Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes*. Pharmacology. 51 (2) : 127-133
- Gennaro, L., Piccioli-Boca, A., Modesti, D., Masella, R., Coni, E. 1998. *Effect of biophenols on olive oil stability evaluated by thermogravimetric analysis*. Journal of Agricultural and food chemistry. 46: 4465-4469
- Germano, M.P., D'Angelo, V.D., Biasini, T., Sanogo, R., De Pasquale, R., Catania, S. 2006. *Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from Trichilia emetica*. Vahl. Journal of Ethnopharmacology. 105: 368-373
- Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, L., Fantozzi, P., Scaccini, C. 2000. *Beer increases plasma antioxidant capacity in humans*. J. Nutr.biochem. 11: 76-80
- Gil, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A. 2000. *Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 4581-4589.
- Goetz, G., Fkyerat, A., Metais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., Pont, V. 1999. *Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of Botrytis cinerea stilbene oxidase*. Phytochemistry. 52 (5): 759-767
- Goni, I. et Serrano, J. 2005. *The intake of dietary fiber from grape seeds modifies the antioxidant status in rat cecum*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85: 1877-1881
- Gorostiag-Martino, K et Guyer, D. 2004. *Supercritical fluid extraction of quercetin from onion skins*. Journal of Food Process Engineering. 27:17-28

- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M. and Dangles, O. 2003. *Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfert reactions from dietary polyphenols to DPPH radical*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 615-622.
- Graglia E, R Julkunen-Tiito, G R Shaver. 2001 *Environmental control and intersite variations of phenolics in Betula nana in tundra ecosystems*. New Phytologist. 151: 227-236.
- Gross, G.G. 1992. *Enzymes in the biosynthesis of hydrolyzable tannins*. In Plant Polyphénols, Edited by R.W.Hemingway and P.E. Laks, Plenum Press, New York. pp 95-98
- Haborne, J. B. 1965. *Plant polyphenols-XIV. Characterization of flavonoids glycosides by acidic and enzymic hydrolyses*. Phytochemistry. 4 : 107-120.
- Hadi, M. 2004. *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques*. Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences. Université Louis Pasteur. Strasbourg.
- Halliwell, B., Croos, C.E. 1994. *Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress*. Environ. Health Persp. 102 (10): 5-12
- Halliwell, B et Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. New York. 3rd edn. p119
- Hanawa, F., Shiro, M., et Hayashi, Y. 1997. *Hearthwood constituents of Betula maximowicziana*. Phytochemistry. 45 (3): 589-595
- Hassan, O. et Swet-Fan, L. 2005. *The anti-oxidation potential of polyphenol extract from cocoa leaves on mechanically deboned chicken meat (MDCM)*. Food Science and technology. 38: 315-321
- Hasegawa, S., Berhow, M. A., Fong, C. H. 1996. *Analysis of bitter principles in Citrus*. Modern Methods of Plant Analysis. Springer: New York: Vol. 18, pp 59-80.

- Hatano, T., Miyatake, H., Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H. and al. 2002. *Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects*. *Phytochemistry*. 59, 749-758.
- Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A., Aviram, M. 1997. *Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or Catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 17: 2744-2752
- Hemwimon, S., Pavasant, P., Shotipruk, A. 2007. *Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*. 54: 44-50.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. et Katan, M.B. 1992. *Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 2379-2383
- Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D. 1993. *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study*. *Lancet*. 342 (8878): 1007-1011
- Heydaneck, M.G., McGorin, R.J. 1981. *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy Identification of Volatiles from Rancid Oat Groats*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 29:1093-1095
- Hiltunen, E., Pakkanen, T.T., Alvila, L. 2004. *Phenolic extractives from wood of birch (Betula pendula)*. *Holzforschung*. 58: 326-329.
- Hiltunen, E., Pakkanen, T.T., Alvila, L. 2006. *Phenolic compounds in silver birch (Betula pendula Roth) wood*. *Holzforschung*. 60: 519-527.

- Hosoya, T., Kawamoto, H., Saka, S. 2007. Cellulose-hemicellulose and cellulose-lignin interactions in wood pyrolysis at gasification temperature. *Journal of analytical and applied pyrolysis*. 80 (1): 118-125
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- Huber, D.P.W., Gries, R., Borden, J.H., Pierce, H.D. 2000. *A survey of antennal responses by five species of coniferophagous bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) to bark volatiles of six species of angiosperm trees*. *Chemoecology*. 10: 103-113
- Imanishi, H., Sasaki, Y.F., Ohta, T., Watanabe, M., Kato, T., Shirasu, Y. 1991. *Tea tannin components modify the induction of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice*. *Mutation Res*. 259:79-87
- Jarrige, R. 1995. *Nutrition des ruminants domestiques*. Editions Quae. (En ligne) www.quae.com.
- Jong, P.C. 1993. *An introduction to Betula: its morphology, evolution, classification and distribution, with a survey of recent work*. Proceedings of the IDS Betula Symposium. 2-4 October 1992, 7-18
- Ju, E.M., S.E Lee, H.J Hwang, J.H. Kim. 2004. *Antioxidant and anticancer activity of extract from Betula platyphylla var. japonica*. *Life Sciences*. 74(8): 1013-1026
- Julkunen-Tiito, R., Rousi, M., Bryant, J., Sorsa, S., Keinänen, M., Sikanen, H. 1996. *Chemical diversity of several Betulaceae species: comparison of phenolics and terpenoids in northern birch stems*. *Trees*: 11: 16-22
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kulaja, T.S., Heinonen, M. 1999. *Antioxydant activity of plant extracts containing phenolic compounds*. *Journal of agricultural and food chemistry*. (47) 3954-3962

- Karapimar, M., Esen-Aktug, S. 1987. *Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole*. International Journal of Food Microbiology. 4:161-166
- Kato, R., Nakadate, T., Yamamoto, S., Sugimura, T. 1983. *Inhibition of 12-Otetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition*. Carcinogenesis. 4 (10): 1301-1305
- Kehrer, J.P., Smith, C.V. 1994. *Free radicals in biology: sources, reactivities and roles in the etiology of human diseases*. In: Natural antioxidants. Frei, B.ed.San Diego, Academic Press. 25-62
- Keinanen, M. Julkunen-Tiitto, R. 1998. *High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in Betula pubescens and Betula pendula leaves*. Journal of Chromatography A. 793: 370-377
- Keinänen, M., R Julkunen-Tiitto, M., Rousi, J., Tahvanainen, J. 1999. *Taxonomic implications of phenolic variation in leaves of birch (Betula L.) species*. Biochemical Systematics and Ecology. 27: 243-254
- Khan, M.A. and Shahidi, F. 2000. *Oxidative stability of stripped and nonstripped borage and evening primrose oils and their emulsions in water*. Journal of the American Oil Chemists Society. 77: 963-968.
- Koelsch, C.M., Downes, T.W., Labuza, T.P. 1991. *Hexanal formation via lipid oxidation as a function of oxygen concentration: measurement and kinetics*. Journal of Food Science. 56: 816-820
- Kowalski, B. 1991. *Thermal-oxidative decomposition of edible oils and fats. SDC studies*. Thermochemica Acta. 184: 49-57.

- Krause, M.; Galensa, R. 1991. *High-performance liquid chromatography of diastereomeric flavanone glycosides in Citrus on a α -cyclodextrin-bonded stationary phase (Cyclobond I)*. J.Chromatogr. 588: 41-45.
- Kulicic, T., Dragovic-Uzelac, V. and Milos, M. 2006. *Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme*. Food Technology and Biotechnology. 44: 485-492.
- Kuokkanen, K., Julkunen-Tiito, R., Keinanen, M., Niemela, P., Tahvanainen, J. 2001. *The effect of elevated CO₂ and temperature on the secondary chemistry of Betula pendula seedlings*. Trees. 15:378-384
- Lahtinen, M.L. 2003. *Variation in secondary chemistry within a natural population of birch: effects of genotype, environment and ontogeny*. University of Joensuu, PhD Dissertations in Biology, No:20. ISSN 1457-2486, 98 pp.
- Lahtinen, M., Salminen, J-P., Kapari, L., Lempa, K., Ossipov, V., Sinkkonen, J., Valkama, E., Haukioja, E., Pilaja, K. 2004. *Defensive effect of surface flavonoid aglycones of Betula pubescens leaves against first instar Epirritia autumnata Larvae*. Journal of Chemical Ecology. 30 (11): 2257-2268
- Lahtinen, M., Lempa, K., Salminen, J-P., Pihlaja, K. 2006. *HPLC analysis of leaf surface flavonoids for the preliminary classification of birch species*. Phytochemical analysis. 17: 197-203
- Laitinen M.L., Julkunen-Tiitto, R., Rousi, M. 2000. *Variation in phenolic compounds within a birch (Betula pendula) population*. Journal of Chemical Ecology.26 (7): 1609-1622
- Laitinen ML, R. Julkunen-Tiitto, K Yamaji, J. Heinonen, M Rousi. 2004. *Variation in birch bark secondary chemistry between and within clones: implications for herbivore by hares*. OIKOS. 104:316-326

- Lavoie, J.M. 2005. *Optimisation de l'extraction des triterpènes par ultrasons et identification du contenu moléculaire libre des tissus de bouleau jaune (Betula alleghaniensis)*. Thèse de doctorat. Université Laval, Québec, Canada.
- Lavoie, J.M. and Stevanovic, T. 2005. *Variation of chemical composition of the lipophilic extracts from yellow birch (Betula alleghaniensis) foliage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 4747-4756.
- Lavoie, J.M., Stevanovic, T. 2006. Yield and composition of lipophilic extracts of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) as a function of wood age and aging under industrial conditions. *Holzforschung*. 60: 184-189.
- Lavola, A. 1998. *Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance*. Tree Physiology. 18: 53-58
- Lavola, A., Aphalo, P.J., Lahti, M., Julkunen-Tiito, R. 2003. Nutrient availability and the effect of increasing UV-B radiation on secondary plant compounds in Scot pine. *Environmental and Experimental Botany*. 49: 49-60
- Lee, Y., Howard, L.R. and Villalón, B. 1995. *Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (Capsicum annuum) cultivars*. Journal of Food Science. 60:473-476.
- Leenen, R., Roodenburg, A.J., Tijburg, L.B., Wiseman, S.A. 2000. *A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans*. Eur. J. Clin. Nutri. 54 :87-92
- Le Grand, F., George, G., Akoka, S. 2005. *Natural abundance ²H-ERETIC-NMR authentication of the origin of methyl salicylate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 5125-5129
- Li, J.R., Jiang, Y.M. 2007. *Litchi flavonoids: Isolation, identification and biological activity*. Molecules 12 (4): 745-758

- Limasset, B., Le Doucen, C., Dore, J.Ch., Ojasoo,T., Damon, M., De Paulet, A.C. 1993. *Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils*. *Biochem.Pharm.* 46 (7): 1257-1271
- Litwinienko, G., Kasprzycka-Guttman, T. and Studzinski, M. 1997. *Effects of selected phenol derivatives on the autoxidation of linoleic acid investigated by DSC non-isothermal methods*. *Thermochimica Acta.* 307: 97-106.
- Loponen, J., Lempa,K., Ossipov, V., Kozlov, M.V., Girs, A., Hangasmaa, K., Haukioja, E., Pihlaja, K. 2001. *Patterns in content of phenolic compounds in leaves of mountain birches along a strong pollution gradient*. *Chemosphere.* 45: 291-301.
- Louli, V., Ragoussis, N., Magoulas, K. 2004. *Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products*. *Bioresource technology.* 92 (2): 201-208
- Lundgren, L.N., Pan, H., Theander, O., Erikson, H., Johansson, U., Svenningsson, M. 1995. *Development of a new chemical method for distinguishing between *Betula pendula* and *Betula pubescens* in Sweden*. *Can. J. For.Res.* 25: 1097-1102
- Mammela, P. 2001. *Phenolics in selected European hardwood species by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry*. *The analyst.* 126: 1535-1538
- Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*; Springer-Verlag: New York. pp 250-253.
- Markham, K.R. 1982. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press, London. pp 120-125.
- Marham, K. R. 1989. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 1, Plant Phenolics, ed. J.B Haborne, Academic Press, London, pp. 232

- Mathew, S. and Abraham, T.E. 2006. *Studies on antioxidant activities of cinnamon (Cinnamomum verum) bark extracts, through various in vitro models.* Food Chemistry. 94, 520-528.
- Matsuda, H., Ishikado, A., Nishida, N., Ninomiya, K., Fujiwara, H., Kobayashi, Y., Yoshikawa, M. 1998 . *Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of Betula platyphylla var. japonica.* Bioorganic & medicinal chemistry letters. 8(21): 2939-44
- Matsuoka, H., Duosaki, S., Kurata, N., Homma, T., Nemoto, Y.1993. *Effect of flavor compounds emitted by white birch on the seed-germination of the same plant.* Journal of Plant Nutrition.16 (3): 471-478
- Mattila, P., Kumpulainen, J. 2002. *Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with Diode-Array detection.* Journal of agricultural and food chemistry. 50: 3660-3667
- McGowan, J.C., Powell, T. and Raw, R. 1959. The rates of reaction of α,α -Diphenyl- β -picrilhydrazyl with certain amines and phenols. Journal of Chemical Society. 3103-3110
- Merken, H.M., Beecher, G.R. 2000. *Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review.* Journal of agricultural and food chemistry. 48 (3): 577-599
- Middleton, E.J., Drzewiecki, G. 1984. *Flavonoid inhibition of human basophile histamine release simulated by various agents.* Biochem. Pharmacol. 33 (21): 3333-3338
- Middleton, E.J.1996. *Biological properties of plant flavonoids: an overview.* Int.J.Pharmacol. 34 (5): 344-348

- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinatan, V., Milner, A. 1993. *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates*. Clin.Sci. 84: 407-412
- Ministère de ressources naturelles-MRNF. 2005. *Le bouleau jaune. Arbre emblématique du Québec*. <http://www.mrnfp.gouv.qc.ca/publications/forets/enseignants/bouleau-jaune.pdf>
- Miquel-Becker, E., Niessen, L.R., Skibsted, L.H. 2004. *Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects*. Eur Food Res Technol. 219: 561-571
- Miura, Y., Chiba, T., Tomita, I., Koizumi, H., Miura, S., Umegaki, K., Hara, Y., Ikeda, M., Tomita, T. 2001. *Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice*. Journal of Nutrition. 131: 27-32
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Osawa, T. 1997. *Metabolism of Antioxidant in Lemon Fruit (Citrus limon BURM. f.) by Human Intestinal Bacteria*. Journal of Agricultural and food chemistry. 45:3738-3742
- Mookerje, B.K., Lee, T.P., Logue, G.P., Lippes, H.A., Middleton, E. 1986. *The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses*. Prog.Clin.Biolo.Res. 213: 511-520
- Mouly, P.P, Gaydou, E.M., Arzouyan, C. 1999. *Separation and quantification of orange juices using liquid chromatography of polymethoxylated flavones*. Analysis. 27 (3): 284-288.
- Mukhtar, H., Ahmad, N. 2000. *Tea polyphenols: Prevention of cancer and optimizing health*. American Journal of Clinical Nutrition. 7: 1698S-1702S
- Mun, S. P. et Ku, Ch. S. 2006. *Characterization of low molecular weight polyphenols from pine (Pinus radiata) bark*. Food science and biotechnology 15 (3): 424-430

- Murwanashyaka, J.N., Pakdel, H., Roy, Ch. 2001. *Step-wise and one-step pyrolysis of birch-derived biomass to monitor the evolution of phenols*. Journal of Analytical and Applied pyrolysis. 60: 219-231
- Namgoong, S.Y., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P. 1994. *Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture*. Life Sci. 54 (5): 313-320
- Nergiz, C., Unal, K. 1991. *Effect of Method of Extraction on the Total Polyphenol, 1,2-Diphenol Content and Stability of Virgin Olive Oil*. J.Sci. Food Agric. 56: 79-84
- Nieschlag, H.J., Hagemann, J.W., Rothfus, J.A. 1974. *Rapid Thermogravimetric estimation of oil stability*. Analytical Chemistry. 46: 2215-2217
- Nishino, H., Naito, E., Iwashima, A., Tanaka, K., Matsuura, T., Fujiki, H., Sugimura, T. 1984. *Interaction between quercetin and calcium-calmodulin complex: possible mechanism for anti-tumor-promoting action of the flavonoid*. Gann. 75 (4): 311-316
- Nurmi, K., Ossipov, V., Haukioja, E., Pihlaja, K. 1996. *Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch tress (Betula pubescens spp.tortuosa)*. J.Chem.Ecol. 22 (11): 2023-2040
- Ohashi, H., Kyogoku, T., Ishikawa, T., Kawase, S., Kawai, S. 1999. *Antioxidative activity of tree phenolic constituents I : Radical-capturing reaction of flavon-3-ols with radical initiator*. J. Wood Sci. 45: 53-63
- Ohnishi-Kameyama, M., Yanagida, A., Kanda, T., Nagatal, T. 1997. *Identification of catechin oligomers from apple (Malus pumila cv. Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry*. Rapid communications in Mass Spectrometry. 11: 31-36

- Ossipov, V., Nurmi, K., Loponen, J., Haukioja, E., Pihlaja, K. 1996. *High-performance liquid chromatographic separations and identification of phenolic compounds from leaves of Betula pubescens and Betula pendula*. Journal of Chromatography A. 721: 59-68.
- Palo, R.T. 1984. *Distribution of birch (Betula SPP.), willow (Salix SPP.) and poplar (Populus SPP) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores*. Journal of Chemical Ecology. 10 (3): 499-520
- Palo, T.R., Sunnerheim, K. et Theander, O. 1985. *Seasonal variation of phenols, crude protein and cell wall content of birch (Betula pendula Roth) in relation to ruminant in vitro digestibility*. Oecologia. 65:314-318
- Pan, H. et Lundgren, L.N. 1994. *Rhododendrol glycosides and phenyl glucoside esters from inner bark of Betula pubescens*. Phytochemistry. 36 (1): 79-83
- Panshin, A.J.; Zeeuw, C. *Textbook of wood technology*. McGraw-Hill. 1980, p.630, 635, 641.
- Peschel, W., Sanchez-Rabameda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela-Raventos, R., Buxaderas, S., Codina, C. 2006. *An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes*. Food Chemistry. 97:137-150
- Pezzuto, J.M., Dasgupta, T.K., Kim, D.S.H.L., Schmidt, M.L., Kuzmanoff, K.M., Ling-Indeck, L. 1998. *Betulinic acid derivatives and compositions for treating cancers*. PCT International Patent Application WO/98/51294. pp 75
- Pinelo, M., Laurie, V.F et Waterhouse, A.L. 2006. *A Simple method to separate red wine nonpolymeric and polymeric phenols by solid-phase extraction*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 2839-2844
- Porter, L.J. 1992. *Structure and chemical properties of the condensed tannins*. In Plant Polyphenols, Edited by R.W.Hemongway and P.E. Laks, Plenum Press, New York.p22-36

- Porter, W.L. 1993. *Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems*. In: Williams, G.M. (Ed.) *Antioxidants: Chemical, Physiological, Nutritional and Toxicological Aspects* Princeton: Princeton Scientific. pp.93-122.
- Proestos, Ch et Komaitis, M. 2006. *Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction technics*. *Journal of food quality*. 29 (5): 567-582.
- Quine, S.D., Raghu, P.S. 2005. *Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart*. *Pharmacological reports*. 57 (5): 610-615
- Read, M.A 1995. *Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents vascular*. *Am. J. Pathol.* 147 (2): 235-237.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free Radical Biol. Med.* 26: 1231-1237
- Rhoades, D.F. 1979. *Evolution of plant chemical defense against herbivores*. In: *Herbivores, their interactions with secondary plant metabolites*. Rosenthal, GA, Janzen DH (eds). Academic Press, New York, pp 3-54.
- Rhodes M.J.C. 1994. *Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems*. *Plant Mol. Biol.* 24:1-20
- Riipi, M.; Ossipov, V., Lempa, K., Haukioja, E., Koricheva, J., Ossipova, S., Pihlaja, K. 2002. *Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-off between leaf growth and accumulation of phenolics?*. *Oecologia*. 130: 380-390
- Robards, K.; Antolovich, M. 1997. *Analytical chemistry of fruit bioflavonoids*. *The Analyst*. 122:11R-34R.

- Rodríguez-Delgado, M.A.; Malovana, S., Perez, J.P.; Borges, J. 2001. *Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection*. Journal of Chromatography A. 912: 249-257
- Roginski, V., Lissi, E. 2005. *Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food*. Food Chemistry. 92: 235-254
- Rougier, A., Wen, F.W. 2007. *Efficacy and safety of a new salicylic acid derivative (LHA) alone or as a complement of tretinoin in acne treatment*. Journal of the American academy of dermatology. 56 (2): AB15-AB15 Suppl. S
- Rousseau-Richard, C., Auclair, C., Richard, C., Martin, R. 1990. *Free radical scavenging and cytotoxic properties in the ellipticine series*. Free Rad. Biol. Med. 8: 223-230
- Rudnik, E., Szczucinska, A., Gwardiak, H., Szulc, A., Winiarska, A. 2001. *Comparative studies of oxidative stability of linseed oil*. Thermochemica Acta. 370:135-140
- Ruf, J.C; Berger, J.L., Renaud, S. 1995. *Platelet rebound effect of alcohol withdrawal and wine drinking in rats-Relation to tannins and lipid peroxidation*. Arterioscl.Thromb. Vasc. Biol. 15:140-144
- Russo, P., Tedesco, I., Russo, M., Russo, G.L., Venezia, A., Cicala, C. 2001. *Effects of de-alcoholated red wine and its phenolics fractions on platelet aggregation*. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 11: 25-29
- Saccini, C., Nardini, M., D'Aquino, M., Gentili, V., Di Felice, M., Tomassi, G. 1992. *Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters of rat plasma and lipoprotein fractions*. Journal of Lipid research. 33. 627-633
- Sagesaka-Mitane, Y., Miwa, M., Okada, S. 1990. *Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea*. Chemical & Pharmaceutical bulletin (Tokyo). 38: 790-793

- Salminen, J.P., Ossipov, V et Pihlaja, K. 2002. *Distribution of hydrolysable tannins in the foliage of finnish birch species*. Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung. 57 c: 248-256
- Sanchez-Moreno, C. and Larrauri, J.A. 1998. *Main methods used in lipid oxidation determination*. Food Science and Technology International. 4:391-399.
- Sanchez-Moreno, C., Lurrari, J.A., Saura-Calixto, F. 1998. *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols*. J. Sci Food Agric. 76: 270-276
- Santamour, F.S., Vettel, H.E. 1978. *The distribution of rhododendrin in birch (Betula) species*. Biochemical Systematics and Ecology. 6:107-108
- Santamour, F.S., Lundgren, L.N. 1997. *Rhododendrin in Betula: a reappraisal*. Biochemical Systematics and Ecology. 25 (4):335-341
- Sawai, Y., Moon, J.H. 2000. *NMR analytical approach to clarify the molecular mechanism of the antioxidative and radical-scavenging activities of antioxidants in tea using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 6247-6253
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, Ch., Rémésy, Ch. 2005. *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. Critical review in Food Sciences and Nutrition. 45: 287-306
- Schmidlein, H. et Herman, K. 1976. *Quantitative analysis of flavanones and 3-hydroxyflavanones by thin-layer chromatography*. Journal of Chromatography. 123: 385-389
- Schroeter, H., Heiss, Ch., Balzer, C., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Hollenberg, N.K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H.H., Kelm, M. *(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans*. PNAS. 103 (4): 1024-1029.

- Senevirathne, M., Soo-Hyun, K., Siriwardhana, N., Jin-Hwan, H., Ki-Wan, L. and You-Jin, J. (2006). Antioxidant potential of *Ecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *International Journal of Food Science and Technology*, 12, 27-38.
- Serafini, M., Laranjinha, J.A., Almeida, L.M., Maiani, G. 2000. *Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans*. *J. Nutr.Biochem.* 11: 585-590
- Shah, Z.A., Dore, S. 2007. *Neuroprotective role of cocoa-derived flavonoid (-)-epicatechin in experimental stroke: Novel mechanism of action*. *Stroke*: 38 (2): 559-559
- Shen, Y., Kojima, Y., Terazawa. 1999. *Two lignan rhamnosides from birch leaves*. *Journal Wood Science*. 45: 326-331
- Shen, Y., Kojima, Y., Terazawa. 1999. *Four glucosides of p-hydroxyphenyl derivatives from birch leaves*. *Journal Wood Science*. 45: 332-336
- Silva, F.A.M., Borges, F., Guimaraes, C., Lima, C. 2000. *Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2122-2126
- Singleton, V.L and Rossi, J.A. 1965. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158
- Smite E., Lundgren, L.N and Anderson, R. 1993. *Arylbutanoid and diarylheptanoid glycosides from inner bark of Betula pendula*. *Phytochemistry*. 32(2): 365-369
- Smite, E., Pan, H., Lundgren, L.N. 1995. *Lignan glycosides from inner bark of Betula pendula*. *Phytochemistry*. 40 (1):341-343

- Spigno, G., De Faveri, D.M. 2007. *Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts*. Journal of Food Engineering. 78:793-801.
- Stevanovic T. Automne 2005. *Chimie du bois*. CHM-22170. Université Laval. Québec. Canada. p 6.6-6.20
- Subirade, I., Fernandez, Y., Periquet, A., Mitjavila, S. 1995. *Catechin protection of 3T3 Swiss fibroblasts in culture under oxidative stress*. Biol.Trace Elem. Res. 47 (1-3) : 313-319
- Sunnerhein, K., Palo, T., Theander, O et Knutsson, P.G. 1988. *Chemical defense in birch. Platyphylloside: A phenol from Betula pendula inhibiting digestibility*. Journal of Chemical Ecology. 14 (2): 549-559.
- Suschelet, M., Siess, M.H., Le Bon, A.M., Canivenc-Lavier, M.C. 1997. *Anticarcinogenic properties of some flavonoids*. In : Polyphénols 96. Vercauteren, J, Chèze, C., and Triaud, J. ed. Paris, INRA Editions.p.165-204
- Tahvanainen, J., Julkunen-Tiitto, R., Rousi, M., Reichardt, P.B. 1991. *Chemical determinants of resistance in winter-dormant seedlings of European white birch (Betula pendula) to browsing by the mountain hare*. Chemoecology. 2: 49-54
- Taipale, H.T; Harmala, L., Roussi, M., Lapinjoki, S.P. 1994. *Histological and chemical comparison of triterpene and phenolic deterrent contents of juvenile shoots of Betula species*. Trees. 8: 232-236
- Talalay, P., De Long, M.J., Prochaska, H.J. 1988. *Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis*. Proc.Nat.Acad.Sci.USA. 85: 8261-8265
- Tamura, H., Hayashi, Y., Sugisawa, H., Kondo, T. 1994 *Structure determination of acylated anthocyanins in Muscat Bailey A grapes by homonuclear Hartmann-Hahn*

- (HOHAHA) spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* 5:190-196.
- Tegelberg, R., Julkunen-Tiito, R., Aphalo, P.J. 2001. *The effects of long-term elevated UV-B on the growth and phenolics of field-grown silver birch (Betula pendula)*. *Global Change Biology*. 7: 839-848
- Tegelberg, R., Aphalo, P.J., Julkunen-Tiito, R. 2002. *Effects of long-term, elevated ultraviolet-B radiation on phytochemicals in the bark of silver birch (Betula pendula)*. *Tree Physiology*. 22: 1257-1263
- Torres de Pinedo, A., Penalver, P., and Morales, J.C. 2007. *Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship*. *Food Chemistry*. 103: 55-61.
- Tura, D., Gigliotti, C., Pedó, S., Failla, O., Bassi, D., Serraiocco, A. 2007. *Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (Olea Europea L.) and correlations with oxidative stability*. *Scientia Horticulturae*. 112: 108-119
- Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y.S. 2006. *The effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods*. *Food Chemistry*. 4: 835-841.
- Vainiotalo, P., Julkunen-Tiito, R., Reichardt, P., Auriola, S. 1991. *Chemical characteristics of herbivore defenses in Betula pendula winter-dormant young stems*. *Journal of Chromatography*. 547: 367-376.
- Van-Aardt, M., Duncan, S.E., Long, T.E., O'Keefe, S.F., Marcy, J.E., Sims, S.R. 2004. *Effect of antioxidants on oxidative stability of edible fats and oils: thermogravimetric analysis*. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 52:587-591

- Velasco, J., Dobarganes, C. 2002. *Oxidative stability of virgin olive oil*. Eur.J.Lipid Sci. Technol. 104: 661-676
- Verma, A.K., Jhonson, J.A., Gould, M.N., Tanner, M.A. 1988. *Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by the dietary flavonols quercétine*. Cancer Res. 48 (20): 5754-5758.
- Ward, J. 1994. Free radicals, antioxidants and preventive geriatrics. *Austr.J.Physic.* 23 (7): 1297-1301
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L. 1996. *Total antioxidant capacity of fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44: 701-705
- Webster, R.P., Gawde, M.D., Bhattacharya, R.K. 1996. *Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced AND damage and repair enzymes in rats*. Cancer Letters. 109:185-191
- Wen, D., Chenchen, L., Hao, D., Yiping, L., Liu, H. 2005. *A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 6624-6629
- Willfor, S.M., M.O. Ahotupa, J.E Hemming, M.H.T.Reunanen, P.C Eklund, R.E. Sjöholm, C.S.E Eckerman, S.P. Pohjamo, B.R Holmbom. 2003. *Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species*. Journal of agricultural and food chemistry. 51(26): 7600-6.
- Wollny, T., Aiello, L., Di Tommaso, D., Bellavia, V., Rotillo, D., Donati, M.B., de Gaetano, G., Iacoviello, L. 1999. *Modulation of haemostatic function and prevention of experimental trombosis by red wine in rats: A role for increased nitric oxide production*. Br.J.Pharmacol. 127:747-755

- Yamakoshi, J., Kataoka, S., Koga, T., Ariga, T. 1999. *Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits*. *Atherosclerosis*.142: 139-149
- Yang, C.S., Landau, J.M. 2000. *Effects of tea consumption on nutrition and health*. *Journal of Nutrition*. 130: 2409-2412
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L. 2001. *Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds*. *Annu.Rev.Nutr.* 21:381-406
- Yang, R.W., Gao, G., Liu, T., Liu, S.L., Li, G.X. 2007.*Enhanced ability of hemoglobin to carry oxygen by salidroside*. *Electrochemistry communications*. 9 (1): 94-96
- Yu, D., Wild, C.T., Martin, D.E., Morris-Natschke, S.L., Chen, C.H., Allaway, G.P., Lee, K.H. 2005. *The discovery of a class of novel HIV-1 maturation inhibitors and their potential in the therapy of HIV*. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 14: 681-693
- Zhou, G.B., Guan, Y.Q., Chen, H.Z., Ye, J.N. 2007. *Simultaneous determination of pharmacologically active ingredients in Rhodiola by capillary chromatography with electrochemical detection*. *Journal of chromatography A*. 1142 (2): 236-239

ANNEXE 1

Identification de composés phénoliques des ramilles du bouleau jaune par CLHP.

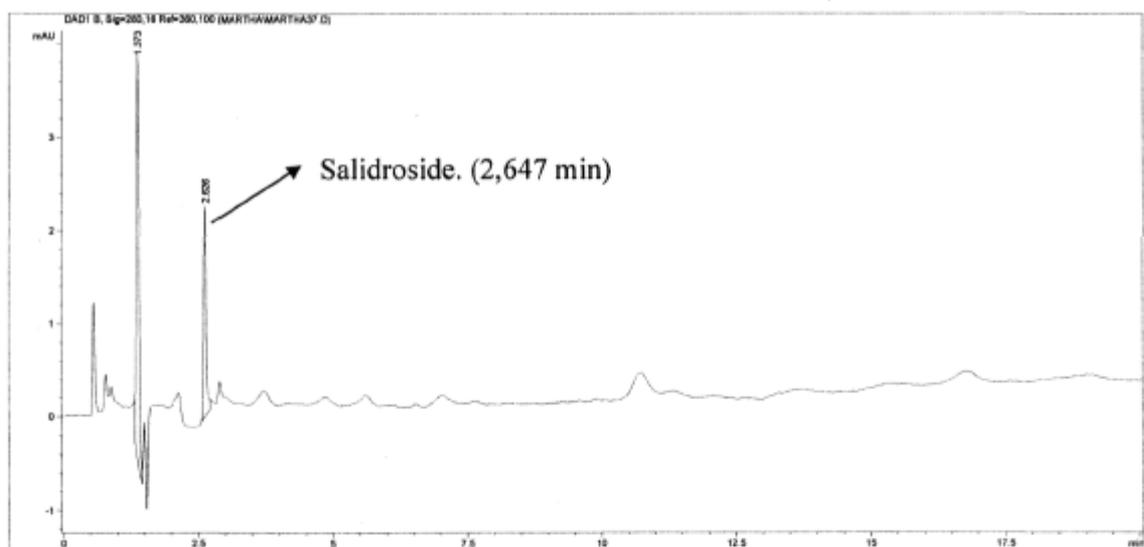


Figure A1. Identification du salidroside dans l'eluent methanolique (C₁₈ A) de l'extrait brut en utilisant la méthode A.

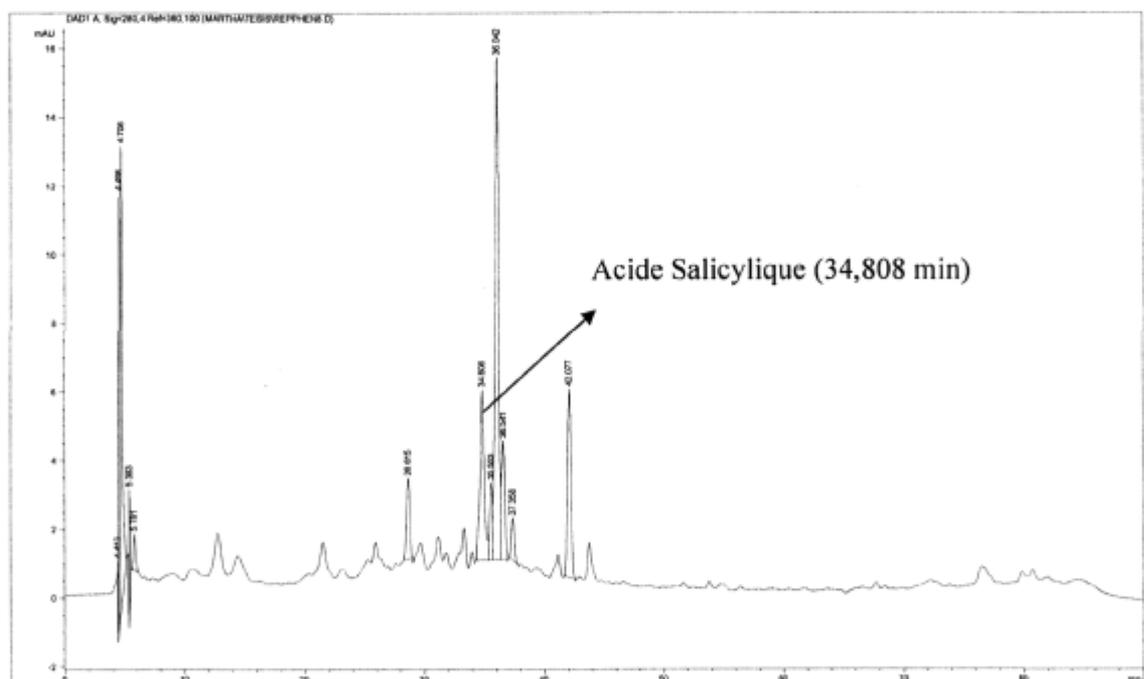


Figure A2. Identification de l'acide salicylique dans l'extrait brut en utilisant la méthode B.

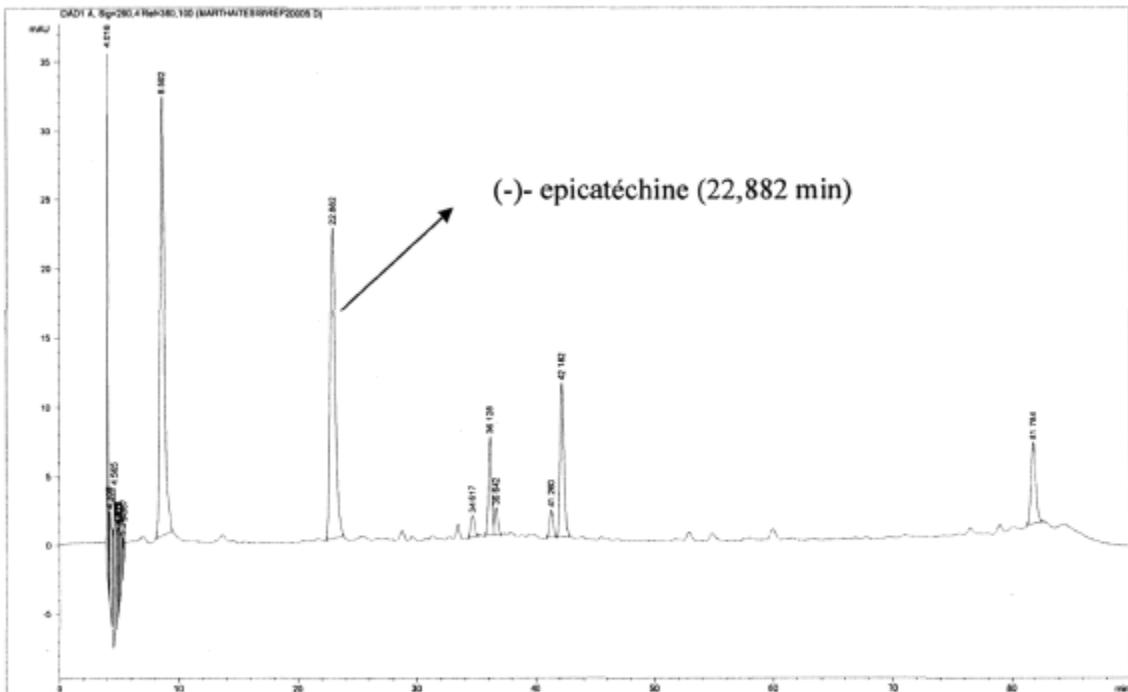


Figure A3. Identification de l'epicatechine dans l'extrait brut hydrolysé en utilisant la méthode B.

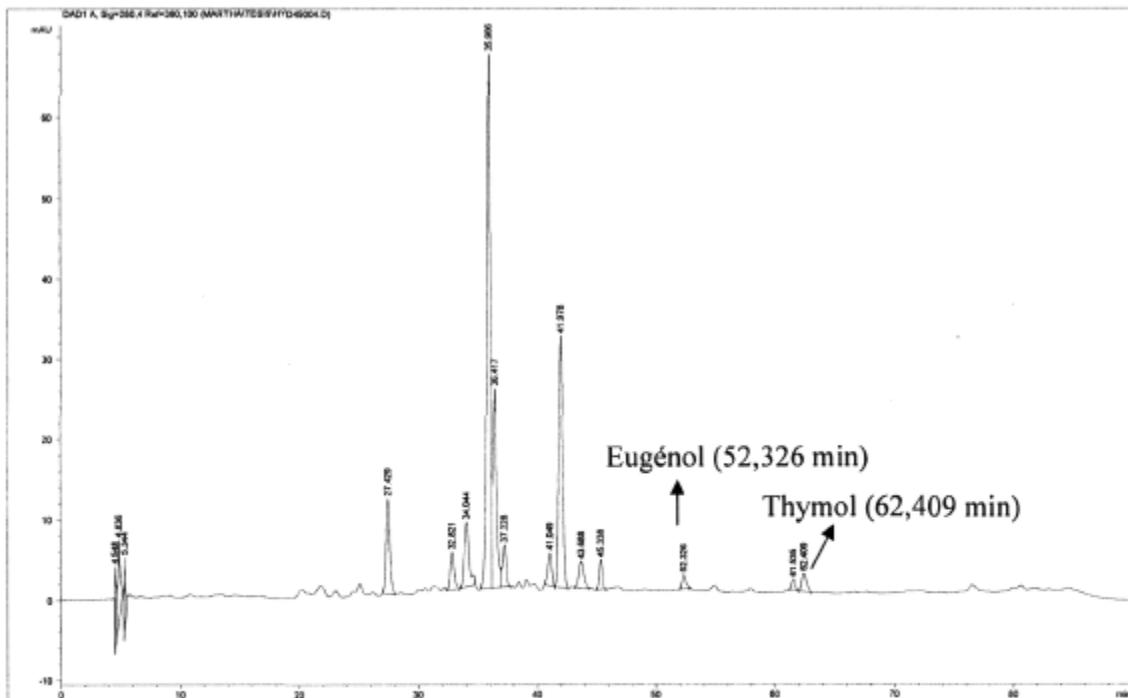


Figure A4. Identification de l'eugénol et le thymol dans la fraction de l'acétate d'éthyle hydrolysée en utilisant la méthode B.

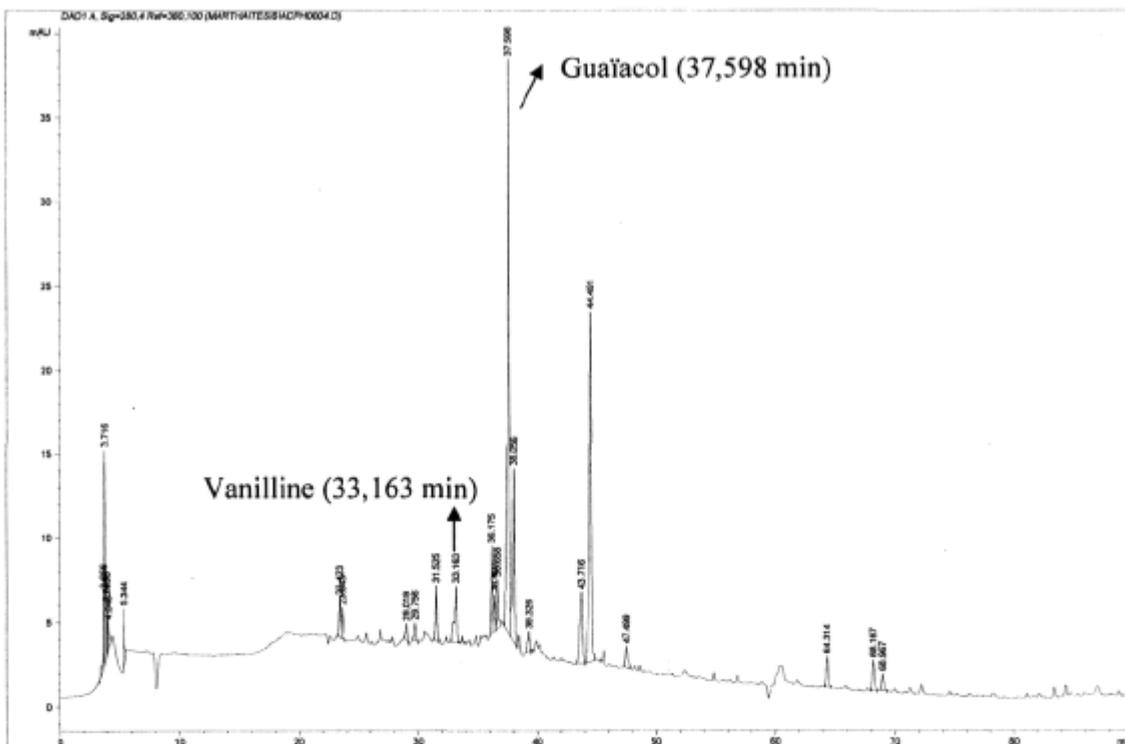


Figure A5. Identification de la vanilline et le guaiacol dans l'extrait brut purifié en utilisant la méthode C.

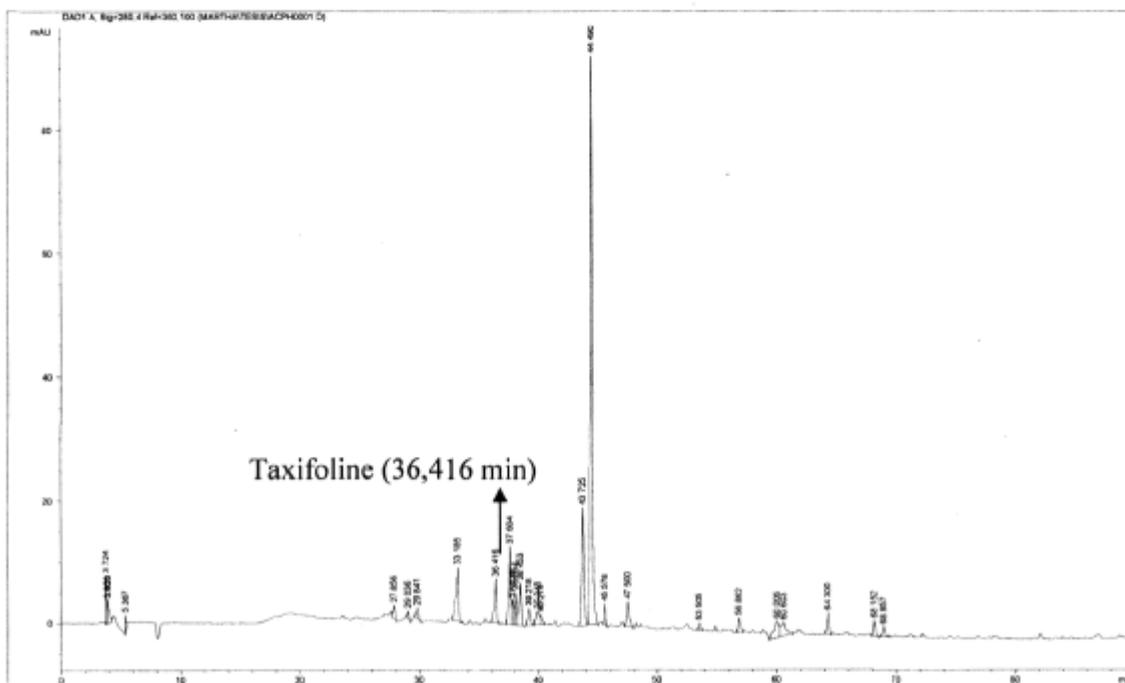


Figure A6. Identification de la taxifoline dans la fraction d'éther en utilisant la méthode C.