



**HAL**  
open science

## **Vaccinium myrtillus L. : une plante médicinale à anthocyanosides**

Olivia Maillefert

► **To cite this version:**

Olivia Maillefert. Vaccinium myrtillus L. : une plante médicinale à anthocyanosides. Sciences pharmaceutiques. 2010. dumas-00593157

**HAL Id: dumas-00593157**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00593157v1>**

Submitted on 13 May 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**  
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année 2010

N°

***Vaccinium myrtillus L.* : une plante médicinale à anthocyanosides**

**THESE**

**PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**DIPLÔME D'ETAT**

**OLIVIA MAILLEFERT**

Née le 13 Février 1982

A Chambéry

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE  
GRENOBLE

Le 19 Mai 2010

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : M. KRIVOBOK Serge, Docteur en Pharmacie et Maître de Conférences  
en Botanique

Membres

Mr CHOVELON Michel, Docteur en pharmacie

Mr CORJON Gilles, Docteur en pharmacie



**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**  
**FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année 2010

N°

***Vaccinium myrtillus* L. : une plante médicinale à anthocyanosides**

**THESE**

**PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**DIPLÔME D'ETAT**

**OLIVIA MAILLEFERT**

Née le 13 Février 1982

A Chambéry

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE  
GRENOBLE

Le 19 Mai 2010

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : M. KRIVOBOK Serge, Docteur en Pharmacie et Maître de Conférences  
en Botanique

Membres

Mr CHOVELON Michel, Docteur en pharmacie

Mr CORJON Gilles, Docteur en pharmacie



UFR  
DE PHARMACIE  
DE GRENOBLE

UNIVERSITE  
JOSEPH FOURIER  
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**  
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

**Année 2008-2009**  
**Mise à jour : le 6 octobre 2008**

### PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE

<b>BAKRI</b>	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
<b>BOUMENDJEL</b>	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
<b>BURMEISTER</b>	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
<b>CALOP</b>	Jean	Pharmacie Clinique (CHU)
<b>DANEL</b>	Vincent	Toxicologie (CHU SAMU-SMUR)
<b>DECOUT</b>	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
<b>DROUET</b>	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie (U.V.H.C.I)
<b>FAURE</b>	Patrice	Biochimie (DBI / CHU)
<b>FAVIER</b>	Alain	Professeur Emérite
<b>GODIN-RIBUOT</b>	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
<b>GRILLOT</b>	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Directeur UFR et CHU)
<b>MARIOTTE</b>	Anne-Marie	Pharmacognosie (D.P.M.)
<b>PEYRIN</b>	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
<b>SEVE</b>	Michel	Biotechnologie (CHU / CRI IAB)
<b>RIBUOT</b>	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
<b>ROUSSEL</b>	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
<b>WOUESSIDJEW</b>	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)



UFR  
DE PHARMACIE  
DE GRENOBLE

UNIVERSITE  
JOSEPH FOURIER  
SCIENCES. TECHNOLOGIE. SANTÉ.



**PROFESSEURS ASSOCIES (PAST)**

**CHAMPON**  
**RIEU**  
**TROILLER**

Bernard  
Isabelle  
Patrice

Pharmacie officine  
Qualitologie (CHU)  
Santé Publique (CHU)

**PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)**

**GAUCHARD**

Pierre Alexis

Chimie Inorganique (D.P.M.)

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire

**HP2** : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

**LBFA** : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

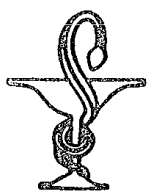
**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

**LR** : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

**PAST** : Professeur Associé à Temps Partiel

**PRAG** : Professeur Agrégé

**UVHCI** : Unit of Virus Host Cell Interactions



UFR  
DE PHARMACIE  
DE GRENOBLE

UNIVERSITE  
JOSEPH FOURIER  
SCIENCES. TECHNOLOGIE. SANTÉ.



**ENSEIGNANTS ANGLAIS**

<b>COLLE</b> Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
<b>FITE</b> Andrée	Professeur Certifié
<b>GOUBIER</b> Laurence	Professeur Certifié

**ATER**

1 ATER	<b>RECHOUM</b> Yassine	Immunologie / DMBMT
1 ATER	<b>GLADE</b> Nicolas	Biophysique
½ ATER	<b>RUTA</b> Joséphine	Chimie Analytique
1 ATER	<b>NZENGUE</b> Yves	Biologie cellulaire / DMBMT
1 ATER	<b>ELAZZOUI</b> Samira	Pharmacie Galénique
1 ATER	<b>VERON</b> Jean Baptiste	Chimie Organique
1 ATER	<b>HADJ SALEM</b> Jamila	Pharmacognosie
½ ATER	<b>REINICKE</b> Anne Teresa	Pharmacologie
1 ATER	<b>CHENAU</b> Jérôme	DMBMT
1 ATER	<b>NASER EDDINE</b> Abeer	Anglais

**ATER** : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CIB** : Centre d'Innovation en Biologie

**DPM** : Département de Pharmacochimie Moléculaire

**DMBMT** : Département Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements

**HP2** : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

**IAB** : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »

**IBS** : Institut de Biologie Structurale

**LAPM** : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes

**LBFA** : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée

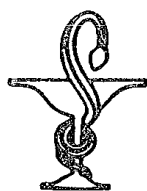
**LCBM** : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux

**LCIB** : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie

**LECA** : Laboratoire d'Ecologie Alpine

**TIMC-IMAG** : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition

**UVHCI** : Unit of Virus Host Cell Interactions



UFR  
DE PHARMACIE  
DE GRENOBLE

UNIVERSITE  
JOSEPH FOURIER  
SCIENCES. TECHNOLOGIE. SANTÉ.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur Renée GRILLOT  
Vice -Doyen : Mme Edwige NICOLLE

Année 2008-2009

### MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / CHU)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A / CHU)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique Economie Santé
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (N.V.M.C)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique (D.P.M.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (I.V.H.C.I. / CHU)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie -Pharmacologie (HP2)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / CHU)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RICHARD	Jean Michel	Service Accueil Handicap (Direction)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (D.P.M.)

Mise à jour du 06/10/2008

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 63 71 70



## **REMERCIEMENTS**

### **A Monsieur Serge Krivobok,**

Merci de tout mon cœur pour votre soutien et votre aide dans la réalisation de ce travail. Vous m'avez offert votre temps et vos encouragements, et ça je ne l'oublierai jamais.

### **A Monsieur Michel Chovelon**

Merci d'avoir donné de votre temps et de faire partie de mon jury.

### **A Monsieur Gilles Corjon**

Je vous remercie d'avoir accepté si généreusement de faire partie de mon jury.

### **A Monsieur et Madame Berendsen**

Je vous remercie pour votre compréhension et votre gentillesse.

### **A mes parents**

Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir soutenue dans les moments difficiles. J'ai beaucoup de chance de vous avoir. Je vous aime.

### **A mes grands-parents**

Que dire si ce n'est que je vous aime.

### **A toute ma famille**

Vous comptez tellement pour moi.

### **A mes amis**

Merci pour tous ces fous rires et tous les bons moments que nous avons partagés. Vous avez toujours été là, dans les moments de joie et de peine.

### **A Fabien**

Tu es mon avenir et je souhaite de tout cœur qu'il soit magnifique.

### **A mon grand-père Roger**

J'aurai tant voulu que tu sois là aujourd'hui. Tu es présent dans mon cœur, je pense à toi chaque jour. Tu me manques.

## TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux .....	p1
Liste des figures .....	p2
Liste des abréviations .....	p3
Glossaire .....	p4
Introduction et historique .....	p6
<b><u>Première partie</u> : Botanique de <i>Vaccinium myrtillus</i> L. ....</b>	<b>p7</b>
<b>I. Classification botanique de la myrtille .....</b>	<b>p8</b>
1. Caractéristiques de la famille des Ericacées .....	p8
2. Quelques généralités sur le genre <i>Vaccinium</i> .....	p10
3. <i>Vaccinium myrtillus</i> L. ou myrtille sauvage .....	p10
3.1. Description botanique .....	p10
3.2. Répartition géographique de la myrtille .....	p13
4. Autres espèces du genre <i>Vaccinium</i> .....	p13
4.1. <i>Vaccinium uliginosum</i> L. ....	p13
4.2. Myrtilles cultivées ou « myrtilles arbustives » .....	p14
4.3. <i>Vaccinium macrocarpon</i> L. ....	p16
<b>II. Culture, récolte et production des myrtilles .....</b>	<b>p17</b>
1. Culture : les exigences du sol et les conditions climatiques .....	p17
1.1. pH du sol .....	p17
1.2. Conditions climatiques .....	p17
1.3. Besoins en eau .....	p17
2. Récolte des myrtilles .....	p18
2.1. Date et mode de récolte .....	p18
3. Production des myrtilles .....	p19
3.1. Production mondiale .....	p19
3.2. Production européenne .....	p19
3.3. Production française .....	p19
4. Post-récolte .....	p20
4.1. Conservation .....	p20
4.2. Conditionnement .....	p20

<b><u>Deuxième partie : Composition chimique de <i>Vaccinium myrtillus</i> L.</u></b> .....	p21
<b>I. Identification et composition chimique de <i>Vaccinium myrtillus</i></b> .....	p22
1. Identification macroscopique et microscopique.....	p22
2. Composition chimique des feuilles et des fruits de <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	p22
2.1. Composition chimique des feuilles .....	p22
2.2. Composition chimique des fruits.....	p23
<b>II. Anthocyanosides</b> .....	p24
1. Généralités sur les anthocyanes.....	p24
2. Structure des anthocyanosides .....	p25
3. Propriétés physico-chimiques des anthocyanosides.....	p26
4. Extraction, séparation et identification des anthocyanosides.....	p27
4.1. Extraction .....	p27
4.2. Séparation et identification.....	p27
4.3. Dosage des anthocyanosides .....	p27
5. Anthocyanosides de <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	p28
5.1. Composition en anthocyanosides .....	p28
5.2. Données quantitatives .....	p29
5.3. Données qualitatives .....	p29
5.4. Distribution des anthocyanosides dans <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	p29
5.5. Pharmacocinétique des anthocyanosides de <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	p30
<b>III. Autres composés phénoliques de <i>Vaccinium myrtillus</i></b> .....	p34
1. Acides phénoliques .....	p34
2. Tanins .....	p34
3. Flavonols .....	p35
4. Autres composés retrouvés en minorité dans <i>V. myrtillus</i> .....	p35
<b><u>Troisième partie : Intérêts thérapeutiques de <i>Vaccinium myrtillus</i> L.</u></b> .....	p36
<b>I. Action de <i>Vaccinium myrtillus</i> dans le domaine vasculaire</b> .....	p37
1. Effet anti-agrégant et vasodilatateur .....	p37
1.1. Effet anti-agrégant plaquettaire .....	p37
1.2. Effet vasodilatateur et relaxant des artères coronaires .....	p39
2. Activité vasoprotectrice.....	p40
2.1. Action sur la perméabilité capillaire et activité anti-protéasique.....	p40
2.2. Action sur la résistance capillaire.....	p41

2.3. Action sur la formation d'un œdème.....	p41
2.4. Action antiathérogénique .....	p42
3. Etudes cliniques de l'activité vasoprotectrice .....	p42
4. Action sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA).....	p43
5. Action sur l'angiogénèse .....	p44
<b>II. Action de <i>Vaccinium myrtillus</i> dans le stress oxydant.....</b>	<b>p45</b>
1. Le stress oxydant : quelques généralités .....	p45
2. Propriétés antioxydantes des anthocyanosides de <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	p46
2.1. Quelques rappels sur les anthocyanosides .....	p46
2.2. Effet des anthocyanosides sur la capacité antioxydante du plasma .....	p47
2.3. Pouvoir ORAC des anthocyanosides .....	p47
2.4. Capacité antioxydante des anthocyanosides vis-à-vis des espèces réactives azotées.....	p48
2.5. Réactivité contre la peroxydation lipidique .....	p49
2.6. Action inhibitrice sur l'oxydation des lipides et des protéines .....	p50
3. Effet cytoprotecteur de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur les dommages du foie.....	p51
3.1. Généralités sur le foie.....	p51
3.2. Etudes de lésions oxydatives hépatiques.....	p51
4. Effet de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur les maladies neurodégénératives et le vieillissement .....	p53
4.1. Effets sur un stress émotionnel.....	p53
4.2. Effet sur les déficits cognitifs liés à l'âge et implication du stress oxydant.....	p54
5. Effet de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur les dommages induits par les UVB .....	p56
5.1. Effets d'une exposition solaire.....	p56
5.2. Effet de <i>Vaccinium. myrtillus</i> sur les radiations solaires .....	p56
6. Effets de <i>Vaccinium. myrtillus</i> sur le stress oxydant oculaire.....	p57
6.1. La rétine : quelques généralités.....	p57
6.2. Effets de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur les paramètres du stress oxydant oculaire.....	p58
6.3. Effets de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur les maladies oculaires liés à l'âge.....	p59
7. Effets neuroprotecteurs de <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	p61
8. Effet de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur une ischémie-reperfusion impliquant un stress oxydant.....	p61

<b>III. Effets anticancéreux de <i>Vaccinium myrtillus</i></b> .....	p62
1. Rôle des anthocyanosides dans la prévention du cancer.....	p62
2. Induction de l'apoptose des cellules cancéreuses par <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	p63
3. Action de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur un modèle génétique de polypose adénomateuse familiale humaine.....	p65
4. Action de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur les récepteurs tyrosine-kinases .....	p66
4.1. Récepteurs à activité tyrosine kinase : quelques généralités.....	p66
4.2. Etude de Teller et coll. (2009).....	p66
<b>IV. Action de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur la vision</b> .....	p67
1. Étude chez des sujets à vision normale .....	p68
2. Étude chez des sujets myopes .....	p69
3. Méta-analyse de Canter et coll. (2004) .....	p70
4. Étude de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur la rétinopathie diabétique.....	p72
5. Effets de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur les cellules épithéliales cornéennes .....	p72
<b>V. Action de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur le diabète</b> .....	p73
1. Action sur le glucose du sérum et la fructosamine.....	p73
2. Action sur le métabolisme lipidique de rats diabétiques.....	p74
<b>VI. Action de <i>Vaccinium myrtillus</i> sur l'estomac</b> .....	p74
1. Action sur l'ulcère gastrique .....	p74
2. Action sur <i>Helicobacter pylori</i> .....	p76
<b>VII. Autre effet de <i>Vaccinium myrtillus</i></b> .....	p76
1. Action antibactérienne.....	p76
<b>VIII. Toxicologie</b> .....	p77
1. Effets indésirables .....	p77
2. Doses létales 50 (DL50).....	p78
3. Contre-indications de <i>Vaccinium myrtillus</i> .....	p79
<b><u>Quatrième partie : Utilisations de <i>Vaccinium myrtillus</i> L.</u></b> .....	p80
<b>I. Utilisations alimentaires</b> .....	p81
1. Utilisations culinaires .....	p81
2. Utilisation dans l'industrie alimentaire .....	p81
<b>II. Utilisations pharmaceutiques</b> .....	p82
1. Médicaments à base de myrtille .....	p83
1.1. Médicaments allopathiques .....	p83
1.2. Médicaments homéopathiques .....	p84

1.3. Compléments alimentaires .....	p85
<b>Conclusion</b> .....	p87
<b>Bibliographie</b> .....	p89
<b>Liste des Annexes</b> .....	p98
Annexe I .....	p99
Annexe II.....	p101
Annexe III .....	p104
Annexe IV .....	p107

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau I** : Principaux composés des fruits et légumes.

**Tableau II** : Effets de *V. myrtillus* sur la baisse du métabolisme cellulaire induite par le tBHP.

**Tableau III** : Effets de *V. myrtillus* sur la surproduction des ERO induite par le tBHP.

**Tableau IV** : Effets de *V. myrtillus* sur la surproduction  $O_2^{\cdot-}$  induite par le tBHP.

**Tableau V** : Effets de *V. myrtillus* sur l'apoptose mitochondriale induite par le tBHP.

**Tableau VI** : Activité antimicrobienne de la baie de *V. myrtillus* lyophilisée.

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Planche botanique de *Vaccinium myrtillus* L.
- Figure 2** : Formule florale de la famille des Ericacées.
- Figure 3** : Feuilles de *Vaccinium myrtillus*.
- Figure 4** : Fleur de *Vaccinium myrtillus*.
- Figure 5** : Fruit de *Vaccinium myrtillus*.
- Figure 6** : Répartition de *Vaccinium myrtillus* en France.
- Figure 7** : Fleurs de *Vaccinium uliginosum*.
- Figure 8** : Fruit de *Vaccinium uliginosum*.
- Figure 9** : Fleurs de *Vaccinium corymbosum*.
- Figure 10** : Baies de *Vaccinium corymbosum* « Bluecrop ».
- Figure 11** : Feuillage de *Vaccinium corymbosum*.
- Figure 12** : Aspect général du *Vaccinium macrocarpon* : fleurs, feuilles et fruits.
- Figure 13** : Peigne utilisé pour la récolte des myrtilles sauvages.
- Figure 14** : Structure chimique des principaux anthocyanidines.
- Figure 15** : Structure chimique des anthocyanosides et anthocyanidines des fruits de *V. myrtillus*.
- Figure 16** : Capacité antioxydante de quelques baies.
- Figure 17** : La rétine chez l'homme.



## LISTE DES ABREVIATIONS

- AA : allyl alcool
- ADP : adénosine diphosphate
- AMPC : adénosine monophosphate cyclique
- DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge
- ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine
- EDRF : endothelium-derived relaxing factor/facteur relaxant dérivé l'endothélium
- ERO : espèces réactives de l'oxygène
- GAGs : glycosaminoglycanes
- GSH : glutathion
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène
- IC50 : Inhibitory Concentration 50/concentration inhibitrice à 50%
- IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion
- IGF : insulin-like growth factor
- LDLs : low-density lipoproteins / lipoprotéines de basse densité
- MDA : malondialdéhyde
- NO : monoxyde d'azote radicalaire
- O<sub>2</sub><sup>·-</sup> : anion superoxyde
- OH· : radical hydroxyle
- PGI<sub>2</sub>-like : prostacyclin-like
- PLCγ : phospholipase Cγ
- RTK : récepteur à activité tyrosine kinase
- tBH : tert-butylhydroperoxyde
- TBRAs : thiobarbituric acid reactive substances/substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
- UV : ultraviolet
- VEGF : vascular endothelial growth factor/facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
- XOD : xanthine oxydase

# GLOSSAIRE

## Termes botaniques

**Actinomorphe** : se dit d'une fleur présentant une symétrie axiale.

**Adné** : soudé ou attaché à, s'applique à des organes différents, comme par exemple des étamines adnées au périanthe.

**Anémogame** : qualifie le mode de fécondation des plantes dans lequel le pollen est porté par le vent.

**Anthère** : partie de l'étamine, habituellement portée par le filet, contenant le pollen, celui-ci est libéré, lorsque s'ouvre cette terminaison renflée, sous forme de petit sac oblong, généralement jaune et double.

**Campanulé** : se dit d'une fleur en forme de cloche.

**Capité** : terminé en tête arrondie.

**Carpelles** : organe femelle. L'ensemble des carpelles forme le pistil (ou gynécée).

**Dialypétale** : dont les pétales sont indépendants les uns des autres.

**Hermaphrodite** : plante portant des organes floraux mâle et femelle.

**Infundibuliforme** : se dit d'une fleur dont la corolle est en forme d'entonnoir.

**Ligneux** : se dit des végétaux formant du bois : arbres et arbustes mais aussi un certain nombre de plantes grimpantes.

**Lobé** : se dit d'un organe, comme feuille ou pétale, échancré mais sans division complète.

**Loculicide** : qui s'ouvre en se fendant longitudinalement le long de la nervure dorsale de chaque loge.

**Marcotte** : organe végétal aérien qui s'enterre et s'enracine avant de se séparer (ou d'être séparé) de la plante mère.

**Périanthe** : ensemble des pièces florales non sexuées d'une fleur.

**Septicide** : qualifie un fruit qui s'ouvre en se fendant longitudinalement au niveau des cloisons (septums) et séparant ainsi les carpelles.

**Stomate** : structure foliaire organisée ayant des mécanismes d'ouverture réversibles permettant les échanges gazeux.

**Ténuinucellé** : se dit d'un ovule contenant un nucelle peu développé (dans les groupes évolués comme les Astéridées).

**Unitégumenté** : se dit d'un ovule ayant une seule enveloppe autour du nucelle (dans les groupes évolués comme les Astéridées).

**Urcéolée** : corolle en forme de tube dilaté à la base et rétrécit au sommet.

**Zygomorphe** : se dit d'une plante présentant une symétrie par rapport à un plan.

### Autres

**Asthénopie** : fatigue de l'oeil surtout lors d'accommodation soutenue et qui provoque des signes d'irritation, une sensation de brûlure et des maux de tête.

**Mésopique** : Caractéristique visuelle du système oculaire utilisant à la fois bâtonnets et cônes pour interpréter une scène visuelle dont l'intensité lumineuse est comprise entre celle du jour et de la nuit (crépusculaire).

**Rétinite pigmentaire** : maladie héréditaire dégénérative des cellules visuelles réceptrices de la lumière (cônes et bâtonnets).

**Sensibilité au contraste** : elle est basée sur la capacité du système visuel à détecter des différences de luminances, donc de déterminer l'existence de "bords" entre surfaces homogènes.

**Scotopique** : vision nocturne se basant principalement sur l'information captée par les bâtonnets.

## Introduction et historique

Dans une société où la phytothérapie connaît un engouement croissant, voulant se rapprocher au plus près du « naturel », la connaissance des plantes aux vertus thérapeutiques est de plus en plus recherchée. La myrtille sauvage ou *Vaccinium myrtillus* L. appartient à la famille des Ericacées ; elle est l'une des plantes centrales faisant partie de la liste des plantes médicinales inscrites à la Pharmacopée française X<sup>ème</sup> édition (liste A) et dont le fruit (sec et frais) fait l'objet d'une monographie à la Pharmacopée européenne (6<sup>ème</sup> édition). L'étymologie du genre *Vaccinium* est incertaine ; il dériverait du nom latin *vacca* pour vache car la plante était volontiers broutée par les bovins, mais pour d'autres, du nom *bacca* pour baie (43). Le terme *myrtillus* provient de la ressemblance avec les feuilles et les fruits du myrte (*Myrtus communis* L.). *V. myrtillus* empreinte divers noms vernaculaires (airelle, airelle noire, airelle anguleuse, bluet, brimbelle, raisin des bois, raisin de bruyère...). Les désignations anglaises pour la baie de myrtille sont *bilberry fruit*, *blueberry*, *whortleberry* ; pour les feuilles, *bilberry leaf*, *huckleberry leaf* (67).

Ses propriétés thérapeutiques sont utilisées dans la médecine populaire depuis fort longtemps ; Dioscoride est le premier à vanter les bienfaits de la myrtille dans le traitement de la dysenterie. Puis au XVI<sup>ème</sup> siècle, une religieuse et mystique allemande, Sainte Hildegarde de Bingen, préconisait la plante pour provoquer, faciliter ou augmenter les règles (20). Depuis, de nombreuses propriétés sont attribuées au myrtillier en fonction de la partie de plante utilisée. On utilisait les baies pour ses propriétés astringentes, toniques, antiseptiques, dans le traitement de la diarrhée, des hémorroïdes, des inflammations gastro-intestinales..., quant aux feuilles, elles étaient surtout utilisées pour ses propriétés hypoglycémiantes (43). L'amélioration de la vision nocturne par la myrtille a été rapportée par les pilotes de la British Royal Air Force qui en consommaient quotidiennement. Certains usages prêtés à la myrtille ont été validés et figure dans la Note explicative de l'Agence du médicament (1998) et la monographie de la Commission E allemande (ces usages seront cités dans cette thèse). La myrtille fait l'objet de nombreuses études *in vivo*, *in vitro* et de quelques études cliniques (dans des domaines médicaux variés) dont certaines posent des interrogations. Ses utilisations sont diverses ; on l'emploie en cuisine (pâtisseries, confitures, vin, vinaigre...), dans l'industrie et dans le domaine pharmaceutique où l'on retrouve des médicaments à base de myrtille et des compléments alimentaires.

**Première partie :**  
**Botanique de *Vaccinium myrtillus* L.**



Figure 1 : Planche botanique de *Vaccinium myrtillus* L. (70).

## **I. Classification botanique de la myrtille**

Le taxon des Spermatophytes ou plantes à graines est constitué de deux clades : les Gymnospermes ou plantes à ovules nus et les Angiospermes ou plantes à ovaies.

La myrtille (ou myrtillier) appartient à l'embranchement des Angiospermes se distinguant des Gymnospermes par plusieurs caractères dont trois fondamentaux :

- les organes reproducteurs se groupent en fleurs bisexuées ;
- les carpelles\* entourent complètement les ovules et se transforment, après fécondation, en fruit ;
- le gamétophyte femelle situé dans l'ovule, nommé sac embryonnaire est le siège d'une double fécondation, l'une donnant l'embryon, l'autre conduisant à l'albumen (tissu de réserve des graines, à 3n chromosomes).

Selon la classification systématique, la myrtille fait partie de la classe des Astéridées (Eudicots à pétales et carpelles soudés) constituée d'environ 67.000 espèces ; on distingue les Astéridées basales et les Euastéridées I et II. Les Astéridées basales ont deux ordres frères : les Ericales et les Cornales (25).

### **1. Caractéristiques de la famille des Ericacées (22), (25), (30)**

L'ordre des Ericales, dont le nom vient d'Erica pour bruyère, comprend 7.000 espèces réparties en 24 familles dont celle des Ericacées auxquelles appartient la myrtille. Cette famille est répartie dans le monde entier mais avec une préférence géographique pour les régions tempérées ou froides, voire même les hautes montagnes. De façon générale, elle regroupe des arbres, des arbustes et des lianes aux caractéristiques suivantes (Figure 2) :

- des feuilles alternes, simples, entières à dentées-serrées dont les bords du limbe peuvent se replier sur eux-mêmes afin de protéger les stomates\* portés par la face inférieure de la transpiration. Chez certaines Ericacées, les feuilles sont plates et coriaces, ce qui leur procure une résistance à la sécheresse ;
- des fleurs le plus souvent hermaphrodites\*, généralement plus ou moins pendantes, actinomorphes\* à légèrement zygomorphes\* ;
- quatre ou cinq sépales libres à légèrement soudés ;

\* : les mots suivis de ce symbole ont leur définition dans le glossaire

- quatre ou cinq pétales soudées constituant une corolle cylindrique ou urcéolée\*, campanulée\* ou infundibuliforme\*, parfois dialypétale\*. Chez certains genres anémogames\*, le périgone\* n'est constitué que de deux ou trois sépales et pétales, ou trois à quatre pétales ;
- huit à dix étamines, réduites à deux ou trois chez les espèces anémogames ;
- le filet des étamines est libre ou adné\* à la corolle, voire même soudé. Quelques fois, il peut y avoir une paire d'appendices en éperon dressé s'insérant à proximité ou à l'endroit même où se trouve l'anthère\* ;
- l'anthère est constituée d'une ou de deux loges s'ouvrant par deux pores, libérant les grains de pollen habituellement disposés en tétrades ;
- les carpelles sont au nombre de deux à dix, à ovaire supère ou infère comme chez la myrtille (c'est-à-dire que l'ovaire peut se souder à la coupe florale) ;
- un style avec souvent un creux à l'intérieur ;
- un stigmate capité\* ou faiblement lobé\* ;
- un ou plusieurs ovules par loge, unitégumentés\* ou ténuinucellés\* ;
- enfin, le fruit peut être une capsule septicide\* ou loculicide\*, une drupe à plusieurs noyaux ou une baie comme chez la myrtille.

4 ou 5 sépales à soudure ou adnation variable

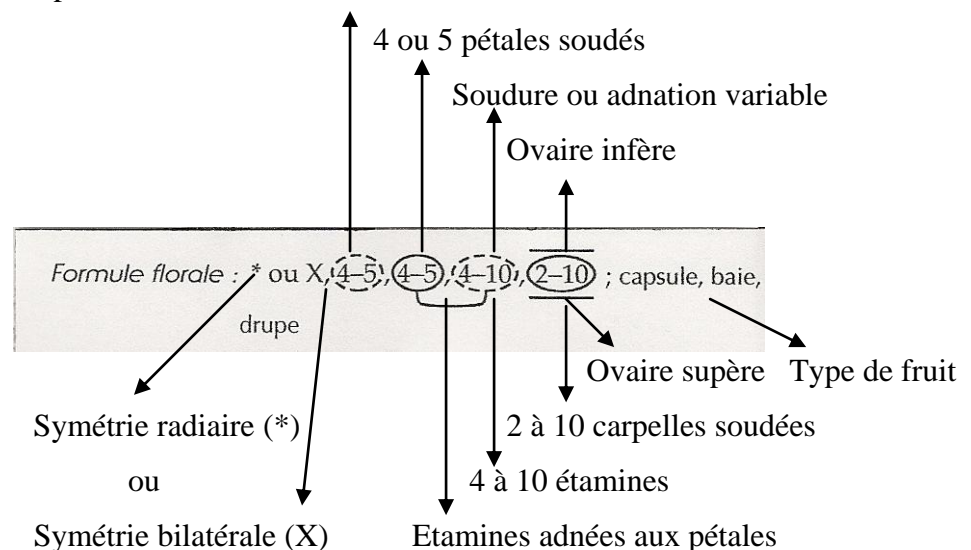


Figure 2 : Formule florale de la famille des Ericacées (30).

La famille des Ericacées regroupe plusieurs genres et espèces dont le nombre varie selon la littérature de 70 à 130 genres et de 2.000 à 3.400 espèces. Cette famille comprend :

- des plantes alimentaires comme *Vaccinium myrtillus* L. (myrtille), *Vaccinium uliginosum* L. (airelle des marais), *Gaultheria procumbens* L. (thé du Canada qui fournit le salicylate de méthyle)... ;
- des plantes médicinales comme *V. myrtillus* ; *Ledum palustre* L. (lédon des marais), *Calluna vulgaris* L. (bruyère callune)... ;
- des plantes utilisées pour l'obtention du bois comme *Erica arborea* L. (fabrication des pipes) ;
- de nombreuses espèces ornementales dans les genres *Arbutus* (arbousier), *Erica* (bruyère), *Rhododendron* (azalée)....

La famille des Ericacées est constituée de quatre sous-familles dont les Vaccinioïdées qui englobent le genre *Vaccinium*.

## **2. Quelques généralités sur le genre *Vaccinium* (22)**

Le genre *Vaccinium* se caractérise par plusieurs particularités botaniques :

- des tiges d'aspect contourné conséquence d'une croissance très lente ;
- des feuilles coriaces, plates, résistantes à la sécheresse ;
- des anthères s'ouvrant par deux pores, souvent munis de deux appendices dressés en forme de cornes ;
- un ovaire composé de cinq carpelles fermés ;
- un fruit représenté par une capsule.

Ce genre est lui-même constitué d'environ 150 espèces, auquel fait partie la myrtille.

Les myrtilles d'Europe regroupent deux espèces de myrtilles :

- *V. uliginosum* L.
- *V. myrtillus* L.

## **3. *Vaccinium myrtillus* L. ou myrtille sauvage**

### **3.1. Description botanique (22), (67)**

Le myrtillier (*Vaccinium myrtillus* L.) est un sous-arbrisseau vivace atteignant 20 à 60 cm de hauteur, à tige verte, dressée, cylindrique, rigide, et à rameaux vert pâle, anguleux ailés dans leur longueur et plus ou moins grêles. Cette tige est recouverte d'une écorce ligneuse\*, sans poil, ni stipule, ni latex, ni vrille.



Les racines souterraines sont nombreuses et forment un lacis très serré proche du sol avec des racines adventives. La plante se perpétue soit par ramification des tiges souterraines, soit par des bourgeons prenant naissance sur les racines ; elle est dite plante sociale car elle se marcotte\* naturellement.

Les feuilles (Figure 3) vert pâle sont petites (1 à 2 cm voire 2 à 3 cm selon la littérature), alternes, de forme oblongue à ovale, à pointe fine et allongée. Le bord du limbe est finement dentelé avec des nervures opposées. Ces feuilles sont courtement pétiolées, avec un pétiole (tige portant la feuille) recourbé vers le bas. Les feuilles prennent une belle couleur rouge-cuivre en automne. Elles sont caduques et réapparaissent au printemps.



Figure 3 : Feuilles de *Vaccinium myrtillus* (75).

Les fleurs de couleur blanc rosé, rouge pâle à verdâtre, ont une corolle pendante comportant quatre ou cinq pétales soudés entre eux sur une grande longueur et formant un tube globuleux à lobes courts. Elles sont solitaires ou regroupées par deux, portées par un pédoncule courbé. Les sépales très petits, verts, sont soudés à la corolle (Figure 4). La floraison a lieu en mai-juin.



Figure 4 : Fleur de *Vaccinium myrtillus* (72).

Le fruit est une baie globuleuse de la taille d'un petit pois (diamètre variant de 4 à 8 mm), bleu noir à maturité ; cette baie présente parfois des restes de style à la base et peut être surmontée du calice à son sommet, formant un disque entouré d'un faible rebord (Figure 5). On peut apercevoir à la base de la baie la cicatrice du pédoncule. Le mésocarpe est charnu, constitué de 4 ou 5 petites loges, contenant de multiples petites graines brillantes, brun-rouge. La baie mûrit jusqu'en en juillet-août, voire septembre.

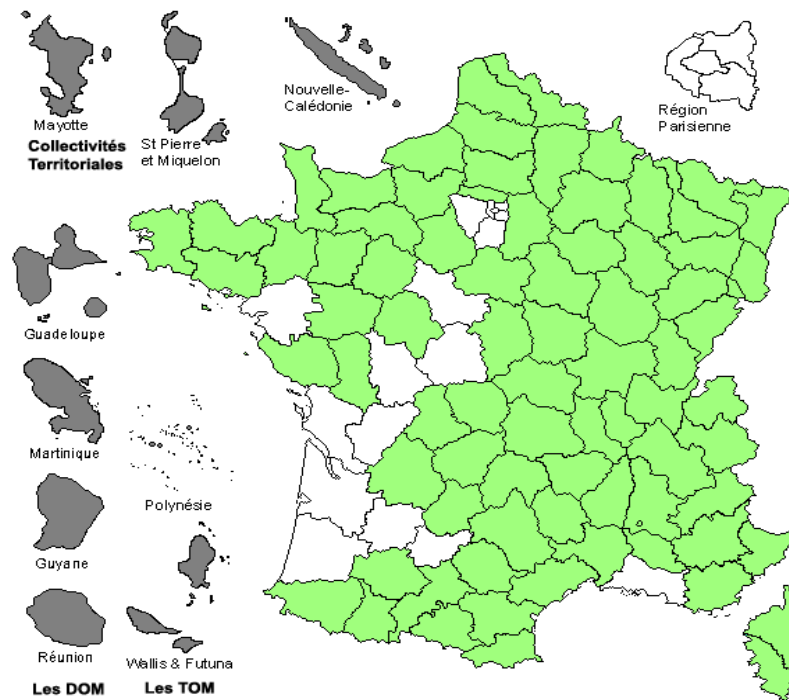


Figure 5: Fruit de *Vaccinium myrtillus* (72).

Si le fruit est frais, la saveur est douce, sucrée et légèrement acidulée voire même astringente. Le fruit sec, par contre, a une saveur aigre-douce, légèrement astringente. En ce qui concerne les organes reproducteurs, l'ovaire infère est soudé à la coupe florale. Les étamines, égales entre elles, dépassent la dizaine en nombre ; elles sont complètement libres, soudées au réceptacle ; elles peuvent être soit disposées en plusieurs verticilles soit n'avoir aucune position bien définie.

### 3.2. Répartition géographique de la myrtille (67)

*Vaccinium myrtillus* est une myrtille sauvage très peu cultivée originaire d'Europe du Nord et Centrale, abondant dans les bois clairsemés et les bruyères sur les sols siliceux de montagne. En France, on la trouve dans la plupart des massifs montagneux entre 400 et 2.500 mètres d'altitude (Figure 6).



#### Légende

- Présent
- Zone géographique non renseignée
- Présence non signalée

Figure 6 : Répartition de *Vaccinium myrtillus* en France (81).

## 4. Autres espèces du genre *Vaccinium*

### 4.1. *Vaccinium uliginosum* L. (22)

*Vaccinium uliginosum* L. nommé myrtille de loup ou myrtille des marais se situe principalement aux bords des marais, dans les tourbières, les landes et les bois humides. On le trouve en Dauphiné, dans le Jura, les Pyrénées... et en Savoie jusqu'à 2.000 mètres et plus. C'est un buisson bas à moyen, à tiges et rameaux arrondis dans leur longueur. Ses feuilles vert-pâle au dessus, nervurées au-dessous, ne persistent pas en hiver. Les fleurs (Figure 7) sont disposées en grappe de mai à juillet.



Figure 7 : Fleurs de *Vaccinium uliginosum* (72).

Le fruit (Figure 8), d'un diamètre d'environ 6 mm, est bleu-noir, prumineux, donnant un jus incolore et à chair blanche. Sa saveur est fade et sucrée. Il mûrit en juillet-août voire même jusqu'en septembre.



Figure 8 : Fruit de *Vaccinium uliginosum* (72).

#### **4.2. Myrtilles cultivées ou « myrtilles arbustives » (61)**

Ce sont des myrtilles d'origine américaine dont l'implantation a été faite essentiellement à partir de *Vaccinium corymbosum* L. (myrtillier géant ou arbustif). Celui-ci est un arbuste pouvant atteindre 2,5 mètres de hauteur, d'où son nom. Il est résistant au froid. Ses inflorescences forment un corymbe où le nombre de fleurs par corymbe varie beaucoup (Figure 9). La baie (Figure 10) est de couleur bleue recouvert de pruine qui masque une chair blanche.



Figure 9 : Fleurs de *Vaccinium corymbosum* (79).



Figure 10 : Baies de *Vaccinium corymbosum* « Bluecrop » (79).

La floraison apparait de mars à fin mai et dure plusieurs semaines. Les feuilles (Figure 11) prennent une belle coloration en automne, ce qui en fait une magnifique plante décorative.



Figure 11 : Feuillage de *Vaccinium corymbosum* (79).

À la différence de la myrtille sauvage, la myrtille d'origine américaine a un fruit plus gros et plus sucré. Cette dernière a une pulpe non colorée. Plusieurs variétés existent, classées en fonction de l'époque de maturité :

- les variétés précoces comme le Bluetta, l'Earliblue....
- les variétés demi-précoces comme le Patriot, le Collins...
- les variétés demi-saison comme le Bluejay, le Bluecrop...
- les variétés demi-tardives comme le Berkeley, le Jersey...
- les variétés très tardives comme le Darrow, l'Elliot...

#### 4.3. *Vaccinium macrocarpon* L. (4)

*Vaccinium macrocarpon* Ait. ou canneberge d'Amérique (Figure 12), résistant à de fortes gelées de moins 35°C et plus, est un arbrisseau ressemblant à la myrtille ; sa croissance est lente. Son fruit est une baie acidulée utilisée dans la prévention des récurrences d'infections urinaires car elle contient des molécules anti-adhésives des fimbriae d'*Escherichia coli* (bactérie intestinale pouvant être la cause d'infection urinaire).



Figure 12 : Aspect général du *Vaccinium macrocarpon* : fleurs, feuilles et fruits (83).

D'autres espèces de *Vaccinium* se rencontrent sur le continent américain, comme :

- *Vaccinium angustifolium* Ait. (Bleuet nain) qui est un buisson bas, inférieur à 50 cm, résistant au froid ;
- *Vaccinium ashei* Reade qui est un buisson haut (3 à 6 mètres), résistant à la sécheresse.

Il ya beaucoup d'autre espèces de *Vaccinium* que nous ne citerons pas ici.

## **II. Culture, récolte et production des myrtilles**

### **1. Culture : les exigences du sol et les conditions climatiques**

Comme nous l'avons vu précédemment, la myrtille de culture est différente de la myrtille sauvage, exigeant des conditions optimales pour une bonne production.

#### **1.1. pH du sol (49), (61)**

Le sol doit être acide, et même très acide pour permettre une croissance et un développement normal ainsi qu'une bonne réussite de culture : pH compris entre 4 et 5 voire 4 à 5,2 selon la littérature. Or, ce type de sol n'est pas fréquent en France. Le pH optimum est de 4,8. Si le pH dépasse 5,5, les plantes sont chlorotiques et il faut soit diminuer le pH, soit renoncer à une telle culture. Les sols humides doivent être évités car les racines sont très sensibles à l'asphyxie et le développement du système racinaire est limité.

#### **1.2. Conditions climatiques (49), (61)**

À la différence de la myrtille sauvage qui croit dans les landes et les sous-bois humides de demi-montagne où elle vit en colonie vers 1.000 mètres d'altitude, le myrtillier cultivé est une plante de plaine et de faible altitude qui préfère les endroits ensoleillés. Ainsi une exposition sud ou sud-ouest est conseillée mais il faut faire attention à la sécheresse. En raison des risques de gelées printanières, il faut éviter les lisières de bois ou la profondeur des vallées.

Cette plante peut être également cultivée en demi-montagne à une altitude comprise entre 600 et 800 mètres. Résistante au froid, elle peut supporter de basses températures jusqu'à -30°C. Bien qu'au cours de la floraison, les fleurs peuvent supporter des températures négatives (-5°C), il faut faire attention car les dégâts peuvent être très importants surtout sur les variétés sensibles. À l'opposé, le myrtillier craint la sécheresse en été et les vents secs.

#### **1.3. Besoins en eau (49), (61)**

La myrtille cultivée aime la proximité de la surface de la nappe phréatique mais craint les excès en eau. Ses besoins sont limités mais permanents tout le long de sa période de vie (au moins 1.000 mm d'eau durant l'été). Ceci peut s'expliquer par le développement très superficiel de son système racinaire et l'absence de poils absorbants. En Lorraine, par exemple, le système d'irrigation est le « goutte à goutte » localisé permettant d'apporter les doses nécessaires en eau et de limiter la contamination fongique. Les besoins en eau par semaine sont de 20 mm.

Ainsi, il faudra tenir compte de ces exigences pour choisir la meilleure exposition possible.

## 2. Récolte des myrtilles

### 2.1. Date et mode de récolte (49), (22)

La croissance de la plante étant lente, la récolte peut débuter la 2<sup>ème</sup> année après la plantation. La production augmente régulièrement jusqu'à la 8<sup>ème</sup> ou la 9<sup>ème</sup> année en rapport avec le développement végétatif. La date de récolte dépend beaucoup de la variété, de l'altitude, des températures printanières et du mode de récolte. Elle s'étend de mai à fin septembre, voire mi-juin pour les variétés les plus précoces et fin septembre pour les variétés les plus tardives. La récolte débute lorsque 20 % des baies sont mûres. En effet, si la récolte se fait trop tôt, les fruits ne sont pas mûres et seront de mauvaise qualité. En général, la récolte dure de 3 à 5 semaines, avec plusieurs passages successifs (un ou plusieurs par semaine) pour une même variété, au fur et à mesure de la maturation des fruits.

La récolte de la myrtille cultivée se fait manuellement, directement dans les barquettes pour éviter d'abîmer les fruits avec une manipulation supplémentaire. Ceci est différent pour la myrtille sauvage où la récolte se fait à l'aide d'un instrument que l'on nomme « peigne » (Figure 13) dont il existe divers modèles (en bois ou en fer) constitués d'une grille permettant d'arracher vite et en quantités importantes les baies en les emprisonnant entre les dents.



Figure 13 : Peigne utilisé pour la récolte des myrtilles sauvages (78).



### **3. Production des myrtilles**

#### **3.1. Production mondiale (61)**

Les Etats-Unis sont les premiers producteurs mondiaux de myrtilles suivis du Canada. Ces pays produisent deux types de myrtille : des myrtilles sauvages appartenant majoritairement à l'espèce *Vaccinium angustifolium*, qui se rapproche de la myrtille européenne, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. Son débouché est principalement la congélation et la transformation dont une partie est exportée en Europe.

Les myrtilles cultivées aux USA sont principalement composées de :

- *Vaccinium corymbosum*
- des hybrides entre *V. corymbosum* et *V. angustifolium*
- des hybrides entre *V. ashei* et *V. corymbosum*.

Ces myrtilles cultivées sont commercialisées majoritairement sur le marché intérieur et un faible tonnage est exporté en Europe et surtout en Australie.

En Europe de l'Est et en Scandinavie, la cueillette des myrtilles sauvages pour le commerce ou l'autoconsommation n'est pas négligeable.

#### **3.2. Production européenne (22), (61)**

C'est l'Allemagne qui détient les plus grandes surfaces de myrtilles cultivées, suivie par la France et les Pays-Bas. Elles sont aussi cultivées en Italie et au Portugal mais de façon moins importante.

Dans les pays scandinaves, la production est principalement constituée de *V. myrtillus*. Il faut noter que des quantités non négligeables de récolte sont le fait de cueillettes réalisées par des « pillards », des cultivateurs et enfin par des voyageurs, des particuliers ou des touristes qui consomment les myrtilles sur place pour leur plaisir.

#### **3.3. Production française (22), (61)**

En France, les Landes constituent la première zone de production des myrtilles cultivées suivies du Val de Loire, du Limousin, de la Sologne et des Vosges. La majorité des myrtilles cultivées au niveau national (1.300 à 1.500 tonnes/an) est destinée pour 95% des tonnages au marché du frais, et est exportée vers l'Allemagne où la consommation y est plus importante qu'en France, vers la Suisse, la Grande-Bretagne, l'Italie... et en importe de Suède, du Canada, de Pologne et de Roumanie.

En ce qui concerne les myrtilles sauvages, 1.500 à 2.000 tonnes sont récoltées en France. La principale zone de production est l'Ardèche, suivie du Massif central et des Vosges. Cette

récolte se fait au peigne par des personnes, cueilleurs, agriculteurs qui ont un « droit de cueillette ». La majorité des myrtilles sauvages récoltées est destinée à la transformation en gelées, confitures... par des ateliers d'exploitation ou par des entreprises proches des sites de production. Une faible quantité est destinée à la vente sur les marchés ou à des grossistes pour la restauration et les épiceries fines.

Les statistiques de 2001 ont récapitulé une production mondiale d'environ 190.000 tonnes (1.000 tonnes pour la France) avec près de 38.000 hectares cultivés aux Etats-Unis et au Canada.

## **4. Post-récolte**

### **4.1. Conservation (49), (61)**

Une fois les myrtilles récoltées, elles doivent être placées dans une chambre froide pour garder toutes ses qualités. L'idéal pour conserver le fruit intact pendant une dizaine de jours est de le stocker entre 8 et 10°C. Il gardera alors son parfum, l'arôme en sera même développé. Si on veut le conserver plus longtemps, il faut le soumettre à des températures plus basses. En effet, la congélation est un bon procédé de conservation pour ce fruit.

### **4.2. Conditionnement (61)**

Le conditionnement que l'on retrouve le plus souvent est la barquette en plastique fermée par un couvercle perforé. Ainsi, les myrtilles peuvent être conservées selon les conditions définies précédemment.

Le temps de stockage est amélioré par l'utilisation de films en polypropylène semi-perméables qui maintiennent le fruit sous atmosphère modifiée. Ces films peuvent, après sortie du froid, être gardés durant seulement 24 heures car au-delà, il peut y avoir des risques de développement de pourritures.

**Deuxième partie :**  
**Composition chimique**  
**de *Vaccinium myrtillus* L.**

## **I. Identification et composition chimique de *Vaccinium myrtillus***

### **1. Identification macroscopique et microscopique (43), (67)**

Du point de vue macroscopique, les feuilles de *V. myrtillus* sont alternes, caduques, ovales à elliptiques, pointues, courtement pétiolées et finement dentelées. Le bord de la feuille présente des poils sécréteurs pédicellés à l'extrémité de chaque dent, quelques fois brisés.

Du point de vue microscopique, la feuille présente des stomates paracytiques, des poils à parois épaisses sur la face supérieure des grandes nervures, des poils sécréteurs et des rangées de cellules à cristaux sur la nervure principale.

Du point de vue macroscopique, le fruit est une baie globuleuse d'un noir violacée, nettement déprimée au sommet, de la taille d'un petit pois. Cet examen doit se faire sur une baie intacte c'est-à-dire ni attaquée par des insectes, ni moisie. De plus, elle doit être molle car elle devient cassante si elle est stockée de façon prolongée.

L'examen microscopique est surtout caractérisé par la présence de cellules à cristaux du mésocarpe et de l'endocarpe. Le fruit frais broyé ou la poudre de fruit sec met en évidence la présence de macles de cristaux d'oxalate de calcium, des amas de cellules scléreuses de couleur rose violacé à parois canaliculées et des fragments jaune-brun du tégument séminal à paroi en forme de fer à cheval.

### **2. Composition chimique des feuilles et des fruits de *Vaccinium myrtillus***

#### **2.1. Composition chimique des feuilles (11), (67)**

Celle-ci renferme des tanins catéchiques (0,8% à 6,7%), des catéchols (épicatéchol, gallocatéchol, épigallocatéchol...) jusqu'à 10%, des proanthocyanidines (dimères du catéchol et d'épicatéchol), des flavonoïdes (hétérosides du quercétol : rhamnoglucosyl-, arabinosyl- et glucuronyl-quercétol ainsi que des hétérosides de kaempférol : astragaloside), des iridoïdes, des acides-phénols, surtout des acides chlorogéniques, et enfin des traces d'alcoïdes quinolizidiniques comme la myrtine et l'épimyrtine.

La bibliographie ancienne cite la présence d'arbutoside et d'hydroquinone, qui ne sont présents qu'à l'état de trace voire totalement absent. Ceci peut s'expliquer soit par la présence de chimiotypes, soit par une contamination des lots par des espèces proches qui ont le même habitat écologique comme *Vaccinium vitis-idaea* L. ou *Vaccinium x intermedium* Ruthe (hybride entre *V. myrtillus* et *V. vitis-idaea*) dans lesquels on retrouve de l'arbutoside, de l'hydroquinone libre et du pyroside (6-O-méthylarbutoside).

Enfin, la feuille contient de façon importante du chrome et du manganèse.

## **2.2. Composition chimique des fruits (11), (67)**

Le fruit de la myrtille est riche en eau (jusqu'à 90%), en oligosaccharides (3 à 7%), et en acides organiques (acide malique, citrique et quinique). Il contient des tanins, essentiellement des tanins catéchiques, des proanthocyanidols (dimère de catéchol et d'épicatéchol), une quinzaine d'hétérosides : les anthocyanosides qui sont des O-glucosides, des O-galactosides et des O-arabinosides en C-3 du cyanidol, péonidol, delphinidol, malvidol et pétunidol, des flavonoïdes (hétérosides de quercétol et kaempférol), des flavan-3-ols monomères (catéchol et épicatechol).

Enfin, on retrouve d'autres constituants comme les acides chlorogéniques, caféylquiniques, des acides phénols et des pectines. Les iridoïdes, quant à eux, ne sont présents que dans les fruits immatures.

## II. Anthocyanosides

Avant d'entrer dans les détails, il est important de connaître les principaux groupes de composés phytochimiques que l'on retrouve dans la plupart des fruits et des légumes (Tableau I).

Familles	Classes	Sous-classes
Polyphénols	Flavonoïdes	- <b>anthocyanidines</b> - flavones - flavanols - flavanones - flavonols - isoflavones - tanins
	acides phénoliques	- hydroxycinnamates - hydroxybenzoates
	non-flavonoïdes	- stilbènes - coumarines - lignans
Terpènes	- caroténoïdes - monoterpènes	
Composés soufrés	- allyl sulfides - isothiocyanates	
Saponines	- triterpénoïdes - stéroïdes	

Tableau I : Principaux composés des fruits et légumes (7).

### 1. Généralités sur les anthocyanes

Le terme anthocyane du grec « *anthos* » (signifiant fleur) et « *kyanos* » (bleu) est utilisé pour désigner la substance responsable de la coloration du bleuets. Ce terme s'applique à un groupe de pigments qui donnent la coloration rouge, rose, mauve, pourpre, bleue et violette de la plupart des fleurs et des fruits. Ces pigments existent sous deux formes : soit la forme hétéroside (anthocyanosides ou « *anthocyanins* » en anglais), soit sous la forme génine correspondante (anthocyanidols ou « *anthocyanidins* » en anglais). On connaît environ 400

anthocyanosides qui sont présents chez tous les Angiospermes, à l'exception des Caryophyllales où seule la famille des Caryophyllacées et des Molluginacées en contiennent. En effet, leur présence chez les Gymnospermes est rare. Comme nous l'avons vu, les anthocyanes sont responsables de la couleur des fleurs et des fruits mais peuvent également colorés les bractées, les feuilles, les pétioles, les racines voire même les bulbes comme dans l'oignon rouge. Cependant, ce sont dans les fruits que leur concentration est la plus élevée. Ils s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques sous forme de solution et de façon moins fréquente sous forme d'anthocyanoplastes (11). Selon Szajdek et coll. (58), les parois cellulaires et la chair ne contiennent presque pas d'anthocyanosides.

## **2. Structure des anthocyanosides**

Les anthocyanosides sont les pigments les plus importants des plantes visibles par l'œil humain. Ils appartiennent à une large classe de composés phénoliques que l'on appelle les flavonoïdes. Ce sont des glycosides des dérivés polyhydroxy et polymethoxy du 2-phénylbenzopyrylium, plus communément appelés cation flavylum.

Les différences existant entre les anthocyanosides individuels sont liées au nombre de groupe hydroxyl, à la nature et à la position d'attachement des sucres à la molécule, ainsi qu'au nombre et à la nature des acides aliphatiques ou aromatiques des sucres attachés à la molécule. Dix sept anthocyanosides et leurs aglycones naturellement présents dans les plantes sont connus. Cependant seulement six génines sont les plus fréquentes (voire quasiment universelles) dans les plantes supérieures. Il s'agit du cyanidol (50%), du pélargonidol (12%), du péonidol (12%), du delphinidol (12%), du pétunidol (7%) et du malvidol (7%) (Figure 14). Les glycosides de trois anthocyanidines non méthylés les plus largement répandus dans la nature sont la delphinidine, la cyanidine et la pélargonidine. Ils sont présents dans 80% des feuilles pigmentées, 69% des fruits et 50% des fleurs respectivement (33).

Dans les baies, les anthocyanosides sont retrouvés sous la forme de mono, di ou triglycosides où les résidus glycosides sont principalement liés à C-3 et moins fréquemment à C-5 ou C-7. Les sucres les plus courants sont le glucose, le galactose, le rhamnose, l'arabinose, le rutinose, le sambubiose et le sophorose. De plus, les glycosides des anthocyanosides sont souvent acylés par des acides comme les acides p-coumarique, caféique, férulique, et moins couramment par les acides p-hydroxybenzoïque, malonique ou acétique (58).

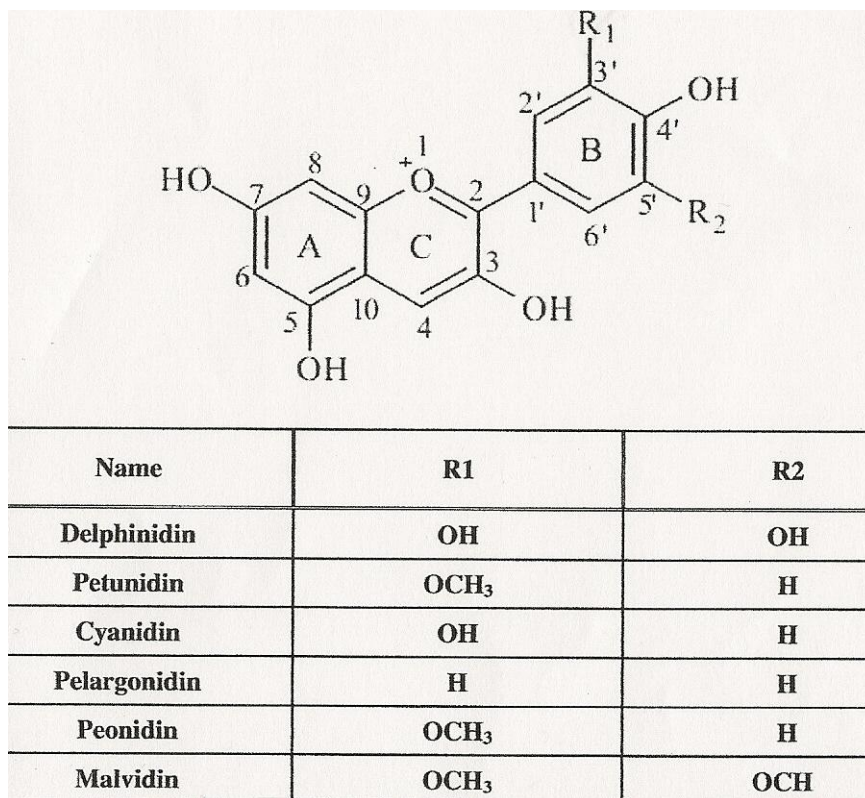


Figure 14 : Structure chimique des principaux anthocyanidines (65).

### 3. Propriétés physico-chimiques des anthocyanosides

Les anthocyanosides sont des pigments solubles dans l'eau ; ils sont instables à la lumière, à la température et à l'oxygène. Ils agissent en rapport au cation flavylum qui est à la fois un diacide faible et un bon électrophile. À pH très acide (< à 3), la forme cationique colorée en rouge est stable. À pH moins acide (entre 4 et 6), la molécule perd deux protons donnant une molécule neutre ou ionisée, devenant une forme quinonoïde colorée en bleu et stabilisée par résonnance. L'hydratation de la molécule conduit à la formation d'une « pseudo-base » carbinolique incolore, et si le pH augmente la molécule se transforme en phénate (forme ionisée), la structure anthocyanique étant détruite. Ainsi, les anthocyanosides en milieu neutre ou très peu acide, perdent leur coloration. Or, dans les vacuoles des cellules épidermiques, le pH est très rarement inférieur à 3. Sa coloration dans le milieu vivant peut donc s'expliquer par trois mécanismes qui permettent une protection ou une stabilisation de la molécule :

- soit un mécanisme par lequel les acides acylant les sucres forment un « sandwich » autour de la génine permettant une copigmentation intramoléculaire ;
- soit par une auto-copigmentation se traduisant par l'empilement intermoléculaire d'anthocyanosides se protégeant les uns avec les autres ;
- soit par une copigmentation avec les flavonoïdes (11).



## **4. Extraction, séparation et identification des anthocyanosides**

### **4.1. Extraction**

Les anthocyanosides sont solubles dans les solvants polaires et l'extraction à partir des plantes est réalisée en utilisant du méthanol qui contient de faibles quantités d'acide chlorhydrique ou d'acide formique. Il est préférable d'utiliser des acides plus faibles comme l'acide acétique, tartrique ou citrique, des acides volatils ou travailler en milieu neutre et à basse température pour empêcher la désacylation des anthocyanosides.

L'acétone peut aussi être utilisée pour l'extraction des anthocyanosides de plusieurs plantes. Par rapport au méthanol acidifié, l'usage de ce solvant a l'avantage d'être une technique plus efficace et reproductible.

L'extraction en phase solide peut être utilisée pour la purification initiale des extraits crus d'anthocyanosides (33).

### **4.2. Séparation et identification**

Pour la séparation et l'analyse de la structure des anthocyanosides, l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse permet de combiner la séparation de la chromatographie liquide avec la sensibilité et la sélectivité de la spectrométrie de masse (33). D'autres méthodes chromatographiques peuvent être utilisées pour leur séparation comme les colonnes de polyamide, de polyvinylpyrrolidone, les résines échangeuses d'ions, la chromatographie sur couche mince préparative sur cellulose (10). L'analyse des plantes à anthocyanosides peut être réalisée par la chromatographie liquide associée à un détecteur à barrettes de diodes. Cette analyse peut être faite par l'électrophorèse capillaire qui selon Szajdek et coll. (58) est une méthode avec une très bonne sensibilité, une haute résolution couplée à une basse consommation d'échantillon et enfin un moindre « gaspillage » des solvants utilisés.

D'autres méthodes plus perfectionnées ne peuvent être utilisées que par des laboratoires de recherche.

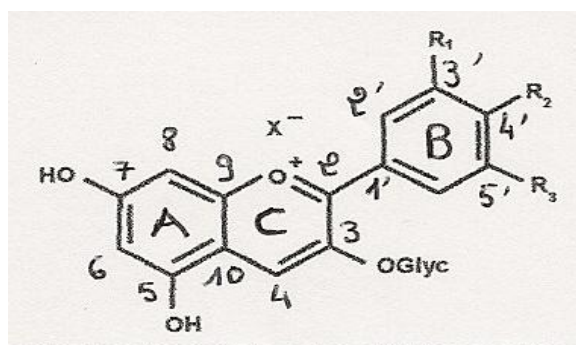
### **4.3. Dosage des anthocyanosides**

Le dosage se fait par spectrophotométrie aux longueurs d'onde des maximums d'absorption des anthocyanosides ( $\lambda = 520$  nm). Il peut être fait sur une solution alcoolique acide ou sur un jus acidifié. Dans tout les cas, il faut le faire en milieu très dilué pour empêcher les molécules d'anthocyanosides de s'associer les unes avec les autres (11).

## 5. Anthocyanosides de *Vaccinium myrtillus*

### 5.1. Composition en anthocyanosides

Les baies de *V. myrtillus* contiennent environ quinze anthocyanosides ; ces hétérosides sont des O-glucosides, des O-galactosides et des O-arabinosides en C-3 du cyanidol, du péonidol, du delphinidol, du malvidol et du pétunidol (Figure 15).



ANTHOCYANIDIN	Delphinidin	OH	OH	OH	H
	Cyanidin	OH	OH	H	H
	Petunidin	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	H
	Peonidin	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
	Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
ANTHOCYANIN	Delphinidin-3-O-glucoside	OH	OH	OH	 Glucosyl
	Cyanidin-3-O-glucoside	OH	OH	H	
	Petunidin-3-O-glucoside	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	
	Peonidin-3-O-glucoside	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
	Malvidin-3-O-glucoside	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	
	Delphinidin-3-O-galactoside	OH	OH	OH	 Galactosyl
	Cyanidin-3-O-galactoside	OH	OH	H	
	Petunidin-3-O-galactoside	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	
	Peonidin-3-O-galactoside	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
	Malvidin-3-O-galactoside	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	
	Delphinidin-3-O-arabinoside	OH	OH	OH	 Arabinosyl
	Cyanidin-3-O-arabinoside	OH	OH	H	
	Petunidin-3-O-arabinoside	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	
	Peonidin-3-O-arabinoside	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
	Malvidin-3-O-arabinoside	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	

Figure 15 : Structure chimique des anthocyanosides et anthocyanidines des fruits de *V. myrtillus* (14).

## 5.2. Données quantitatives

*Vaccinium myrtillus* contient une quantité importante d'anthocyanosides (300 à 698 mg/100 g). L'équipe de Prior et coll. (50) a montré que la quantité d'anthocyanosides augmente avec la maturité du fruit lors de la récolte.

Burdulis et coll. (12) ont étudié la diversité des anthocyanosides du fruit de *V. myrtillus* dans différents pays comme la Lituanie, la Suède, la Russie et la Biélorussie ainsi que dans différentes régions de Lituanie comme Šilutė. Les quantités les plus élevées en anthocyanosides ont été retrouvées dans les baies ramassées en Russie et en Suède. Ces résultats sont liés à la cueillette tardive des baies et à l'emplacement plus au nord des cultures ; en effet, les baies étaient plus mûres et avaient donc une plus haute teneur en anthocyanosides. Par contre, la quantité en Biélorussie et en Lituanie est similaire.

## 5.3. Données qualitatives

Dans la même étude que précédemment, Burdulis et coll. (12) ont observé que l'analyse chromatographique ne révèle pas de différence dans la composition qualitative des anthocyanosides. Les quantités les plus élevées sont représentées par la cyanidine (quantité moyenne de 53 ng/ml), suivie de la delphinidine et la pétonidine en quantité 2,5 fois plus faible que la cyanidine, et pour terminer la malvidine et la péonidine en quantité encore plus faible. En Suède, seule la malvidine a été retrouvée en plus grande quantité parmi tous les anthocyanosides (1,5 fois plus élevée que celle de la pétonidine et la delphinidine).

## 5.4. Distribution des anthocyanosides dans *Vaccinium myrtillus*

Riihinen et coll. (53) ont étudié la distribution des composés phénoliques dans les différents organes de *V. myrtillus* et d'un hybride entre le *V. corymbosum* et *V. angustifolium*.

Ainsi, les anthocyanosides sont présents dans la pulpe et la peau des fruits de *V. myrtillus*, constituant 2% du poids frais de la peau de la baie ; cela indique que l'extraction du jus à partir de la peau pourrait être une source riche d'anthocyanosides. Les feuilles rouges des myrtilles ont de faibles quantités d'anthocyanosides et ne contiennent que des glycosides de cyanidine alors que les fruits contiennent les cinq types d'anthocyanosides (delphinidine, cyanidine, péonidine, pétonidine et malvidine-glycosides). Les feuilles sont donc des sources moins intéressantes pour l'utilisation nutraceutique et pharmaceutique que les fruits.

### 5.5. Pharmacocinétique des anthocyanosides de *Vaccinium myrtillus*

Des études ont été réalisées sur la pharmacocinétique des anthocyanosides à partir d'un produit commercial : le Myrtocyan<sup>®</sup>. Celui-ci est un extrait hautement purifié de baies de *Vaccinium myrtillus* dans lequel les anthocyanosides sont les composants actifs les plus importants (36%).

Lorsque l'extrait est injecté chez le rat par voie intraveineuse ou parentérale, aux doses de 20-40 mg/kg ou 25 mg/kg respectivement, les anthocyanosides disparaissent de la circulation sanguine et sont distribués rapidement dans les tissus. L'élimination se fait de façon prédominante par les urines (25-30%) 24 heures après l'administration et une plus faible quantité est éliminée *via* la bile (15-20%).

Le Myrtocyan<sup>®</sup>, injecté par voie intrapéritonale à la dose de 200 mg/kg, montre que les anthocyanosides ont une affinité particulière pour certains tissus, notamment les tissus rénaux et cutanés ; dans ces tissus, les anthocyanosides y demeurent plus longtemps que dans le plasma. Cette observation pourrait expliquer leur effet biologique à long terme.

L'administration orale de Myrtocyan<sup>®</sup> à la dose de 400 mg/kg chez le rat montre que les anthocyanosides sont rapidement absorbés par le tractus gastro-intestinal et atteignent un pic plasmatique quinze minutes après l'administration. Par contre, ils ne demeurent pas longtemps dans le sang car aucune concentration ne peut être mesurée après deux heures. Par voie orale, environ 4% des anthocyanosides sont éliminés par la bile après 24 heures.

En conclusion, par voie orale, la biodisponibilité faible des anthocyanosides peut être due à une forte métabolisation hépatique en métabolites non détectables par la méthode analytique. Le pic plasmatique de 2-3 µg/ml d'anthocyanosides non modifiés pourrait être suffisant pour garantir les effets biologiques des anthocyanosides après une administration orale. Enfin, des tests *in vitro* ont reporté une activité des anthocyanosides à des concentrations de 2 à 7 µg/ml (43).

En 2006, Ichiyanagi et coll. (28) ont étudié la biodisponibilité et la distribution dans les tissus d'un autre extrait de *V. myrtillus* (Bilberon 25<sup>®</sup>, constitués de 25 anthocyanosides) administré oralement ou par voie intraveineuse à des rats.

Pour rappel, les aglycones sont de cinq types : la cyanidine, la delphinidine, la pétunidine, la péonidine et la malvidine.

Seules la malvidine, la péonidine et la pétunidine sont des structures aglycones méthylés ; ces anthocyanidines sont glycosylées pour former les anthocyanosides qui représentent une structure beaucoup plus stable. Trois sortes de sucres sont rattachées à la structure : le glucose, le galactose et l'arabinose.

Ainsi, le niveau plasmatique de chaque anthocyanoside est évalué par chromatographie liquide haute performance. L'étude montre clairement que l'absorption, le métabolisme et l'élimination sont différents pour chaque anthocyanoside. Ichiyanagi et coll. (27) ont calculé le rapport  $C_{15}/\text{dose}$  défini par la concentration plasmatique de chaque anthocyanoside quinze minutes après administration orale divisée par sa concentration initiale dans l'extrait de Bilberon 25<sup>®</sup> (soit le rapport  $C_{15}/\text{dose}$ ). La comparaison de ces rapports a montré que pour les anthocyanosides possédant le même aglycone, les galactosides ont un rapport  $C_{15}/\text{dose}$  plus important, suivi des glucosides et des arabinosides, à l'exception de la malvidine. La différence est significative entre les anthocyanosides glucosides et galactosides. Par contre, lorsque les anthocyanosides portant le même sucre sont comparés, les glycosides de cyanidine et delphinidine présentent des valeurs plus élevées que les glycosides de malvidine et pétunidine, alors que la péonidine 3-O- $\beta$ -D-galactoside affiche les valeurs les plus hautes parmi tous les anthocyanosides.

En conclusion, les niveaux plasmatiques dépendent de plusieurs facteurs tels que l'absorption gastro-intestinale, le taux de distribution dans les tissus et leur excrétion *via* les urines et la bile.

La demi-vie est évaluée par administration intraveineuse de l'extrait ; pour les anthocyanosides portant le même sucre, les demi-vies de la delphinidine et de la cyanidine sont plus élevées que leurs analogues O-méthylés comme la malvidine, la péonidine et la pétunidine. Par contre, lorsque les auteurs comparent les sucres portés par le même aglycone, aucune différence significative n'est observée entre les galactosides et les glucosides mais les arabinosides affichent des valeurs plus faibles. Seule la malvidine ne présente pas de différence significative entre galactoside et arabinoside, comparée aux autres anthocyanidines. Ichiyanagi et coll. (28) ont évalué la biodisponibilité de chaque anthocyanoside. Celle-ci varie de 0,61% à 1,82% et elle est de 0,93% dans le mélange de l'extrait Bilberon 25<sup>®</sup>. Ainsi, la biodisponibilité des anthocyanosides O-méthylés comme la malvidine, la pétunidine et la péonidine est plus élevée que la delphinidine et la cyanidine, particulièrement pour les galactosides (différence significative entre la cyanidine et la péonidine galactoside et entre la delphinidine et la pétunidine arabinoside). Cependant, les biodisponibilités des glycosides de pétunidine sont plus élevées que celles des glycosides de malvidine même si la malvidine est l'analogue O-méthyl de la pétunidine-glycoside. Ainsi, la biodisponibilité importante des glycosides de pétunidine pourraient être expliquée par une absorption gastro-intestinale prolongée. De plus, l'exceptionnelle forte biodisponibilité de la péonidine 3-O- $\beta$ -D-galactoside traduirait une absorption gastro-intestinale plus efficace. Lorsque les auteurs

comparent la biodisponibilité entre les anthocyanosides sur la base du type de sucre attaché à la structure, les galactosides présentent la plus haute valeur, suivis des arabinosides puis des glucosides qui présentent les valeurs les plus basses (à l'exception de la delphinidine et de la malvidine).

Ces études sur le métabolisme et l'excrétion des anthocyanosides montrent que les anthocyanosides majoritairement retrouvés dans l'urine et la bile sont les glycosides de péonidine et malvidine c'est-à-dire des anthocyanosides O-méthylés. Les pourcentages des anthocyanosides dans les urines et la bile durant les quatre premières heures après administration intraveineuse sont seulement de 30,8% et 13,4% respectivement, suggérant une métabolisation ou une accumulation des anthocyanosides dans les tissus. La quantité et la nature des anthocyanosides dans le foie et les reins diffèrent de ceux du mélange Bilberon 25<sup>®</sup>, indiquant une métabolisation hépatique et rénale. De plus, l'apparition de nouveaux pics montrés par la chromatographie liquide haute performance souligne la présence de métabolites d'anthocyanosides.

En ce qui concerne la distribution dans les tissus, les auteurs ont montré, qu'après 15 minutes d'une administration orale de l'extrait de *V. myrtillus*, les anthocyanosides retrouvés majoritairement dans les reins et le foie sont des glycosides de péonidine et de malvidine ; les anthocyanosides détectés sont des glucosides et galactosides de péonidine, malvidine et pétunidine, des métabolites 4'-O-méthyl de cyanidine, delphinidine et pétunidine 3-O-β-D-glucoside ou galactoside, alors que les arabinosides ne sont pas détectés à l'exception du 4'-O-méthyl delphinidine 3-O-α-L-arabinoside. Les métabolites comme les glucosides-glucuronides de cyanidine et de delphinidine sont aussi présents dans les tissus, particulièrement au niveau rénal.

Après administration intraveineuse, les glycosides de cyanidine et delphinidine sont présents à l'état de traces dans les tissus.

Pour conclure, plusieurs points ont pu être établis et clarifiés ; premièrement, tous les anthocyanosides de l'extrait atteignent leur niveau plasmatique maximum en 15 à 30 minutes après administration orale, soulignant une absorption efficace au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle. Cette absorption dépend du type de sucre attaché à l'aglycone, les galactosides étant par exemple plus efficacement absorbés que les arabinosides. Deuxièmement, la biodisponibilité dépend de plusieurs facteurs comme le métabolisme, l'hydrophobicité du cycle B de l'aglycone et le type de sucre attaché à la structure. De plus, la synergie entre anthocyanosides eux-mêmes ou anthocyanosides avec d'autres composants présents dans l'extrait peuvent moduler l'absorption au niveau du tractus gastro-intestinal.

Sakakibara et coll. (54) ont étudié la distribution et l'excrétion des anthocyanosides chez la souris après une administration orale de 100 mg/kg de poids corporel de *V. myrtillus*.

Les anthocyanosides absorbés sous leur forme initiale ou méthoxylée, quinze minutes après une administration orale, sont éliminés *via* les urines dans les vingt quatre heures. La totalité des anthocyanosides atteignent une concentration plasmatique maximale d'environ 1,2  $\mu$ M quinze minutes après administration orale puis cette concentration diminue brusquement. Les glycosides de malvidine pourraient être les anthocyanosides majoritaires dans des conditions physiologiques ; en effet, les anthocyanosides méthoxylés ont des propriétés leur permettant de demeurer dans l'organisme après absorption. De plus, les glycosides de delphinidine et cyanidine subissent une méthylation pouvant donner les glycosides de péonidine et malvidine ; par conséquent, les anthocyanosides méthoxylés peuvent être produits par la conversion d'autres anthocyanosides, également absorbés.

L'excrétion urinaire des anthocyanosides après administration de 500 mg/kg de poids corporel de l'extrait de *V. myrtillus* a montré que les anthocyanosides sont éliminés dans l'urine dans les six premières heures après administration orale. De faibles quantités sont éliminées entre 6 et 24 heures dont un unique pic d'excrétion entre 6 et 12 heures. Les quantités d'anthocyanosides excrétées dans l'urine dans les 24 heures suivant l'administration sont faibles et ne représentent que 1,88% des anthocyanosides totaux ingérés. Par conséquent, quelque soit les quantités d'extrait administrées, les anthocyanosides absorbés par le corps sont excrétés par voie urinaire en 24 heures.

L'étude de la distribution des anthocyanosides dans les organes a été réalisée sur des souris ayant une alimentation contenant 0,5% des anthocyanosides de *V. myrtillus* durant 2 semaines. Ce sont les glycosides de malvidine (surtout le 3-glucoside et 3-galactoside de malvidine) les anthocyanosides majoritairement présents dans des organes tels que le foie, les reins, les testicules et les poumons. L'étude de Sakakibara et coll. (54) est la première à avoir montré la présence des anthocyanosides dans les testicules de souris.

Les auteurs montrent aussi que le foie est sûrement l'organe cible des anthocyanosides car 51,5% y sont localisés. Par contre, les anthocyanosides n'ont pas été détectés dans la rate, le thymus, le cœur, les muscles, le cerveau, la graisse blanche ou les yeux.

Chez l'homme, la plupart des études montrent une faible biodisponibilité des anthocyanosides (faible taux d'excrétion) (3).

Cooke et coll., en 2006 (18), ont démontré la présence dans l'urine d'anthocyanosides sous forme inchangée et de glucuronides d'anthocyanidines (métabolites) après une administration orale de Mirtoselect<sup>®</sup>. La présence de glucuronides d'anthocyanidines dans l'urine suggère

une transformation des anthocyanosides en leurs dérivés non glycosylés, lesquels subiront plus tard une biotransformation. Les anthocyanidines sont suspectées pour avoir une meilleure activité biologique que leurs précurseurs glycosylés.

### **III. Autres composés phénoliques de *Vaccinium myrtillus***

#### **1. Acides phénoliques**

Les acides phénoliques dans les fruits des baies sont représentés par des dérivés d'acide cinnamique et benzoïque. Le groupe des dérivés d'acide benzoïque inclut les acides p-hydroxybenzoïque, salicylique, gallique et ellagique. Dans le groupe des dérivés d'acide cinnamique, on trouve les acides p-coumarique, caféique et férulique. Les dérivés d'acide hydroxycinnamique sont représentés par des dérivés d'acide caféique comme les acides chlorogénique et néochlorogénique. Dans *Vaccinium myrtillus*, des quantités significatives d'acides p-coumarique et férulique sont retrouvées. L'acide hydroxycinnamique se trouve dans tous les organes de la myrtille mais les quantités les plus importantes sont retrouvées dans les feuilles ; il est le principal composé phénolique du rhizome. Cet acide hydroxycinnamique joue un rôle dans la protection de la plante vis-à-vis d'agents pathogènes et d'autres facteurs de stress comme une radiation solaire intense, une basse température ou une blessure (58).

#### **2. Tanins**

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles importants dans les fruits des baies. Ils sont de deux types :

- les tanins hydrolysables (oligo- ou polyesters d'un sucre et d'un nombre variant de molécules d'acide-phénol). Le sucre est le plus souvent le glucose et l'acide-phénol est soit l'acide hexahydroxydiphénique et ses dérivés d'oxydation pour les tanins ellagiques, soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques.

- les tanins non hydrolysables condensés sont des polymères flavaniques, constitués d'unités flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. On les appelle également les proanthocyanidols, qui en milieu acide et à chaud, donnent des anthocyanidols (11).

Les tanins donnent le goût aux tartes et sont responsables du changement de couleur des fruits et des produits dérivés des fruits. Le goût des tartes résulte de l'interaction entre les tanins et les récepteurs gustatifs de la bouche. De plus, les tanins stabilisent les anthocyanosides,



présents en quantité importante dans le fruit de la myrtille, en se liant à eux pour former des copolymères (58).

Dans *V. myrtillus*, les feuilles vertes et rouges sont les meilleures sources de procyanidines. Leurs proportions dans les feuilles sont d'environ 7% du poids sec ; il conviendrait donc d'apporter un intérêt aux feuilles, qui actuellement lors de la récolte et du traitement des fruits, constituent des déchets alors que ce sont des parties de la plante riche en proanthocyanidines connus pour leurs activités antimicrobiennes et antioxydantes (53).

### **3. Flavonols**

Les flavanols sont représentés par la quercétine, la myricétine, le kaempférol et l'isorhamnétine, abondants dans les plantes alimentaires comme l'oignon, le thé, les pommes et les baies.

Le fruit de *V. myrtillus* contient de façon prédominante de la quercétine ; également présent avec le kaempférol dans les feuilles. Cependant, leur proportion est plus importante dans les feuilles rouges que dans les feuilles vertes car les radiations solaires augmentent leur quantité (on peut supposer un rôle dans la photoprotection) (58).

### **4. Autres composés retrouvés en minorité dans *Vaccinium myrtillus***

Les stilbènes sont un groupe de composants qui inclut notamment le resvératrol retrouvé initialement dans les grappes de raisin. De petites quantités de trans-resvératrol ont été retrouvées dans les baies et notamment dans la myrtille (de l'ordre de 6,78 µg/g). Cette plante contient également de petites quantités de caroténoïdes (58).

Autres ces composés phénoliques, la myrtille est également constituée d'un ensemble de micro- et macronutriments répertorié dans la table de composition nutritionnelle des aliments du Ciqual (centre d'information sur la qualité des aliments) 2008 de l'Afssa (71) (Annexe I).

**Troisième partie :**  
**Intérêts thérapeutiques**  
**de *Vaccinium myrtillus* L.**

En Europe, les baies et les feuilles de myrtille ont largement été utilisées dans la médecine populaire ; les baies, pour leurs propriétés astringentes, toniques et antiseptiques, dans le traitement de la diarrhée, la dysenterie (maladie infectieuse du côlon), les hémorroïdes, les inflammations gastro-intestinales et les infections buccales (stomatites, aphtes, muguet des enfants). Elles sont également utilisées pour les désordres urinaires. Quant aux feuilles, elles étaient particulièrement utilisées dans le diabète grâce à leurs propriétés hypoglycémiantes. En application locale, une infusion ou une décoction de feuilles de myrtilles étaient utilisées lors d'inflammations oculaires, buccales, d'infections cutanées et dans les brûlures.

À partir du XVIII<sup>ème</sup>, des herboristes utilisaient la baie de myrtille dans des préparations pour traiter certaines maladies intestinales incluant la fièvre typhoïde ; elle était aussi utilisée dans les infections buccales, cutanées, urinaires, dans la goutte et le rhumatisme (43). Les usages validés par la Note explicative de l'Agence du médicament (1998) et la Commission E seront développés dans la dernière partie de cette thèse.

La myrtille intéresse encore actuellement les scientifiques et fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ; elle est aussi présente dans quelques études cliniques. Certaines de ces études seront répertoriées dans les chapitres qui vont suivre.

## **I. Action de *Vaccinium myrtillus* dans le domaine vasculaire**

### **1. Effet anti-agrégant et vasodilatateur**

#### **1.1. Effet anti-agrégant plaquettaire**

En 1990, Morazzoni et coll. (44) ont étudié l'activité *in vivo* et *in vitro* d'un complexe d'anthocyanosides de *V. myrtillus* dont le nom déposé est Myrtocyan<sup>®</sup> (contenant environ 38% d'anthocyanosides) sur l'activité plaquettaire, en comparaison avec d'autres anti-agrégants plaquettaires comme l'acide acétylsalicylique, le dipyridamole et la ticlopidine. L'étude *in vitro* sur plasma de lapin montre un effet inhibiteur de *V. myrtillus* sur l'agrégation plaquettaire induite par l'adénosine diphosphate (ADP), le collagène et l'arachidonate de sodium (sel d'acide arachidonique) ; cette inhibition est fonction de la concentration en anthocyanosides. Cette activité est comparable à celle du dipyridamole mais est moins efficace que celle de l'acide acétylsalicylique. Toutefois, les anthocyanosides de la myrtille et le dipyridamole sont tous les deux efficaces pour inhiber l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP exogène alors que l'acide acétylsalicylique n'a pas montré d'activité. L'effet anti-agrégant plaquettaire des anthocyanosides de *V. myrtillus* perdure après certaines manipulations chimiques et physiques comme l'ébullition pendant cinq minutes, le chauffage

pendant trente minutes à 56°C, la digestion à la trypsine et l'incubation en présence d'adénosine phosphate.

L'action *in vitro* des anthocyanosides de *V. myrtillus* sur la circulation sanguine chez le rat montre une inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP de manière dose-dépendante et par voie artérielle.

*In vivo*, l'administration orale du complexe anthocyanosidique de *V. myrtillus* à une concentration variant de 5 à 400 mg/kg chez le rat montre une augmentation du temps de saignement. Cette activité du complexe perdure pendant 24 heures (même observation avec l'association acide acétylsalicylique-dipyridamole), et le temps de saignement retourne à des valeurs normales après 48 heures. Par contre, cette augmentation du temps de saignement n'a pas donné d'effet, ni sur l'hématocrite, ni sur les voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation sanguine.

L'administration orale de 400 mg/kg du complexe anthocyanosidique de myrtille à des souris deux heures avant l'étude diminue l'adhésion plaquettaire, cette action étant similaire à celle observée avec 100 mg/kg de ticlopidine administrés dans les mêmes conditions expérimentales.

Morazzoni et coll. (44) ont également étudié l'activité *in vitro* d'un produit composé des trois principaux anthocyanosides (malvidine 3-O-glucoside, cyanidine 3-O-glucoside et delphinidine 3-O-glucoside) trouvés dans l'extrait Myrtocyan<sup>®</sup> afin de comprendre leur impact sur l'effet anti-agrégant. Ce mélange montre la même activité inhibitrice sur l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, le collagène et l'arachidonate de sodium que l'extrait Myrtocyan<sup>®</sup>. Notons que les anthocyanosides du produit reconstitué sont retrouvés avec le même ratio que ceux de l'extrait.

Une étude clinique incluant 30 patients en bonne santé avec une agrégation plaquettaire normale a démontré la capacité d'anthocyanosides de myrtille, Myrtocyan<sup>®</sup>, administré pendant 30 et 60 jours à la dose de 480 mg/jour seul ou en association avec l'acide ascorbique (3 g/jour), à réduire l'agrégation plaquettaire induite par le collagène ou l'ADP. La meilleure activité est détenue par Myrtocyan<sup>®</sup> seul ou associé à l'acide ascorbique comparée à la vitamine C seule (5).

En conclusion, l'extrait de *V. myrtillus* riche en anthocyanosides a montré une forte inhibition de l'agrégation plaquettaire dans des expériences *in vivo et in vitro*, sans interférer avec les facteurs plasmatiques. L'activité des trois principaux anthocyanosides de l'extrait Myrtocyan<sup>®</sup> a permis de mettre en évidence leur forte implication dans l'effet anti-agrégant plaquettaire. De plus, l'un des mécanismes le plus important dans l'inhibition plaquettaire est

l'augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMP cyclique) soit par stimulation de l'adénylate cyclase soit par inhibition de l'AMP cyclique-phosphodiesterase. Or, il a été observé que les aglycones de l'extrait Myrtocyan<sup>®</sup> sont des inhibiteurs potentiels de l'AMP cyclique-phosphodiesterase de plusieurs tissus. Ce mécanisme n'est pas le seul car un autre a été proposé ; il concernerait les anthocyanidines (principalement la delphinidine et la cyanidine) qui affecteraient les fonctions plaquettaires par leur action antioxydante ; cette action se ferait en interférant avec les processus membranaires cellulaires incluant les étapes initiales plaquettaires et la production des prostaglandines des cellules endothéliales.

### **1.2. Effet vasodilatateur et relaxant des artères coronaires**

Les anthocyanosides de *V. myrtillus* (Myrtocyan<sup>®</sup>) sont couramment utilisés comme agents vasoprotecteurs, inhibant l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus. De plus, il a été montré que les anthocyanosides de myrtille administrés *per os* (100 mg/kg p.c.) réduisent la réponse contractile du muscle lisse vasculaire et montrent une activité prostacycline-like (PGI<sub>2</sub>-like) (45). Cette étude est en accord avec celle de Bettini et coll. (9) qui ont montré que les anthocyanosides de *V. myrtillus* ont un effet relaxant *in vitro* pouvant être médié par la stimulation de la synthèse de prostaglandines vasodilatatrices dans les vaisseaux sanguins.

En conclusion, à l'inverse de l'acide acétylsalicylique qui *in vivo* réduit la production artérielle de PGI<sub>2</sub>, en agissant comme un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, les anthocyanosides de *V. myrtillus* stimulent la production d'une substance PGI<sub>2</sub>-like par le tissu vasculaire.

Les anthocyanosides de myrtille comme d'autres bioflavonoïdes s'opposent à la contraction de plusieurs types de muscles lisses en réponse à des agents variés comme l'angiotensine II, la sérotonine, le baryum, l'histamine ou l'acétylcholine. En effet, l'acétylcholine à des concentrations variant de 1 à 2 ng/ml induit une relaxation dans toutes les préparations alors qu'à hautes concentrations elle induit une contraction (9).

Bettini et coll. (9) ont recherché également l'effet vasodilatateur du complexe dans les préparations traitées avec du bleu de méthylène connu pour bloquer la libération du facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF ou endothelium-derived relaxing factor), qui est une substance vasodilatatrice.

Le Myrtocyan<sup>®</sup>, à une concentration entre 50 et 200 µg/ml réduit la réponse contractile des artères coronaires à l'acétylcholine ; cette activité est d'autant plus marquée lorsque l'acide ascorbique est ajouté (100-300 µg/ml). Mais cet effet est diminué en présence d'indométacine ou d'acétylsalicylate de lysine connus pour être des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase. A des

concentrations entre 1 et 2 µg/ml, ces deux substances n'affectent pas la diminution du tonus induite par Myrtocyan<sup>®</sup>, alors qu'à des concentrations plus élevées, elles le réduisent sans toutefois l'abolir complètement, même aux plus fortes concentrations.

Une autre expérience de cette étude consiste à traiter les segments des artères coronaires avec du bleu de méthylène connu pour bloquer la libération de l'EDRF. Selon la concentration, le bleu de méthylène a plusieurs effets : entre 1 et 8 µg/ml, il ne modifie pas le tonus des préparations ; entre 8 et 18 µg/ml, il ne provoque qu'une lente augmentation du tonus de plusieurs préparations alors qu'entre 18 et 24 µg/ml, il induit une réelle augmentation du tonus des artères coronaires suivie d'une relaxation assez marquée. L'effet des anthocyanosides de *Vaccinum myrtillus* a été étudié après disparition de l'effet du bleu de méthylène ; son effet relaxant perdure partiellement malgré le pré-traitement au bleu de méthylène.

En conclusion, l'effet vasodilatateur de Myrtocyan<sup>®</sup> dépend à la fois de la libération des prostacyclines mais aussi d'une facilité à libérer l'EDRF ; les prostacyclines et l'EDRF sont probablement les médiateurs fonctionnels des anthocyanosides de *V. myrtillus*.

## **2. Activité vasoprotectrice**

### **2.1. Action sur la perméabilité capillaire et activité anti-protéasique**

Une préparation d'anthocyanosides de *V. myrtillus* équivalant à 25% d'anthocyanosides, administrée par voie intrapéritonéale ou per os à des lapins montre une réduction de la perméabilité capillaire de la peau (augmentant avec le temps) préalablement stimulée par le chloroforme, l'histamine ou la bradykinine (36).

Jonadet et coll. (29) ont comparé sur des rats l'activité angioprotectrice des anthocyanosides extraits de *Vitis vinifera* L., de *V. myrtillus* (Difrel<sup>®</sup>), et de *Pinus maritimus* (appelé maintenant *Pinus pinaster* Aiton). Ainsi, l'activité angioprotectrice des anthocyanosides est par ordre décroissant la suivante : anthocyanosides de *Vitis vinifera* > anthocyanosides de *V. myrtillus* > proanthocyanosides de *Pinus maritimus*. Les auteurs soulignent que les anthocyanosides agissent à travers une activité anti-protéasique, démontrée *in vitro*. En effet, ils ont montré que les anthocyanosides des extraits préalablement cités possèdent des activités inhibitrices vis-à-vis d'enzymes protéolytiques comme l'élastase, laquelle peut intervenir dans la dégradation du tissu conjonctif, des fibres élastiques, et jouerait un rôle dans des affections pathologiques comme l'athérosclérose, l'emphysème pulmonaire et l'arthrite rhumatoïde. Les anthocyanosides apportent cette activité anti-protéasique en inhibant la libération des peptides

vasoactifs. En effet, l'une des causes de l'augmentation de la perméabilité capillaire est l'intervention de médiateurs chimiques comme l'histamine, la 5-hydroxytryptamine et les kinines. Enfin, Jonadet et coll. (29) ont reporté une activité anti-trypsique et anti-chymotrypsique (protéases digestives) des substances pharmacologiques des extraits étudiés.

## **2.2. Action sur la résistance capillaire**

Lietti et coll. (36) ont démontré dans une expérience l'intérêt des anthocyanosides de *Vaccinum myrtillus* sur la résistance vasculaire. Pour cela, ils les administrent par voie intrapéritonéale à des rats préalablement alimentés pendant 4 semaines avec une alimentation déficitaire en facteur P, induisant ainsi une fragilité capillaire. Après mesure à plusieurs heures de la résistance capillaire, les résultats montrent une élévation remarquable de la résistance capillaire de la peau, induite par les anthocyanosides de *V. myrtillus*. L'activité est maximale 4 heures après le traitement et ne change pas après 6 heures. Cette activité est comparée avec celle de la rutine (substance de la famille des bioflavonoïdes), laquelle montre un effet comparable à 200 mg/kg mais qui à 100 mg/kg n'est presque plus efficace.

## **2.3. Action sur la formation d'un œdème**

Dans la même étude que précédemment, Lietti et coll. (36) ont montré que l'administration des anthocyanosides de *V. myrtillus* dans la patte de rats par voie intraveineuse et par voie orale, respectivement 15 et 60 minutes précédant l'injection de carragénine (substance induisant un œdème), entraîne une diminution de l'œdème formée de manière dose-dépendante. En effet, l'utilisation de 200 mg/kg de préparation est plus efficace que 50 mg/kg sur le volume de l'œdème. La dose de 200 mg/kg permet une réduction de l'œdème à 45%. L'application topique de la préparation 60 secondes suivant l'injection de carragénine induit également une réduction du volume de l'œdème à 39%. Cette étude montre l'action anti-inflammatoire de *V. myrtillus*.

Les études *in vivo* réalisées sur des animaux montrent que les anthocyanosides de *V. myrtillus* sont vasoprotecteurs, ils inhibent l'augmentation de la perméabilité capillaire, augmentent la résistance vasculaire et réduisent le volume de l'œdème de manière dose-dépendante et ses activités perdurent dans le temps. De plus, ils sont plus efficaces que la rutine ou la mépyramine (substance antisérotoninergique et antihistaminergique). Enfin, les anthocyanidines restent longtemps dans les tissus de la peau riche en collagène et en mucopolysaccharides. C'est pourquoi, il serait intéressant de mettre en place des expériences

pour étudier la relation entre ces substances et les anthocyanosides, afin de voir si ce lien pourrait expliquer l'activité pharmacologique exercée sur les vaisseaux sanguins (36).

#### **2.4. Action antiathérogène**

En 2009, une étude menée par Mauray et coll. (41) a démontré qu'une supplémentation alimentaire avec des extraits de *V. myrtillus* limitait la progression des lésions athérosclérotiques dans un modèle de souris déficiente en apolipoprotéine E. L'action inhibitrice du développement de la plaque athéromateuse est indépendante des modifications du statut antioxydant plasmatique, des marqueurs biologiques du stress oxydant et du profil lipidique, suggérant l'implication d'autres mécanismes d'actions (peut-être l'action anti-inflammatoire). De plus, des deux extraits utilisés (l'un riche en anthocyanosides extraits de myrtilles non traitées et le deuxième extraits de myrtilles fermentées par des levures), la meilleure activité antiathérogène est détenue par l'extrait de myrtilles fermentées, suggérant la formation par la fermentation de nouveaux composés avec des propriétés bénéfiques pour la santé ; les pigments polymériques dérivés des anthocyanosides atténueraient mieux les lésions athérosclérotiques que les anthocyanosides de l'extrait non traité. En effet, lors de la fermentation, les anthocyanosides se condensent avec d'autres composés présents dans le fruit de la myrtille. Il reste alors à déterminer les composés responsables de l'effet observé et les mécanismes d'action impliqués.

### **3. Etudes cliniques de l'activité vasoprotectrice**

Des résultats pharmacologiques prometteurs des extraits de fruits de *V. myrtillus* issus d'études cliniques encouragent leur utilisation chez l'homme dans le traitement des maladies vasculaires périphériques pouvant associer, fragilité capillaire, altération de la perméabilité, et insuffisances veineuses chroniques des membres inférieurs. D'autres études cliniques ont montré l'efficacité de la myrtille dans les symptômes cliniques post-opératoires.

Ainsi, les anthocyanosides de *V. myrtillus* (480 mg par voie orale pendant 30 jours) ont montré leur capacité à diminuer les symptômes subjectifs (douleur, paresthésie...) et objectifs (œdème des membres, phénomènes dyschromiques de la peau...) de patients atteints du syndrome variqueux des membres inférieurs, tout comme les patients souffrant de fragilité capillaire où une administration orale d'anthocyanosides de *V. myrtillus* (160-800 mg/jour) réduit les symptômes cliniques d'une résistance capillaire diminuée (pétéchies, contusion, sang fécal occulte) (43).



L'efficacité de l'extrait de myrtille Myrtocyan<sup>®</sup> (480 mg/jour pendant 30 à 180 jours) a été démontrée dans des études portées sur des patients diabétiques, dyslipidémiques, souffrant de maladies secondaires à une stase des membres inférieurs comme le syndrome pré-variqueux, les varices essentielles, le syndrome post-phlébitique, et plusieurs maladies vasculaires athérosclérotiques (43). Une étude double-aveugle et contrôlée par placebo incluant 47 patients atteints de désordres vasculaires d'origine variée a démontré la capacité de Myrtocyan<sup>®</sup> à réduire les symptômes subjectifs et objectifs de la pathologie (diminution de la douleur, de la paresthésie, de l'œdème et de la mobilisation des extrémités des doigts chez les patients avec syndrome de Raynaud). Une étude menée sur 568 patients souffrants d'insuffisance veineuse des membres inférieurs a montré la capacité des anthocyanosides à faire disparaître les symptômes et à améliorer la microcirculation et le drainage lymphatique. (43).

L'efficacité de la myrtille (320 mg/jour pendant 60 à 90 jours) a même été démontrée chez 54 femmes enceintes souffrant de phlébite secondaire à stase veineuse (diminution de la douleur, de l'œdème, de la fragilité capillaire...) et des patients avec bronchite chronique et asthmatique (réduction par l'extrait de *V. myrtillus* à 480 mg/jour pendant 10 à 30 jours des modifications microcirculatoires induites par la corticothérapie) (43).

#### **4. Action sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)**

Pour rappel, l'ECA (dipeptidylcarboxypeptidase) est une enzyme impliquée dans le système rénine-angiotensine (l'un des mécanismes le plus important dans la régulation de la pression artérielle) permettant la conversion de l'angiotensine I inactive en angiotensine II active. Cette dernière est capable d'augmenter la pression sanguine et la pression de perfusion rénale ; les inhibiteurs de l'ECA (IEC) constituent alors la première ligne de traitement pour l'hypertension artérielle et l'insuffisance cardiaque. Les deux sites actifs de l'ACE contiennent un atome de Zn<sup>2+</sup> et les IEC sont capables de se lier à cet atome (47).

Personn et coll. (47) ont rapporté dans une étude *in vitro* la propriété d'un extrait de *V. myrtillus* à inhiber l'ECA, peut-être par sa capacité à chélater des ions métaux comme Zn<sup>2+</sup> ou Fe<sup>2+</sup> ; cette inhibition étant plus forte que les anthocyanidines combinées ou séparées démontre l'implication d'autres composés de la plante dans cette action. En effet, *V. myrtillus* ne contient pas seulement des anthocyanosides et anthocyanidines mais aussi de la quercétine (flavonol), du stilbène resvératrol, des acides férulique et coumarique. C'est la composition spécifique de la plante qui semble être à l'origine de l'effet observé.

Par conséquent, le lien entre *V. myrtillus* et l'ECA pourrait expliquer les effets pharmacologiques de la plante sur la circulation ; cette plante pouvant être alors utilisée en prévention des maladies cardiovasculaires.

## 5. Action sur l'angiogenèse

L'angiogenèse se définit comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (néovascularisation). Elle est indispensable dans de nombreux processus physiologiques comme le développement embryonnaire, l'implantation du placenta mais peut aussi contribuer à des processus pathologiques comme la croissance des tumeurs et le développement des métastases. L'angiogenèse se fait par plusieurs étapes qui se trouvent être les mêmes dans l'ensemble des processus :

- activation des cellules endothéliales,
- dégradation de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire,
- migration orientée des cellules endothéliales,
- prolifération cellulaire,
- différenciation des cellules endothéliales en une structure de type capillaire pour former une structure vasculaire permettant le développement des tissus.

L'angiogenèse est contrôlée par plusieurs facteurs inducteurs ou inhibiteurs dont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF ou *vascular endothelial growth factor*), régulateur clé de l'angiogenèse (73).

En 2007, Matsunaga et coll. (40) ont étudié *in vitro* l'action de *V. myrtillus* sur l'angiogenèse, plus précisément sur la formation des tubules vasculaires, la prolifération et la migration des cellules, ainsi que leur action sur la phosphorylation de protéines kinases comme ERK 1/2 (« *extra-cellular signal-regulated kinase* » ou kinase régulée par le signal extra-cellulaire), phospholipase C<sub>γ</sub> et Akt (constitués de trois enzymes appartenant à la famille des protéines kinases) induite par le VEGF. L'étude démontre les effets inhibiteurs des extraits de myrtille sur les paramètres de l'angiogenèse sur des cellules endothéliales des veines ombilicales humaines co-cultivées avec des fibroblastes. Ainsi, entre 1 et 30 µg.ml<sup>-1</sup>, l'extrait de *Vaccinum myrtillus* inhibe significativement la surface des tubules vasculaires, la longueur, l'enchevêtrement des tubules et le nombre de réseaux formés. A 3 µg.ml<sup>-1</sup> ou plus, l'extrait réduit l'ensemble des paramètres de l'angiogenèse.

L'extrait inhibe la prolifération (inhibition significative à 3 µg.ml<sup>-1</sup>) et la migration (inhibition significative à 10 et 30 µg.ml<sup>-1</sup>) des cellules induites par VEGF-A de manière dose-dépendante, ceci ne se voyant qu'en présence du facteur de croissance.

La phosphorylation des protéines kinases comme ERK 1/2 est important dans la prolifération des cellules endothéliales des veines ombilicales humaines et celle de Akt est une étape importante dans la prolifération et la migration de ces cellules.

Les auteurs démontrent la capacité de *V. myrtillus* à inhiber l'augmentation de la phosphorylation de ces deux protéines kinases mais pas la phosphorylation de la PLC $\gamma$  indiquant que l'extrait agit en aval de celle-ci dans la cascade de signalisation induite par le VEGF.

L'étude *in vivo* mise en place par Matsunaga et coll. (39), chez la souris, a permis de montrer l'effet inhibiteur de l'extrait de *V. myrtillus* dans la formation de réseaux néovasculaires dans la rétinopathie induite par oxygène.

## **II. Action de *Vaccinium myrtillus* sur le stress oxydant**

### **1. Le stress oxydant : quelques généralités**

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un électron célibataire sur sa couche périphérique. Les radicaux libres, qui interviennent dans le stress oxydant, ont un électron célibataire centré sur un atome d'oxygène. On les nomme les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Plusieurs ERO existent comme le radical superoxyde, le radical perhydroxyle (forme protonée du superoxyde), le radical hydroxyle, le radical peroxyde et le radical alkoxyde. Les radicaux ne sont pas seulement formés au cours des phénomènes de stress oxydant, mais également lors du métabolisme normal de l'oxygène *in vivo*, même si ils ne sont générés qu'en faible quantité. En effet, c'est au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie où 85% de l'oxygène sont métabolisés, que se produit la réduction complète par 4 électrons de la molécule d'O<sub>2</sub>, conduisant à la formation d'eau. La réduction de la molécule ne peut se faire que par l'enchaînement de plusieurs étapes donnant naissance à des intermédiaires réduits de l'oxygène. La réduction monoélectronique de l'oxygène, consommé au niveau mitochondriale, fournit l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) qui est une espèce toxique. Mais, des enzymes antioxydantes comme les superoxydes dismutases vont réguler l'anion superoxyde en catalysant leur dismutation et en produisant le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ce dernier n'est pas un radical libre mais une molécule possédant tous ses électrons appariés. Cependant, dans des réactions *in vivo* comme la réaction de Fenton et en présence de cations métalliques comme Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>+</sup>, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> devient toxique en donnant les radicaux libres les plus néfastes du stress oxydant, que sont les radicaux hydroxyles (OH<sup>•</sup>). De même que le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène est régulé *in vivo* par des systèmes antioxydants comme

la catalase qui accélère sa dismutation ou la glutathion peroxydase qui catalyse sa réduction par le glutathion.

Ainsi, le radical  $O_2^{\cdot-}$ , le  $H_2O_2$  et le radical  $OH^{\cdot}$  forment les ERO (beaucoup plus réactives que l'oxygène). Cependant, d'autres espèces réactives de l'oxygène existent comme les radicaux peroxydes ( $RO_2^{\cdot}$ ), les hydroperoxydes ( $RO_2H$ ) et les radicaux alkoxydes ( $RO^{\cdot}$ ).

Ces ERO, très réactifs, peuvent endommager les protéines, les lipides, les glucides et les acides nucléiques par des réactions d'oxydation. A côté des ERO, il existe le monoxyde d'azote radicalaire  $\cdot NO$  pouvant avoir des effets délétères en réagissant, lors d'un stress oxydant, avec  $O_2^{\cdot-}$  pour former le peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ) très réactif et capable d'endommager les protéines, les lipides et les acides nucléiques. On parle alors de stress nitrosant.

C'est pourquoi, il existe des systèmes de défense dans l'organisme (antioxydants) comme les systèmes de défense enzymatique (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydases...). Toutefois, le stress oxydant peut être important, et les systèmes de défenses dépassés, d'où la survenue ou l'aggravation de pathologies comme l'athérosclérose, le diabète sucré, l'ischémie cérébrale, le cancer...(21).

## **2. Propriétés antioxydantes des anthocyanosides de *Vaccinium myrtillus***

### **2.1. Quelques rappels sur les anthocyanosides**

Les anthocyanosides, comme nous l'avons vu précédemment, sont des colorants naturellement présents dans les fleurs, les fruits (particulièrement dans les baies), et les légumes. Ce sont des pigments responsables de la couleur comme l'orange, le rouge, le bleu.... Ils peuvent jouer plusieurs rôles (attirer les insectes pour la pollinisation et la dispersion des graines ou contribuer à la résistance des plantes vis-à-vis d'attaques extérieures). Pour rappel, les anthocyanosides sont des glycosides ou des acylglycosides des anthocyanidines (les formes aglycones). Ils ont une structure de base flavylum et des substitutions hydroxyles ou méthoxyles. De plus, ils sont tous O-glycosylés avec différents sucres dont la prévalence est dans l'ordre décroissant, le glucose, le rhamnose, le xylose, le galactose, l'arabinose et le fructose. Les anthocyanosides les plus prédominants sont des 3- ou 3,5-glycosylés. Quand le nombre de sucre augmente, on observe une alternance sucre et liaisons « acyl ». De nombreuses études ont reporté les effets positifs des anthocyanosides, dont certaines seront décrites dans cette thèse. Certains de leurs effets sont attribués à leurs propriétés antioxydantes (64).

## 2.2. Effet des anthocyanosides sur la capacité antioxydante du plasma

En 2006, Talavéra et coll. (59) ont étudié la biodisponibilité des anthocyanosides de *Vaccinium myrtillus* (Antho 50®) et leur potentiel antioxydant sur le plasma de rats alimentés avec Antho 50® pendant 8 jours. L'étude a montré une augmentation du statut antioxydant plasmatique par cette administration, même si la biodisponibilité évaluée par excrétion urinaire est basse. Mais, la chimie des anthocyanosides est complexe ; ceux-ci pourraient subir une conversion en formes moins colorées, à cause de leur instabilité à pH physiologique ou métabolisés en composés encore inconnus. Quoiqu'il en soit, une consommation quotidienne en anthocyanosides a un effet positif sur la capacité antioxydante du plasma.

## 2.3. Pouvoir ORAC des anthocyanosides

L'essai ORAC (*oxygen radical absorbance capacity* ou capacité d'absorbance du radical oxygène) est une mesure standardisée du pouvoir antiradicalaire de substances pures ou en mélange. Après extraction des principes actifs dans un mélange eau-éthanol pour les molécules hydrosolubles et éthanol pour les molécules lipophiles, le test par spectrofluorimétrie consiste en la mesure de la protection exercée par la molécule contre l'oxydation de la fluorescéine par un radical libre et stable le AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride). Les résultats sont ensuite exprimés par rapport au pouvoir antioxydant exercé par une molécule de référence, le Trolox (équivalent hydrosoluble de la vitamine E) ramené par le poids (en gramme) du produit que l'on teste (75).

La valeur ORAC de la myrtille (44,6 µmol Trolox/g de poids frais) est plus élevée que celle d'autres baies (Figure 16) (58).

Species	Antioxidant capacity (µmol Trolox/g fresh weight)
Bilberry ( <i>Vaccinium myrtillus</i> )	44.6
Blackberry ( <i>Rubus fruticosus</i> )	14.8–22.6
Blackcurrant ( <i>Ribes nigrum</i> )	36.9–93.1
Blueberry ( <i>Vaccinium corymbosum</i> )	16.8–42.3
Chokeberry ( <i>Aronia melanocarpa</i> )	4.6–30.5
Cranberry ( <i>Vaccinium macrocarpon</i> )	160.2
Grape ( <i>Vitis vinifera</i> )	8.2–14.1
Raspberry ( <i>Rubus idaeus</i> )	18.5
Strawberry ( <i>Fragaria x ananassa</i> )	7.39
	18.49
	15.36
	24.37

Figure 16 : Capacité antioxydante de quelques baies (58).

En 1997, Wang et coll. (64) ont évalué la capacité antioxydante d'anthocyanidines communs comme les aglycones de delphinidine, cyanidine, pélargonidine, malvidine, péonidine, et leurs dérivés glycosylés. Pour cela, ils utilisent l'essai ORAC avec générateur de radical peroxy ( $\text{ROO}\cdot$ ). Ainsi, l'étude démontre que les anthocyanidines possédant la même hydroxylation sur le cycle A et C et une seule hydroxylation sur le cycle B comme la pélargonidine, la malvidine et la péonidine ont une plus basse valeur ORAC que les anthocyanidines dihydroxylées sur le cycle B (3', 4'-di-OH) comme la cyanidine. Les groupes hydroxyles en position 3' et 4' du cycle B constituent un facteur important dans le pouvoir antioxydant ; seule la delphinidine échappe à cette règle (plusieurs hydroxylations sur le cycle B mais valeur ORAC plus faible). Même si dans certains flavonoïdes, le nombre de groupes hydroxyles augmentent la capacité antioxydante, ceci n'est pas constaté pour les anthocyanosides où la pélargonidine, la cyanidine et la delphinidine ayant 4, 5 et 6 groupes hydroxyles respectivement ont des valeurs ORAC respectives de 1,54 ; 2,24 et 1,81. De plus, la glycosylation peut avoir aussi un effet sur l'activité antioxydante des anthocyanosides. Elle peut diminuer, augmenter ou n'avoir aucun effet sur le pouvoir antiradicalaire. Par exemple, la 3-glycosylation du cycle C de la cyanidine augmente l'activité ORAC pour le glucose et le rhamnose mais la diminue pour le galactose. Ainsi, l'ordre décroissant de l'activité ORAC pour la cyanidine est le suivant : cyanidine 3-glucoside > cyanidine 3-rhamnoside > cyanidine > cyanidine 3-galactoside. Même l'orientation du groupe hydroxyl affecte le pouvoir antioxydant contre le radical peroxy. De plus, l'efficacité d'un antioxydant à piéger les radicaux libres dépend aussi de sa capacité à former un radical lui-même stable. Enfin, le classement des antioxydants par leur valeur ORAC dépend aussi de l'oxydant, du radical libre utilisé et de la méthode chimique employée.

Ainsi, cette étude a montré le fort pouvoir antioxydant des anthocyanosides ; ceux-ci sont donc de bons candidats pour la prévention et le traitement de maladies ; même si d'autres études sont nécessaires pour élucider leur impact sur la santé humaine.

#### **2.4. Capacité antioxydante des anthocyanosides vis-à-vis des espèces réactives azotées**

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote radicalaire ( $\cdot\text{NO}$ ) est un médiateur important participant à des réactions physiologiques dans les organismes vivants, comme le métabolisme énergétique mitochondrial ou la transduction de signaux. Cependant, le  $\cdot\text{NO}$  peut réagir rapidement avec l' $\text{O}_2\cdot^-$  et former le peroxy-nitrite ( $\text{ONOO}\cdot$ ), un fort oxydant, très réactif, pouvant réagir avec des molécules biologiques comme les protéines ou les acides nucléiques.

L'ONOO<sup>-</sup> participe à la formation de nitro-tyrosine dans les protéines et à l'oxydation des lipoprotéines de basse densité responsable de la formation de plaques d'athérome. Les radicaux ·NO sont générés de façon constitutive dans le cerveau sous des conditions physiologiques. L'ONOO<sup>-</sup> peut être l'une des causes de désordres cérébraux (accidents vasculaires cérébraux ou maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer) (27). En 2004, Ichiyanagi et coll. (27) ont comparé les réactivités de 20 anthocyanosides extraits de *Vaccinium myrtillus* contre les espèces réactives azotées et oxygénées. L'extrait utilisé dans l'étude est le Bilberon 25<sup>®</sup> (extrait pur sous forme de poudre provenant de *V. myrtillus*). Comme l'antioxydant de référence, la (+)-catéchine, les anthocyanosides ont la capacité de piéger les radicaux libres comme le radical OH·, mais ont une réactivité 20 fois plus hautes que celui-ci contre l'O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>. De plus, la réactivité contre le radical OH· n'est pas très sensible à la diversité structurale des anthocyanosides, alors qu'elle l'est pour l'O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>. Dans l'étude de Ichiyanagi et coll. (27), l'activité contre le ·NO est presque la même entre tous les anthocyanosides, étant très peu sensible aux diversités structurales (les groupes hydroxyls libres sur le cycle B de la molécule de base ou l'importance de la méthylation de ces groupes ne contribueraient pas aux réactivités des anthocyanosides contre les radicaux ·NO et OH·). Parmi tous les anthocyanosides, ce sont les glycosides (position 3) de delphinidine qui réagissent le plus contre les radicaux ·NO et ONOO<sup>-</sup> (réactivité 6 et 3 fois plus hautes que les anthocyanosides et la (+)-catéchine respectivement) ; les autres anthocyanosides ayant une réactivité comparable entre eux contre ·NO et l'ONOO<sup>-</sup>.

### 2.5. Réactivité contre la peroxydation lipidique

Les lipoprotéines de basse densité (LDLs ou low-density lipoproteins) oxydées par des radicaux libres et des pro-oxydants ont plusieurs effets biologiques néfastes comme le déclenchement d'évènements cellulaires conduisant à la formation et la progression de la plaque athéroscléreuse (21).

Laplaud et coll. (34) ont étudié l'action antioxydante d'un extrait de *Vaccinium myrtillus* sur les LDLs. L'étude démontre la diminution de tous les paramètres évalués lors de l'oxydation des LDLs par cet extrait. En effet, la myrtille est capable de ralentir la formation de diènes conjugués, de retarder la production de lipoperoxydes et de malondialdéhyde (indicateurs de la peroxydation lipidique) et de diminuer la charge électrique nette des lipoprotéines.

Enfin, *V. myrtillus* serait plus efficace que l'acide ascorbique ou l'hydroxytoluène butylé (BHT) pour diminuer la peroxydation lipidique des LDLs.

En 1998, Martín-Aragón et coll. (38) ont étudié *in vitro* la capacité d'un extrait complexe d'anthocyanoside de *V. myrtillus* à inhiber la peroxydation lipidique et à piéger les ERO comme les radicaux  $\text{OH}\cdot$  et  $\text{O}_2\cdot^-$ . L'étude démontre un effet antiperoxydant de l'extrait (concentration-dépendante); la concentration capable d'inhiber 50% de la peroxydation lipidique (IC50 ou concentration inhibitrice 50) étant de 50,28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sa capacité à piéger le radical  $\text{OH}\cdot$  est faible (détectable à partir de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), alors que sa réactivité contre le radical  $\text{O}_2\cdot^-$  est forte (observée à toutes les concentrations testées, avec une valeur d'IC50 de moins de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

En conclusion, la myrtille pourrait par son activité antiperoxydative contribuer à la protection vis-à-vis de l'athérosclérose.

## 2.6. Action inhibitrice sur l'oxydation des lipides et des protéines

Viljanen et coll. (63) ont comparé l'inhibition de l'oxydation des lipides et des protéines entre les composés phénoliques de *V. myrtillus* avec ceux d'autres baies comme *Rubus idaeus* L. (framboisier), *Vaccinium vitis-idaea* L. (airelle rouge), et *Ribes nigrum* L. (cassis). Les composés phénoliques sont représentés par des anthocyanosides, des ellagitanins et des proanthocyanidines. L'étude démontre que *V. myrtillus* et *Rubus idaeus* possèdent la meilleure activité antioxydante, parmi la totalité des baies étudiées, contre l'oxydation des protéines (cette oxydation étant mesurée par la perte de la fluorescence au tryptophane et la formation de protéines carbonyles). *Vaccinium myrtillus* et *V. vitis-idaea* possèdent la meilleure activité antioxydante vis-à-vis de l'oxydation des lipides suivis par *Ribes nigrum* et *Rubus idaeus* (cette oxydation est mesurée par l'analyse d'hexanal, de diènes conjugués et d'hydroperoxydes). Dans la myrtille et le cassis, ce sont les anthocyanosides qui contribuent à la majorité de l'effet antioxydant par inhibition de la formation des protéines carbonyles et d'hexanal (hexanaldehyde). Cette activité antioxydante des anthocyanosides et des proanthocyanidines est dose-dépendante, ce qui n'est pas le cas pour les autres composés phénoliques. L'effet antioxydant des composés phénoliques des baies est plus prononcé contre l'oxydation des lipides, particulièrement l'inhibition du composé hexanal que celle des protéines. L'inhibition des composés aldéhydes des lipides résulte, en général, de l'inhibition de la formation de dérivés carbonyles, conséquence d'une diminution de l'interaction lipide-protéine.



### **3. Effet cytoprotecteur de *Vaccinium myrtillus* sur les dommages du foie**

#### **3.1. Généralités sur le foie**

Le foie est l'organe central du métabolisme des composés exogènes et endogènes ; il est donc l'organe cible de l'action des xénobiotiques et de leurs métabolites. Les études sur les hépatocytes sont importantes car ces cellules représentent 65% du parenchyme du foie et ils assurent presque toutes les fonctions de cet organe. Les hépatocytes ont un appareil de Golgi distinct et de nombreuses mitochondries. Malheureusement, ils peuvent être soumis à un stress oxydant. Les études faites à ce jour ont utilisé des toxines expérimentales variées afin d'étudier les effets cytoprotecteurs de substances comme l'extrait de *V. myrtillus*. Dans les études qui vont suivre, deux toxines sont employées. Le tert -butyl hydroperoxyde (tBH) et l'allyl-alcool (2-propen-1-ol). Le tBH peut induire un stress oxydant aux cellules à travers des radicaux (radical hydroxyl, peroxy d'hydrogène et alkoxy se formant lors de sa décomposition). Le tBH est la cause de plusieurs dommages comme la rupture des membranes cellulaires, l'induction de la peroxydation lipidique (responsable d'athérosclérose), la fuite d'enzymes à travers l'espace extracellulaire, l'oxydation du glutathion et l'alkylation de macromolécules cellulaires. L'allyl-alcool (AA) est une toxine qui agit indirectement à travers ses métabolites. Il est oxydé dans les cellules en acroléine sous l'action de l'alcool déshydrogénase cytosolique. L'acroléine est capable de former un produit avec le glutathion réduit (GSH) et d'autres biomolécules. Elle induit aussi la peroxydation lipidique catalysée par les ions Fe(II) (62).

#### **3.2. Études de lésions oxydatives hépatiques**

En 2007, Valentová et coll. (62) ont utilisé un extrait de *Vaccinium myrtillus* (contenant 25% d'anthocyanosides) pour évaluer son effet contre une lésion oxydative dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat, induite par tBH et AA. Jusqu'à présent, l'activité cytoprotectrice de la myrtille contre une lésion oxydative n'était pas documentée.

L'étude a démontré l'activité protectrice dose-dépendante de la plante vis-à-vis de lésions oxydatives dans ces cultures cellulaires ; avec une protection maximale de 51,16% contre les dommages occasionnés par AA. De plus, les auteurs ont montré la capacité de l'extrait à piéger les radicaux DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) et  $O_2^{\cdot-}$ .

En conclusion, l'extrait de *V. myrtillus* montre des effets cytoprotecteurs à 100 et 500  $\mu\text{g/mL}$  dans le test au MTT (sel de tétrazolium permettant une numération rapide des cellules vivantes). L'extrait protège les hépatocytes de la libération de lactate déshydrogénase et de la formation des produits de la lipoperoxydation (TBARS représentant les substances réagissant

avec l'acide thiobarbiturique et permettant une première approche de la peroxydation lipidique). L'importante réactivité dans l'étude est sûrement due à la durée plus importante du temps d'incubation dans le mélange réactionnel. Les effets observés, dans l'étude de Valentová et coll. (62), montre que la capacité cytoprotectrice de *V. myrtillus* vis-à-vis des hépatocytes de rat est probablement due aux propriétés antioxydantes de ses constituants principaux (les anthocyanosides). Ainsi, les résultats de l'étude soutiennent l'utilisation de la myrtille dans les compléments alimentaires, pour prévenir les maladies chroniques associées au stress oxydant.

En 2008, Bao et coll. (6) ont étudié les effets protecteurs d'un extrait de *V. myrtillus* commercialisé (contenant 42,04% d'anthocyanosides) vis-à-vis d'un dommage du foie de souris induit par un stress. Ce stress est provoqué par l'enfermement des souris dans une cage métallique pendant 18 heures, provoquant un dommage hépatique avec augmentation des enzymes hépatiques (alanine aminotransférase), du niveau de malondialdéhyde (MDA), du monoxyde d'azote, de la xanthine oxydase (XOD) et de la peroxydation lipidique avec un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants et la diminution de GSH, de la vitamine C, et de la valeur ORAC. Or, l'administration orale de plusieurs dosages d'extrait de *V. myrtillus*, pendant 5 jours précédant l'induction d'un stress chez la souris, diminue le niveau d'alanine aminotransférase (à 200 mg/kg/jour d'extrait), augmente les niveaux de GSH (50, 100, et 200 mg/kg/jour d'extrait), et diminue significativement les niveaux de XOD et de NO (à des concentrations de 100 et 200 mg/kg/jour d'extrait).

De plus, l'extrait de myrtille à 200 mg/kg/jour pourrait supprimer et renverser le niveau de MDA hépatique et plasmatique à un niveau comparable à celui du groupe contrôle (non soumis au stress). La même chose est observée avec 200 mg/kg /jour de vitamine C (autre antioxydant). Enfin, le niveau ORAC est augmenté par 100 et 200 mg/kg/jour d'extrait de *V. myrtillus*.

Bao et coll. (6) avaient déjà mis en évidence l'effet protecteur du rein d'un extrait de *V. myrtillus* vis-à-vis d'un stress oxydant induit par  $\text{KBrO}_3$ .

En conclusion, la myrtille pourrait prévenir les dommages hépatiques causés par un stress oxydant grâce à ses propriétés antioxydantes.

## **4. Effet de *Vaccinium myrtillus* sur les maladies neurodégénératives et le vieillissement**

### **4.1. Effets sur un stress émotionnel**

Il a été mis en évidence que le stress psychologique joue un rôle significatif dans la pathogenèse de cancers et peut être associé avec une augmentation des produits issus de l'oxydation et de leurs dommages sur les tissus.

Le stress oxydant participe à l'étiologie de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. En effet, le stress émotionnel peut affecter le système nerveux central dans lequel se trouve notamment les neurones dopaminergiques qui produisent la dopamine, un neurotransmetteur du groupe des catécholamines, précurseur de la noradrénaline, jouant un rôle fondamentale dans le cerveau (contrôle de la motricité) ; utilisé en thérapeutique pour son action stimulante sur le système cardiovasculaire. Les neurones dopaminergiques sont localisés dans certaines régions cérébrales comme l'hypothalamus, le *locus niger* et les corps striés. Ainsi, la rupture de la transmission dopaminergique affecte l'activité comportementale. Une baisse du niveau de dopamine dans certaines régions cérébrales peut induire une perte des certaines fonctions cognitives comme la mémoire, l'attention, la résolution de problème, le mouvement, la réponse émotionnelle et la capacité émotionnelle à ressentir le plaisir ou la douleur.

De plus, les ERO induites par un stress sont connues pour être responsables de la peroxydation lipidique et de l'oxydation des protéines avec formation de protéines carbonyles. Ainsi, des études ont démontré que la modification de protéines intracellulaires comme certaines enzymes clés et protéines structurales peuvent mener à la dégénération neurofibrillaire des neurones menant à la maladie d'Alzheimer, une autre maladie neurodégénérative (1), (52).

En 2008, Rahman et coll. (52) ont étudié les effets protecteurs d'un mélange d'anthocyanosides de *Vaccinium myrtillus* administré oralement à des souris soumis à un stress oxydant cérébral provoqué par la coupure des moustaches. En effet, le retrait des moustaches augmente la formation de protéines carbonyles et induit la peroxydation lipidique dans le cerveau, le cœur, le rein et le foie. Le niveau des marqueurs de l'oxydation diffèrent en fonction des régions cérébrales. De même, le niveau de dopamine est altéré dans le cortex cérébral et le mésencéphale. Les moustaches de souris jouent un rôle très important dans le sens et la motricité, et la contribution sensorielle est directement liée aux neurones moteurs

contrôlant leur activité locomotrice. C'est pourquoi, le retrait des moustaches a de graves conséquences puisqu'il affecte l'activité locomotrice induisant anxiété et hyper-locomotion. Ce stress oxydant induit par un stress psychologique augmente les niveaux de marqueurs biologiques comme les protéines carbonyles et les TBARS dans certains organes et régions cérébrales (cœur, reins, foie, mésencéphale, cortex et cérébellum). Or, l'administration des anthocyanosides de *V. myrtillus* des souris diminue la peroxydation lipidique dans tous les tissus, réduit l'oxydation des protéines dans les reins, le foie, le mésencéphale et le cortex cérébral de façon notable et diminue également les niveaux de protéines carbonyles et de TBARS.

Enfin, l'administration de myrtille supprime les modifications (induites par le stress psychologique) des niveaux de dopamine et de ses métabolites, (ces modifications pouvant provoquer des maladies dégénératives comme la maladie de Parkinson).

Cependant, cette étude ne peut pas conclure sur la capacité des anthocyanosides de *V. myrtillus* à franchir la barrière hémato-encéphalique et à y exercer leur action antioxydante. Les principales formes retrouvées dans le foie et les reins sont des métabolites méthylés des anthocyanosides et d'autres études sont nécessaires pour prouver le lien entre ces métabolites méthylés et la neuroprotection observée dans l'étude.

En conclusion, cette étude suggère que les anthocyanosides peuvent être utiles dans la protection et le traitement des maladies neurodégénératives associées à un stress oxydant.

#### **4.2. Effet sur les déficits cognitifs liés à l'âge et implication du stress oxydant**

Le dommage oxydant a depuis longtemps été proposé pour être en partie responsable de plusieurs désordres liés à l'âge. De plus, plusieurs études ont confirmé l'accumulation des marqueurs biologiques du stress oxydant (augmentation de l'oxydation des lipides et des protéines dans les cerveaux de mammifères âgés). Les pertes de la fonction cérébrale avec le vieillissement pourraient être associées à une lésion oxydante des biomolécules dans certaines régions cérébrales et un niveau augmenté de peroxydes lipidiques, observé dans des régions du cerveau impliquées dans les fonctions de mémoire et d'apprentissage. De plus, les auteurs ont démontré l'association des altérations des fonctions cérébrales cognitives avec des modifications du système cardiovasculaire comme l'augmentation de la pression sanguine (impliquée dans l'accélération du vieillissement des vaisseaux, les altérations des fonctions cérébrales et le développement de l'athérosclérose) (32).

Kolosova et coll. (32) utilisent pour leur étude deux souches de rats. La souche OXYS qui est une souche aux traits hérités de vieillissement accéléré et une haute sensibilité au stress

oxydant par rapport à une autre souche, la souche Wistar. Les rats OXYS ont une espérance de vie plus courte et développent plus précocement des désordres pathologiques liés à l'âge semblables à ceux observés chez l'humain comme l'ostéoporose, l'hypertension artérielle... ; de ce fait le comportement de jeunes rats OXYS est semblable à celui des rats Wistar âgés.

L'objectif de leur étude était de vérifier s'il existe un lien entre le vieillissement cérébral et les marqueurs du stress oxydant chez les rats OXYS, pour rechercher l'efficacité d'une supplémentation à long terme d'antioxydants dans la prévention de l'apparition de déficits cognitifs comme les déficits d'apprentissage et de mémoire.

Les différents paramètres de stress oxydant dans ces deux souches de rats sont évalués (peroxydation lipidique, niveau de protéines carbonyles, niveau de MDA, activité de superoxyde dismutase (SOD), de niveau de GSH et quantité d' $\alpha$ -tocophérol).

L'étude démontre qu'une supplémentation à long terme avec un extrait de *V. myrtillus* prévient la manifestation extérieure du vieillissement des deux souches de rats (l'extrait augmente le poids des souris). Chez les rats OXYS, l'extrait de myrtille diminue :

- la peroxydation lipidique,
- l'activité SOD dans le cerveau (en jouant un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant),
- et le niveau de MDA dans le cerveau.

La myrtille prévient aussi chez les rats OXYS :

- les déficits de mémoire et d'apprentissage plus efficacement que la vitamine E (autre antioxydant),
- la détérioration de la fonction mitochondriale (autre cause de sénescence accélérée).

De plus, *V. myrtillus* a la capacité de prévenir les mutations induites par les ERO, lesquels s'accumulent avec l'âge dans la mitochondrie menant à un dysfonctionnement mitochondriale. Ce même mécanisme pourrait être impliqué dans l'effet positif exercé par la myrtille sur la mémoire des rats OXYS. Ainsi, la prévention des déficits cognitifs comportementaux avec des antioxydants peuvent montrer le rôle du stress oxydant dans ces processus même si d'autres mécanismes peuvent jouer un rôle dans cette capacité de prévention des composés.

En conclusion, *Vaccinum myrtillus* atténue les déficits cognitifs chez les rats OXYS, apportant la preuve du rôle thérapeutique de cette plante. Cependant, les mécanismes par lesquels cet antioxydant agit pour exercer une neuroprotection *in vivo* et le réel impact du stress oxydant et de ses marqueurs biologiques sur les déficits cognitifs des rats OXYS doivent encore être étudiés.

## **5. Effets de *Vaccinium myrtillus* sur les dommages induits par les UVB**

### **5.1. Effets d'une exposition solaire**

Une exposition prolongée aux ultraviolets (UV) durant le sport ou d'autres activités est un facteur de risque de plusieurs maladies de la peau comme le cancer cutané. La déplétion de la couche d'ozone protectrice entraîne une quantité plus importante des rayons UV atteignant la surface planétaire et exerçant des effets néfastes. Les UVB sont largement absorbés mais moins pénétrants que les UVA atteignant particulièrement la couche cellulaire de l'épiderme basal. Les UVB sont plus génotoxiques et environ 1.000 fois plus capables de provoquer un coup de soleil que les UVA. Ainsi, le coup de soleil, l'érythème et l'œdème sont des manifestations de l'exposition aux UVB. L'absorption des photons UVB mènent à des dislocations de l'ADN et à la formation de photoproduits dimériques de pyrimidine. De plus, ils interagissent directement avec les acides aminés aromatiques notamment le tryptophane et la tyrosine (inclus dans les protéines) pouvant alors altérer les fonctions de celles-ci. Les UVB altèrent indirectement les macromolécules, ils génèrent la production de radicaux libres comme les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, induisant l'oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN. Ces produits oxydés (hydroperoxydes lipidiques, protéines carbonyles et 8-hydroxydéoxyguanosine) sont impliqués dans le début des cancers cutanés. Les UVB diminuent aussi les antioxydants de la peau responsable d'une baisse de la protection vis-à-vis des radicaux libres. Ils participent aux phénomènes de processus inflammatoire de la peau incluant une cascade d'évènements comme l'infiltration de leucocytes sanguins inflammatoires (macrophages et neutrophiles), l'augmentation de la production des prostaglandines comme conséquence de l'augmentation de la peroxydation lipidique, la libération du facteur TNF $\alpha$  (*tumour necrosis factor alpha* ou facteur de nécrose tumoral), le NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B* ou facteur nucléaire  $\kappa$ B), des cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12) qui en retour augmentent la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Un défaut de réparation des lésions de l'ADN et les effets néfastes des UVB du soleil sont à l'origine des cancers cutanés. C'est pourquoi, des mécanismes de protection de la peau ou une atténuation de la quantité d'UVB atteignant et pénétrant la peau peuvent être des stratégies efficaces dans la prévention des dommages occasionnés par le soleil (57).

### **5.2. Effet de *Vaccinium myrtillus* sur les radiations solaires**

Svobodová et coll. (57) Ont étudié la capacité des fractions phénoliques des fruits de *Lonicera caerulea* L. (chèvrefeuille bleu) et de *V. myrtillus* en pré et post-traitement sur les dommages

oxydants des kératinocytes HaCaT humains induits par un simulateur de radiations solaires (UVB). Plusieurs paramètres sont étudiés et seuls les résultats concernant *V. myrtillus* sont rapportés dans cette thèse. Cette plante a plusieurs effets :

- elle augmente le nombre de cellules viables,
- diminue significativement la libération de lactate déshydrogénase de manière dose dépendante,
- augmente de façon dose-dépendante la prolifération cellulaire (prolifération réduite par les UVB),
- prévient la formation et réduit significativement la cassure simple brin de l'ADN,
- diminue la caspase-3 (médiateur de l'exécution de la mort cellulaire apoptotique),
- diminue la caspase-9 de manière dose-dépendante (médiateurs de l'exécution de la mort cellulaire apoptotique),
- prévient la formation des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote avec élimination excellente en post-traitement,
- et diminue de manière dose-dépendante la production d'IL6.

Cependant, on remarque que cette protection décline légèrement à des concentrations plus hautes, s'expliquant par un effet pro-oxydant des polyphénols dans les cellules irradiées où la balance oxydants/antioxydants est déséquilibrée.

En conclusion, *V. myrtillus* pourrait être un bon candidat pour la fabrication de préparations dermatologiques protectrices à large spectre ou dans des préparations après-soleil. Pour cela, des études futures sont nécessaires pour étudier la biodisponibilité des composants, exclure les toxiques éventuels ou les effets phototoxiques et confirmer l'effet photoprotecteur *in vivo*.

## **6. Effets de *Vaccinium myrtillus* sur le stress oxydant oculaire**

### **6.1. La rétine : quelques généralités**

Chez l'homme, la rétine (Figure 17) est une membrane photosensible qui tapisse la face interne de l'œil ; elle est constituée de plusieurs types de cellules formant trois couches superposées qui sont de l'arrière vers l'avant de l'œil :

- les cellules photoréceptrices constituées de cônes et de bâtonnets ;
- les cellules bipolaires ;
- les cellules ganglionnaires.

Sa face postérieure est en contact avec la choroïde par l'intermédiaire de l'épithélium pigmentaire et sa face antérieure avec le corps vitré. Les cellules de la rétine transforment les

influx nerveux en impulsions nerveuses qui gagnent les fibres nerveuses du nerf optique permettant le transport des informations visuelles jusqu'au cerveau (1).

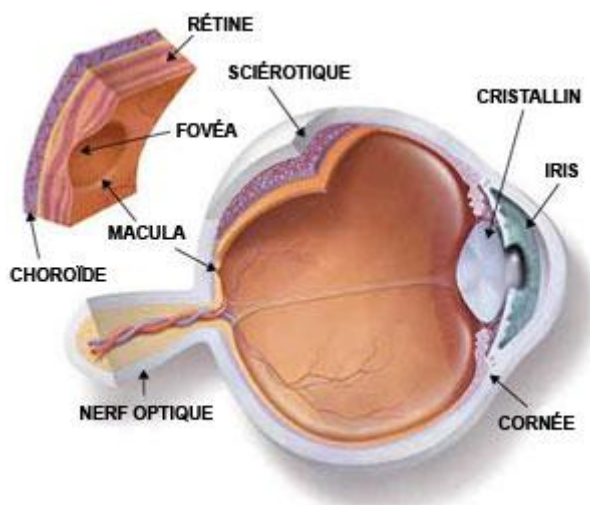


Figure 17 : La rétine chez l'homme (77)

La rétine est située dans un environnement très oxygéné pouvant subir des dommages induits par le stress oxydant (les radicaux libres peuvent oxyder les lipides des photorécepteurs) (23).

### 6.2. Effets de *Vaccinium myrtillus* sur les paramètres du stress oxydant oculaire

Dutot et coll. (23) ont étudié les effets cytoprotecteurs d'un extrait en poudre de *V. myrtillus* (contenant 10% de proanthocyanidols et 10% d'anthocyanidines) sur le stress oxydant appliqué aux cellules rétinienne humaines, dans un système *in vitro*. L'extrait de *V. myrtillus* est incubé (0,05 et 0,1%) pendant 15 minutes ou 24 heures sur une lignée de cellules de l'épithélium pigmenté rétinien. Puis, un stress oxydant induit par le tBHP est appliqué pendant une heure sur ces cellules. Les différents paramètres des dommages du stress oxydant sont évalués comme les modifications du métabolisme cellulaire, la formation des ERO, la formation d' $O_2^{\cdot-}$  et l'apoptose mitochondriale.

Les résultats sur ces différents paramètres sont résumés dans les tableaux II à V.

	0,1% de <i>Vaccinium myrtillus</i>	0,05% de <i>Vaccinium myrtillus</i>
Incubation 15 minutes	Réduction significative de la baisse induite par le tBHP	Aucun effet cytoprotecteur
Incubation 24 heures	Blocage de l'effet du tBHP sur le métabolisme cellulaire	

Tableau II : Effets de *V. myrtillus* sur la baisse du métabolisme cellulaire induite par le tBHP.



	0,1% de <i>Vaccinium myrtillus</i>	0,05% de <i>Vaccinium myrtillus</i>
Incubation 15 minutes	Réduction significative de la surproduction d'ERO	Pas d'effet
Incubation 24 heures	Diminution du stress oxydant	

Tableau III : Effets de *V. myrtillus* sur la surproduction des ERO induite par le tBHP.

	0,1% de <i>Vaccinium myrtillus</i>	0,05% de <i>Vaccinium myrtillus</i>
Incubation 15 minutes	Réduction significative de la production d'O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Pas d'effet
Incubation 24 heures	Réduction de la production d'O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	

Tableau IV : Effets de *V. myrtillus* sur la surproduction O<sub>2</sub><sup>-</sup> induite par le tBHP.

	0,1% de <i>Vaccinium myrtillus</i>	0,05% de <i>Vaccinium myrtillus</i>
Incubation 15 minutes	Inhibition significative de l'apoptose mitochondriale	Pas d'effet
Incubation 24 heures	Diminution de l'apoptose mitochondriale	

Tableau V : Effets de *V. myrtillus* sur l'apoptose mitochondriale induite par le tBHP.

Une concentration faible d'extrait (0,05%) n'a pas d'effet sur une période courte d'incubation (15 minutes), par contre c'est le cas pour une période plus longue (24 heures) ; cette concentration est capable d'avoir des effets cytoprotecteurs. *V. myrtillus* pourrait être capable de stimuler les défenses antioxydantes de l'organisme mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Enfin, l'étude a montré que lorsque l'extrait diminue le stress oxydant et l'apoptose mitochondriale, elle restaure aussi la viabilité cellulaire. Par contre, s'il n'y a pas d'effet sur le stress oxydant, il n'y en a pas non plus sur la viabilité cellulaire.

### 6.3. Effets de *Vaccinium myrtillus* sur les maladies oculaires liés à l'âge

Lors du vieillissement et dans certaines maladies oculaires (comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge où le stress oxydant est fortement impliqué), des pigments autofluorescents constitués par des dépôts de lipofuchsine (pigment jaune-brun, constituée de débris moléculaires) peuvent s'accumuler dans les cellules épithéliales du pigment rétinien. La lipofuchsine peut absorber la lumière bleue et générer des photoproduits toxiques

perturbant le fonctionnement cellulaire ; c'est donc un générateur de radicaux liés à la lumière. Un composant de rétinoïde majeur de la lipofuchsine est l'A2E (bis rétinoïde de pyridinium dérivé de rétinol et de phosphatidyl éthanolamine) ; il contribue à l'autofluorescence de l'épithélium pigmenté, à l'inhibition de fonctions cellulaires essentielles, au déclenchement de la mort par apoptose des cellules de l'épithélium pigmenté et à l'absorption de la lumière bleue aggravant les lésions cellulaires (79). A2E, lors de l'irradiation par la lumière bleue, subit une photooxydation en générant de l'oxygène singulet ; celui-ci réagit en retour avec le fluorophore générant des époxydes au niveau des doubles liaisons carbone-carbone. Les A2E-époxydes peuvent alors induire de graves lésions à l'ADN (une des cibles des événements photodynamiques par interaction lumière bleue-A2E), pouvant s'accumuler avec l'âge où un déclin des mécanismes de réparation des bases de l'ADN oxydées a été reconnu (56).

Les antioxydants pourraient avoir un rôle important dans la prévention des lésions oxydatives sur les macromolécules comme les bases de l'ADN et la dégénérescence de la maculaire liée à l'âge (DMLA). C'est pourquoi, *Vaccinium myrtillus* (par ses propriétés antioxydantes) a fait l'objet d'études montrant sa capacité à prévenir certaines maladies oculaires ; causes majeurs de cécité et de détérioration de l'acuité visuelle chez les personnes âgées.

En 2003, Sparrow et coll. (56) ont démontré dans une étude *in vitro*, la capacité d'un extrait de *V. myrtillus* à inhiber l'époxydation d'A2E par capture de l'oxygène singulet, grâce à sa richesse en anthocyanosides antioxydants.

Dans une étude *in vivo* utilisant une souche de rats avec sénescence accélérée (rats OXYS), Fursova et coll. (24) ont démontré qu'une alimentation supplémentée à long terme avec un extrait de *V. myrtillus* pouvait être efficace dans la prévention de la DMLA et de la cataracte sénile, deux maladies dont les dommages ont été attribués aux radicaux libres.

La surrégulation des protéines de stress est un moyen de protection contre des conditions délétères comme le stress oxydant. Ainsi, Milbury et coll. (42) ont démontré *in vitro* la capacité des anthocyanosides et d'autres composés phénoliques de *V. myrtillus* à surréguler les enzymes de défense du stress oxydant comme l'hème oxygénase-1 (HO-1) et la glutathion S-transférase (GST) dans des cultures de cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien humain. À côté du stress oxydant, des facteurs vasculaires peuvent être impliqués dans les maladies oculaires comme le glaucome, la DMLA ou la rétinopathie diabétique. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de cette partie, Person et coll. (46) ont démontré la capacité d'un extrait de *V. myrtillus* à inhiber l'ECA ; cet effet pourrait être une explication aux effets observés de la plante sur la vision.

## **7. Effets neuroprotecteurs de *Vaccinium myrtillus***

Un stress oxydant peut « s'attaquer » aux neurotransmetteurs entraînant leur oxydation. Ainsi, les neurotransmetteurs comme la dopamine et son métabolite neurotoxique la 6-hydroxydopamine peuvent subir une oxydation générant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des ERO. Dans les neurones et d'autres cellules, ce stress oxydant peut être amplifié par le relargage du cytochrome *c* (composant essentiel de la chaîne respiratoire mitochondriale, participant au transfert d'électrons) localisé dans la membrane interne de la mitochondrie, dans le cytoplasme ; ce relargage induit toute une cascade de réactions aboutissant à l'activation de caspases (protéines directement liées à l'apoptose) pouvant être fortement préjudiciable pour les métabolites de la dopamine. La perte de l'intégrité mitochondriale observée dans des maladies neurodégénératives peut contribuer aussi à des niveaux relargués de cytochrome *c* au-dessus de la normale (68).

Yao et coll. (68) ont montré *in vitro* la capacité d'une préparation riche en anthocyanosides composée de *V. myrtillus*, *V. corymbosum* et *V. oxycoccus* L. et des anthocyanosides purifiés à inhiber l'oxydation de la 6-hydroxydopamine augmentée par le cytochrome *c*. Parmi les trois espèces étudiées, les extraits de *V. myrtillus* apparaissent pour être plus efficaces dans cette activité que les deux autres espèces ou que les anthocyanosides purifiés, pouvant s'expliquer par une plus grande richesse en anthocyanosides/anthocyanidines particulièrement la cyanidine et delphinidine. La composition en quercétine et à moindre degré en myricétine n'ont pas de rôle dans l'activité antioxydante ; la présence de quercétine est même inversement corrélée avec l'effet antioxydant. L'effet inhibiteur observé est principalement dû à l'effet antioxydant des anthocyanosides.

Ainsi, les résultats de l'étude montrent la forte activité des anthocyanosides vis-à-vis des réactions neurotoxiques potentielles et suggèrent l'importance de mettre au point des études *in vivo* dans le but de démontrer des effets neuro- et mitochondrio-protecteurs de ces phytochimiques particulièrement dans la maladie de Parkinson et d'autres maladies impliquant un dysfonctionnement mitochondriale.

## **8. Effet de *Vaccinium myrtillus* sur une ischémie-reperfusion impliquant un stress oxydant**

Une ischémie-reperfusion entraîne de nombreuses altérations microvasculaires comme une augmentation des leucocytes adhérant à la paroi des vaisseaux veineux, une diminution de la longueur des capillaires perfusés menant à une diminution du nombre de capillaires

fonctionnels, une perte de l'intégrité endothéliale, une augmentation de la perméabilité capillaire (relargage de protéases comme l'élastase et la collagénase avec formation d'œdème) et des modifications du diamètre des artérioles (modification de la balance vasodilatation-vasoconstriction au profit d'une vasoconstriction). Les leucocytes jouent un rôle fondamental dans l'ischémie-reperfusion ; en s'accumulant dans les tissus, ils provoquent l'occlusion intravasculaire ainsi que le relargage de cytokines pro-inflammatoires et des métabolites dérivés de l'oxygène. En effet, les ERO ont été fortement impliquées dans ces désordres microcirculatoires ; elles altèrent entre autre l'intégrité de la paroi des vaisseaux et entraînent une augmentation de la perméabilité en post-capillaire et dans les veines collectrices de l'abajoue d'hamster. De plus, les ERO, provenant des leucocytes ou non, peuvent induire une contraction des artérioles (8).

En 1995, Bertuglia et coll. (8) ont étudié les effets des anthocyanosides de *V. myrtillus* sur l'ischémie-reperfusion provoquée sur l'abajoue d'hamster, entraînant les désordres microcirculatoires cités précédemment. L'étude montre qu'une administration orale d'anthocyanosides de *V. myrtillus* suite à ces dommages permet une protection de la paroi des vaisseaux grâce à leur action antioxydante, une réduction du nombre de leucocytes adhérant à la paroi veineuse (protégeant les tissus de l'ischémie-reperfusion et prévenant la formation de médiateurs inflammatoires), une diminution de la perméabilité capillaire par son activité anti-protéasique ; la plante peut être également un modulateur important du tonus des artérioles en contrôlant la fréquence et l'amplitude, la vasomotion (modification du calibre vasculaire) permettant une amélioration de la perfusion capillaire (inhibition de la vasoconstriction par les ERO).

Cette étude est importante, d'une part pour montrer le rôle des radicaux libres dérivés de l'oxygène dans les désordres microcirculatoires et d'autre part pour démontrer les effets bénéfiques de *V. myrtillus* à restaurer les différents paramètres, notamment par son action antioxydante.

### **III. Effets anticancéreux de *Vaccinium myrtillus***

#### **1. Rôle des anthocyanosides dans la prévention du cancer**

Wang et coll. (65) ont reporté les résultats des études qui ont permis de mettre en évidence les activités anticarcinogéniques des anthocyanosides et des extraits riches en anthocyanosides dans des modèles de cultures cellulaires *in vitro* et dans des systèmes *in vivo* de modèles tumoraux chez l'animal. L'activité antioxydante des anthocyanosides est due à leur structure

phénolique, en donnant un électron aux radicaux, ceux-ci devenant stables (électrons appariés). En effet, les anthocyanosides sont capables, comme nous l'avons vu précédemment, de piéger directement les ERO, d'augmenter la valeur ORAC des cellules, de stimuler l'expression de la phase II de détoxification des enzymes, de réduire la formation des sous-produits de l'ADN, de diminuer la peroxydation lipidique, d'inhiber la mutagenèse induite par des carcinogènes ou des toxines et de réduire la prolifération cellulaire en modulant les voies de transduction du signal. Ils sont capables également de chélater les métaux et de se lier directement aux protéines. L'activité antioxydante est principalement due aux groupes hydroxyles des anthocyanosides, en position 3 du cycle C et en position 3', 4' et 5' du cycle B de leur structure de base. Enfin, il a été montré que les aglycones d'anthocyanidines ont une activité antioxydante plus importante que leurs homologues glycosylés, et cette activité diminue quand le nombre de sucres augmente.

Même si les études expérimentales ont démontré l'activité anticancer des anthocyanosides, les études épidémiologiques n'ont pas montré l'activité protectrice de la consommation d'anthocyanosides vis-à-vis du risque de cancer humain et leur activité antioxydante reste encore questionnable. De plus, les quantités d'anthocyanosides nécessaires pour observer un effet *in vitro* sont importantes par rapport aux quantités retrouvées dans le plasma humain *in vivo*. C'est pourquoi, des études sont nécessaires pour développer des solutions qui permettraient d'augmenter l'absorption des anthocyanosides et/ou leurs métabolites, permettant ainsi l'utilisation optimale des anthocyanosides dans la prévention de cancer chez l'homme, particulièrement dans les tissus autres que le tractus gastro-intestinal et la peau.

## **2. Induction de l'apoptose des cellules cancéreuses par *Vaccinium myrtillus***

Katsube et coll. (31) ont étudié l'activité anticarcinogénique dans un système *in vitro* de dix baies comestibles, et particulièrement celle de *V. myrtillus*. L'activité de la myrtille est testée sur deux lignées cellulaires différentes, les cellules leucémiques humaines HL60 et les cellules carcinomateuses du côlon HCT116. L'étude démontre que l'extrait de *V. myrtillus* est le plus efficace parmi les dix extraits éthanoliques de baies pour inhiber la croissance de ces lignées cellulaires. Toutes les concentrations testées inhibent la croissance des cellules HL60 lors des deux périodes d'incubation (24 et 48 heures) alors que l'inhibition de la croissance des HCT116 n'est observée que pour des intervalles spécifiques de concentrations. De plus, l'extrait éthanolique de *V. myrtillus* induit des niveaux significatifs d'apoptose dans les cellules HL60 mais pas dans les cellules HCT116.

Ce sont les anthocyanosides qui sont responsables de l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses HL60 et HCT116 induisant également l'apoptose des cellules HL60.

Les anthocyanosides de *V. myrtillus*, plus particulièrement les glycosides de delphinidine et malvidine, induisent l'inhibition de la croissance des cellules de la leucémie humaine HL60 par induction de l'apoptose et même si l'extrait éthanolique de *V. myrtillus* et certains anthocyanosides inhibent la croissance des cellules carcinomateuses du côlon humain (HCT116), ces cellules sont toutefois moins sensibles à l'apoptose que les autres lignées ; en se référant à d'autres données, on pourrait suggérer un blocage de la voie d'induction de l'apoptose des cellules HCT116.

L'inhibition de la croissance par les baies n'est toutefois pas spécifique aux cellules cancéreuses. En conclusion, une consommation régulière de baies pourrait maintenir des niveaux d'anthocyanosides dans le plasma. Ces baies sont des aliments fonctionnels prometteurs dans la prévention du risque de cancer grâce à leurs effets multiples comme l'induction de l'apoptose, l'activité antioxydante et d'autres effets anticancéreux.

En 2004, Zhao et coll. (69) ont étudié les effets de trois extraits riches en anthocyanosides, *Vitis vinifera* (Vigne rouge), *V. myrtillus* L. et *Aronia melanocarpa* E. (Aronie noire) sur les cellules cancéreuses du côlon HT-29 et les cellules non tumorigéniques du côlon NCM460.

L'étude démontre l'inhibition de la croissance des cellules HT-29 par *V. myrtillus* à faibles concentrations, tandis que l'effet est pauvre sur les cellules NCM460. Cependant, une période longue d'incubation (72 heures) montre un effet de la myrtille sur la croissance des cellules NCM460. *V. myrtillus* a une activité importante, peut-être grâce à la cyanidine, reportée pour être un inhibiteur efficace de la croissance des cellules cancéreuses coloniques.

Dans cette étude, la croissance des cellules du colon est inhibée alors que les conditions de pH et de température ne sont pas optimum pour la stabilité des anthocyanosides. Les formes actives responsables des effets observés pourraient être dues aux produits de dégradation des anthocyanosides.

En conclusion, cette étude démontre que des extraits riches en anthocyanosides et notamment *V. myrtillus* sont capables d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses du colon HT-29 à plus basse concentration et à des périodes d'incubation plus courtes que la croissance des cellules non tumorigéniques NCM460 du colon. Il reste toutefois à déterminer quels sont les composés des extraits véritablement responsables des effets observés.

### **3. Action de *Vaccinium myrtillus* sur un modèle génétique de polypose adénomateuse familiale humaine**

En 2006, Cooke et coll. (18) ont étudié les effets d'un mélange d'anthocyanosides de *V. myrtillus* (Mirtoselect®) et de cyanidine-3-glucoside ou C3G (anthocyanoside le plus abondant de l'alimentation) sur le développement d'adénome intestinal sur souris  $Apc^{Min}$ , alimentées pendant 12 semaines avec ces extraits. Les souris  $Apc^{Min}$  constituent un modèle génétique de polypose adénomateuse familiale humaine. Cette maladie autosomique dominante de l'homme est caractérisée par le développement spontané d'une centaine de polypes colorectaux pouvant se transformer en carcinomes.

Les résultats de l'étude montrent que les deux extraits utilisés diminuent le nombre d'adénomes d'une manière dose-dépendante (à la plus haute concentration, l'inhibition la plus importante est observée pour la cyanidine-3-glucoside). Les anthocyanosides sont retrouvés dans le plasma à la limite de la détection analytique, et sont retrouvés à des niveaux quantifiables dans l'intestin et l'urine. Les principales formes présentes dans l'intestin et l'urine sont des anthocyanosides glucuronides et des métabolites méthylés. Enfin, les anthocyanosides sont retrouvés dans d'autres tissus que l'intestin.

En conclusion, la dose équivalente de Mirtoselect® chez l'humain est contenue dans environ 740 grammes de baies de *V. myrtillus*, suggérant que la dose efficace de l'extrait chez la souris  $Apc^{Min}$  pourrait être traduite en une dose importante (mais non impossible) chez l'humain. De plus, les glycosides de malvidine sont les anthocyanosides « survivants » les mieux sous forme inchangée dans l'intestin ; leur structure étant moins apte à subir les réactions de conjugaison que celle d'autres anthocyanosides. L'efficacité des anthocyanosides *in vivo* pourrait être due, au moins en partie, à leur hydrolyse en anthocyanidines. La présence transitoire des anthocyanidines après hydrolyse de leurs précurseurs glycosylés et leur transformation par conjugaison métabolique pourraient expliquer l'efficacité de C3G ou du Mirtoselect®. Le niveau d'anthocyanosides à la dose efficace chez la souris  $Apc^{Min}$  est bas dans la circulation systémique mais détectable et mesurable dans le tractus gastro-intestinal et l'urine.

Ainsi, l'absence d'effets indésirables des anthocyanosides et leur efficacité dans la réduction du développement de l'adénome en font de bons candidats pour le développement clinique.

## **4. Action de *Vaccinium myrtillus* sur les récepteurs tyrosine-kinases**

### **4.1. Récepteurs à activité tyrosine kinase : quelques généralités**

Les récepteurs à l'activité tyrosine kinase sont des molécules transmembranaires constituées d'un site récepteur sur lequel se lie un ligand (localisé sur la face extracellulaire) et un site tyrosine kinase (sur la face interne). Ces récepteurs ont en plus un site de phosphorylation. Le site tyrosine kinase (constituant une famille d'enzymes) est normalement inactif mais peut s'activer par phosphorylation de la tyrosine. Le mécanisme d'activation du site tyrosine kinase ne se fait pas par passage d'informations depuis le site de reconnaissance du ligand jusqu'à l'intérieur de la cellule mais par la liaison du ligand sur deux récepteurs pouvant se rapprocher et se phosphoryler mutuellement. Les récepteurs à activité tyrosine kinase jouent un rôle crucial dans la carcinogenèse et la progression tumorale. Des exemples importants de récepteurs à tyrosine kinase comportent la famille ErbB incluant le facteur de croissance épidermique (EGFR, ErbB1) et les récepteurs ErbB2-4, l'IGFR1 (insulin-like growth factor receptor 1), et les VEGFR-2 et VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptors). ErbB et IGF sont des récepteurs à tyrosine kinase surexprimés dans certains types tumoraux résultant dans des modifications de la signalisation cellulaire impliquées dans la croissance cellulaire et la différenciation. Les récepteurs VEGF sont des modulateurs de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse. C'est pourquoi, l'inhibition de l'activité des récepteurs à tyrosine kinase peut être une thérapeutique intéressante (84).

### **4.2. Étude de Teller et coll. (2009)**

Teller et coll. (60) ont étudié les effets de deux extraits standardisés, Mirtocyan<sup>®</sup> (extrait de *V. myrtillus* et Oenocyanin<sup>®</sup> (extrait de raisins) sur l'activité des récepteurs tyrosine kinases (RTKs). Seuls les résultats concernant *V. myrtillus* seront rapportés dans cette thèse. L'inhibition des RTK est évaluée en utilisant une activité kinase recombinante dans un système de cellules libres et en déterminant l'autophosphorylation induit par le ligand dans des cellules carcinomateuses de la vulve E431 et dans des cellules endothéliales aortiques porcines exprimant soit VEGFR-2 soit VEGFR-3. La capacité des extraits riches en anthocyanosides à modifier l'activité des RTK est comparée à leur capacité à moduler la croissance des cellules.

Les deux extraits inhibent l'activité d'une variété de RTKs dans le système de cellules libres (activité kinase des domaines kinases recombinants) et dans les cellules vivantes (récepteur intact, autophosphorylation induite par ligand). Par contre, l'autophosphorylation du récepteur des cellules intactes nécessitent des concentrations 10 à 50 fois plus hautes que celles



nécessaires pour l'inhibition de l'activité kinase recombinante dans le système de cellules libres. Cette différence pourrait s'expliquer par un accès pauvre des glycosides aux domaines kinases recombinants.

De plus, les deux extraits inhibent davantage les kinases associées avec EGFR et le VEGFR-2 que les kinases associées avec ErbB-2, VEGFR-3 et IGF1R. De plus, les extraits présentent peu de spécificité entre les membres des récepteurs de la famille ErbB. Même si les extraits riches en anthocyanosides inhibent l'activité des RTKs, peu d'effets ont été montrés sur la croissance des cellules. Ceci pourrait être dû soit à la faible stabilité des anthocyanosides dans le milieu de culture soit à la présence d'autres voies moléculaires que les RTKs ; ces voies ne seraient pas affectées par les extraits riches en anthocyanosides et auraient la capacité de promouvoir la croissance et la survie cellulaire ; elles pourraient ainsi compenser l'inhibition des RTKs.

L'effet inhibiteur de l'activité des RTKs n'est pas dû aux composants individuels des extraits ; en effet *V. myrtillus* contient un ensemble de composés polyphénoliques ainsi que des constituants inconnus. Les catéchines, flavonols et procyanidines, présents dans les extraits en quantités plus basses que les anthocyanosides, ont montré dans d'autres études des effets inhibiteurs des RTKs. Mais la basse biodisponibilité de ces extraits doit être prise en compte pour l'évaluation de leurs effets physiologiques.

#### **IV. Action de *Vaccinium myrtillus* sur la vision**

Les extraits de *V. myrtillus* ont été utilisés depuis 1964 dans les affections ophtalmiques et dans les désordres de la microcirculation. Des études anciennes ont rapporté les effets de préparations à base du fruit de *V. myrtillus* dans l'acuité visuelle en lumière sombre, dans la vision nocturne chez les sujets ne présentant pas de troubles de la vision, chez les patients avec un problème significatif de vision en lumière vive, les patients atteints de DMLA, de rétinopathie diabétique, d'inflammation rétinienne, de rétinite pigmentaire\* (*V. myrtillus* associé au  $\beta$ -carotène) et enfin chez les patients avec myopie progressive. D'autres études ont recherché les effets de *V. myrtillus* sur la formation de la cataracte chez des patients souffrant de cataracte corticale sénile (extrait pris en association avec la vitamine E). Cependant, l'hypothèse d'un effet de *V. myrtillus* sur la vision est très controversée ; certaines études rapportent des résultats négatifs (35).

Durant la seconde guerre mondiale, les pilotes de la British Royal Air force avaient déjà rapporté une amélioration de l'acuité visuelle après consommation de confitures de myrtilles.

Cependant, durant cette même période, la technologie du radar a été introduite en Grande-Bretagne pour la défense aérienne et des études ultérieures n'ont pas supporté l'hypothèse d'une amélioration de la vision nocturne et de la sensibilité au contraste nocturne\* par la supplémentation en *V. myrtillus*. Le système de radar et non *V. myrtillus* pourrait alors être la cause du succès de la Royal Air Force (66).

### **1. Étude chez des sujets à vision normale**

Des études ont démontré la capacité d'extraits de *Vaccinium myrtillus* seuls ou associés à du  $\beta$ -carotène et de la vitamine E (chez des patients avec ou sans désordre oculaire) à améliorer la vision nocturne, à induire une adaptation à l'obscurité et une restauration de l'acuité visuelle (suite à une exposition à une lumière vive ou un flash) plus rapides (42). D'autres études ont montré l'efficacité des extraits anthocyanosidiques de myrtille à améliorer la vision nocturne et l'ajustement à l'obscurité chez des contrôleurs aériens, des pilotes d'avion, des conducteurs de voiture et de camion (43).

À l'opposé, d'autres études ne prêtent pas à la myrtille des propriétés sur la vision. C'est le cas notamment de l'étude en 2000 de Muth et coll. (46) ; ils ont recherché les effets de *V. myrtillus* sur l'acuité visuelle nocturne et la sensibilité au contraste nocturne. Leur étude est randomisée, double-aveugle et contrôlée par placebo. Les sujets, inclus dans l'étude, sont des hommes jeunes présentant une bonne vision. Un groupe reçoit 160 mg d'extrait de *V. myrtillus* et l'autre groupe un placebo, trois fois par jour pendant 21 jours. Après un mois sans traitement, le test reprend pendant 3 semaines en inversant les groupes (les sujets ayant eu le placebo ont maintenant les capsules de *V. myrtillus* et *vice versa*). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différences entre les mesures de la moyenne de l'acuité visuelle nocturne chez les sujets soumis au traitement par *V. myrtillus* et ceux soumis au placebo. De même, l'examen de la dernière acuité visuelle durant le traitement actif et celui durant le placebo ne révèlent pas de différences dans l'acuité visuelle nocturne. Le même résultat négatif est constaté pour la sensibilité au contraste nocturne.

En conclusion, cette étude n'apporte pas de résultats positifs sur l'effet de *V. myrtillus* sur les deux paramètres mesurés, même si l'extrait est pris à haute dose et pendant une durée significative.

Une critique de l'étude de Muth et coll. (46) pourrait être faite sur la population limitée utilisée ; peu de sujets ont été inclus dans l'étude et ceux-ci étaient tous des hommes jeunes avec une bonne vision. Il est vrai que deux de ces sujets avaient une moyenne d'acuité

visuelle nocturne et une sensibilité au contraste nocturne en dessous des autres sujets ; or, même chez ces sujets, aucune différence de mesure n'a été enregistrée.

Cette étude pose de nouveau des doutes sur l'utilisation de la myrtille dans des formes couramment disponibles et aux doses recommandées comme supplémentation efficace pour l'amélioration de la vision nocturne dans une catégorie de sujets présentant une bonne vision et essentiellement une vision nocturne normale.

## **2. Étude chez des sujets myopes**

Une étude a montré qu'une association d'anthocyanosides de *V. myrtillus* avec vitamine E et  $\beta$ -carotène améliorait le champ visuel de patients atteints de myopie aussi bien lors d'un traitement court que long. De même, il a été démontré une efficacité de l'association d'anthocyanosides de myrtille avec le rétinol sur la sensibilité de la rétine de patients myopes, dans 32 des 42 yeux examinés (43).

En 2005, Lee et coll. (35) ont mis au point une étude randomisée, double-aveugle, contrôlée par placebo, impliquant 60 sujets avec asthénopie\* et myopie basse à modérée avec erreurs réfractaires entre -1 et -8 dioptries au niveau des deux yeux. L'objectif de l'étude est de déterminer l'effet de l'administration d'oligomères d'anthocyanosides purifiés à hautes doses de *V. myrtillus* sur la fonction visuelle nocturne et les symptômes cliniques chez ces sujets de même âge et de sensibilité au contraste similaire. Ainsi, 30 sujets ont reçu des comprimés de 100 mg de traitement contenant 85% d'oligomères d'anthocyanosides et les 30 autres sujets des comprimés placebo deux fois par jours pendant 4 semaines. La fonction visuelle nocturne est évaluée par le test de sensibilité au contraste (test objectif) et les symptômes cliniques par un questionnaire rempli par les sujets (test subjectif) avant et après le traitement. Ainsi, les résultats basés sur l'analyse du questionnaire montrent qu'à la suite des 4 semaines de traitement, les sujets traités par anthocyanosides ont présenté une amélioration des symptômes (meilleurs que le groupe placebo). De plus, le groupe anthocyanoside a montré une sensibilité au contraste améliorée à chaque cycle par degré, alors qu'aucune amélioration n'a été constatée dans le groupe placebo.

Des études anciennes ont reportés une amélioration de la fonction visuelle nocturne chez des sujets normaux prenant des anthocyanosides alors que des études plus récentes n'ont montré aucun effet sur la vision nocturne par administration orale simple ou multiple d'oligomères d'anthocyanosides (35). Ces discordances de résultats pourraient être causées par des différences dans le choix des sujets, les méthodes d'évaluation de la vision nocturne ainsi que la concentration et la dose d'oligomères d'anthocyanosides utilisées. Alors que des études ne

montrent pas d'effets des oligomères d'anthocyanosides chez les sujets normaux, d'autres études démontrent l'efficacité de ceux-ci chez les sujets avec myopie ou héméralopie (diminution anormale de la vision dans l'obscurité).

Dans l'étude de Lee et coll. (35), les conditions sont différentes de celles que l'on peut trouver dans d'autres études qui ont pu être faites, en termes de dose, de durée et de type de sujets. En effet, une haute dose d'oligomères anthocyanosides (concentrés à 85% grâce au processus de fermentation spécifique) est administrée pendant une plus longue période comparée aux autres études. De plus, les sujets utilisés englobent des personnes avec myopie, asthénopie et une sensibilité au contraste mésopique\* diminuée alors que d'autres études utilisent des sujets normaux.

En conclusion, cette étude montre que les anthocyanosides peuvent améliorer les symptômes subjectifs et les résultats de la moyenne de la sensibilité au contraste chez des sujets présentant myopie et asthénopie. Mais d'autres études sont nécessaires pour rechercher la dose optimale de *V. myrtillus*, la durée de traitement nécessaire, la durée de l'effet après l'arrêt du traitement et l'application de ce traitement en clinique chez des patients avec des maladies oculaires comme la rétinite pigmentaire, le glaucome et la rétinopathie diabétique, connus pour réduire la vision nocturne.

### **3. Méta-analyse de Canter et coll. (2004)**

Canter et coll. (13) ont procédé à une méta-analyse des études faites concernant l'effet des anthocyanosides de *V. myrtillus* sur la vision nocturne.

Des 30 études trouvées par les auteurs avec des résultats se référant à la vision dans des conditions de lumière réduites, 12 études sont des études contrôlées par placebo. Les 4 études les plus récentes sont des études contrôlées randomisées et rapportent des résultats négatifs. La 5<sup>ème</sup> étude contrôlée randomisée et les 7 études contrôlées non randomisées rapportent des résultats positifs dans l'amélioration de la vision en lumière réduite. Les résultats négatifs sont associés avec une plus grande rigueur dans la méthodologie mais aussi des doses plus basses et des extraits provenant de sources géographiques distincts pouvant différer dans la composition en anthocyanosides. De plus, dans 11 des 12 études, les sujets utilisés sont des sujets en bonne santé avec une vision moyenne normale, voire au-dessus de la normale. Ainsi, les études cliniques les plus rigoureuses ne supportent pas l'hypothèse d'une amélioration de la vision nocturne chez les sujets en bonne santé par les anthocyanosides de *V. myrtillus*. Cependant, l'association entre rigueur méthodologique, publication récente, résultat négatif est confondu avec plusieurs facteurs de confusion qui peuvent biaiser les études comme la

dose, les différentes variations géographiques modifiant la composition des extraits et le type de sujets inclus dans les études. De plus, les méthodes mises en place pour obtenir et interpréter les électrorétinogrammes employées dans les études plus anciennes diffèrent des procédures standardisées utilisées maintenant.

Lorsque l'analyse des facteurs de confusion est faite, une association entre les résultats positifs et l'utilisation de plus hautes doses en anthocyanosides de *V. myrtillus* est mise en évidence. De plus, la composition phytochimique des extraits diffère selon la géographie des plantes de Myrtille. Les résultats positifs sont souvent associés avec des études utilisant des extraits provenant d'Italie ou de France. La quantité des anthocyanosides de la myrtille (constituants les plus actifs) varie en fonction du cycle de vie des plantes en réponse à des facteurs de stress et des signaux de l'environnement. Ainsi, avec le mûrissement, la quantité des anthocyanosides augmente alors que celle des proanthocyanidines diminue. C'est pourquoi, à cause des différences géographiques, une standardisation d'une quantité en pourcentage fixe d'extrait est une procédure insuffisante pour garantir une composition identique et une activité pharmacologique. Lors des études, d'autres composants peuvent être ajoutés avec les anthocyanosides de myrtille comme le  $\beta$ -carotène (un déficit est connu pour être lié à une altération de la vision nocturne). L'effet confondant du  $\beta$ -carotène dans certaines études ne peut être correctement évalué sans connaître le statut nutritionnel des sujets. Dans cette méta-analyse, 5 études utilisent dans le traitement actif du  $\beta$ -carotène. Une étude ne montre pas de différences dans l'interprétation de l'électrorétinogramme des sujets traités avec l'extrait de *V. myrtillus* avec ou sans  $\beta$ -carotène et 3 études réalisées dans les années 1940 montrent que le  $\beta$ -carotène n'a pas d'effet sur l'adaptation nocturne quand il est administré seul.

En conclusion, des études rigoureuses sur les effets des extraits de *V. myrtillus* vis-à-vis de sujets souffrant d'une altération de la vision nocturne due à des conditions pathologiques oculaires sont nécessaires. Cependant, la présence d'études plus faibles dans la méthodologie, le témoignage des études animales, les études des anthocyanosides synthétiques (la cyanidine synthétique utilisée dans des études contrôlées par placebo dans les années 1970 et 1980 a montré une amélioration de la vision nocturne chez des sujets en bonne santé et souffrant d'une variété de désordres ophtalmologiques), une étude contrôlée randomisée de *Ribes nigrum* montrant un effet positif sur le seuil d'adaptation nocturne, pourraient justifier des études complémentaires sur les anthocyanosides de myrtille chez des sujets présentant une altération de la vision nocturne.

#### **4. Étude de *Vaccinium myrtillus* sur la rétinopathie diabétique**

La rétinopathie diabétique est une complication à long terme du diabète qui se traduit par une dégénérescence des capillaires irrigant la rétine. La maladie se manifeste par des microanévrismes qui sont de petites dilatations de la paroi des capillaires (présence de petits points rouges, d'hémorragies et d'apparition d'exsudats...). Dans des formes évoluées, une baisse de la vision peut survenir (1). La néovascularisation est la principale modification rencontrée dans la rétinopathie diabétique, résultant d'une interaction avec des cytokines et des facteurs de croissance pouvant être responsables de l'angiogenèse comme dans le cancer. Or, VEGF joue un rôle dans la néovascularisation rétinienne même si son rôle exact dans la survenue précoce de la pathologie n'est pas encore entièrement compris (16).

En 2005, une étude menée par Chung et coll. (16) a démontré la capacité de *Vaccinium myrtillus* à diminuer le glucose sanguin plasmatique et à réduire le pourcentage de surface de vascularisation rétinienne chez des rats diabétiques compliqués d'une rétinopathie diabétique ; ces pathologies étant induites par la streptozocine. Cependant, pas d'effet est constaté sur le VEGF (16).

Une étude clinique a démontré l'efficacité des anthocyanosides de *V. myrtillus* (administration orale de 480 mg/jour pendant 180 jours) sur les manifestations de la rétinopathie diabétique, notamment la réduction voire la disparition des hémorragies rétinienne chez des patients diabétiques (diabète type 2) et souffrant d'une rétinopathie non proliférative (43). L'amélioration significative des examens ophtalmoscopiques et angiographiques après traitement avec 320 mg de Myrtocyan<sup>®</sup> pendant 30 jours a été montrée chez 77 à 92 % des 40 patients, inclus dans l'étude et souffrant de diabète et de rétinopathie hypertensive (43).

#### **5. Effets de *Vaccinium myrtillus* sur les cellules épithéliales cornéennes**

L'épithélium de la surface oculaire joue le rôle fondamental de barrière empêchant l'entrée de substances nocives dans la cornée et maintenant l'intégrité de la surface oculaire. La prolifération des cellules épithéliales cornéennes permet la régénération du tissu pour maintenir le rôle protecteur de la cornée et la cicatrisation. C'est pourquoi le cycle cellulaire est très important. Au niveau de ces cellules, des glycosaminoglycanes (GAGs, glucides de l'organisme localisés dans le mucus, les sécrétions digestives et le tissu conjonctif) sulfatés sont produits par les trois types de cellules de la cornée (cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes). Les GAGs de l'épithélium cornéen peuvent moduler le comportement cellulaire comme l'adhésion, la migration... et jouent donc un rôle important pour la

cicatrisation cornéenne. L'un des GAGs est l'acide hyaluronique, substance de la matrice extra-cellulaire, jouant plusieurs rôles, notamment dans la lubrification, l'hydratation de la matrice cornéenne et l'homéostasie. Il pourrait aussi améliorer la santé de la surface oculaire et réduire la pression intraoculaire lors de la pose chirurgicale d'un implant oculaire (55). Song et coll. (55) ont récemment étudié les effets d'un extrait de *V. myrtillus* sur le cycle, la croissance cellulaire, l'expression des GAGs et de l'acide hyaluronique dans un modèle *in vitro* de cellules épithéliales limbales cornéennes humaines. Les résultats démontrent l'efficacité de l'extrait de myrtille et ses anthocyanosides à promouvoir la division et la prolifération des cellules épithéliales cornéenne, sans aucune toxicité cellulaire, et à augmenter la quantité totale de GAGs sans modifications significatives de l'acide hyaluronique. L'extrait de myrtille peut alors être bénéfique pour la régénération physiologique et l'homéostasie.

## **V. Action de *Vaccinium myrtillus* sur le diabète**

Helmstädter (26) a répertorié les substances antidiabétiques utilisées avant la découverte de l'insuline. Parmi toutes les plantes, *V. myrtillus* est celle la plus fréquemment retrouvée dans les préparations antidiabétiques commerciales au XX<sup>ème</sup> siècle. Les feuilles pourraient être la partie de plante la plus utilisée. Une préparation très commune était le « *Pilulae Myrtilli Jasper* » (1912), chacun contenant 0,12 grammes d'extraits de feuilles, mais cette préparation n'était mentionnée qu'occasionnellement dans les traités scientifiques et seulement quelques recherches ont été retrouvées.

### **1. Action sur le glucose du sérum et la fructosamine**

Petlevski et coll. (48) ont étudié les effets d'une préparation à base de plantes antidiabétiques comprenant la feuille de *V. myrtillus* et d'autres plantes, brevetée sous le numéro No. P-9801091, disponible sur le marché Croate. Deux extraits, un extrait éthanolique (extrait 1) et non éthanolique (extrait 2) sont administrés à des souris (NOD) non obèses rendues diabétiques par l'alloxane (dérivé pyrimidique produisant chez l'animal une nécrose des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans).

L'étude démontre que les extraits 1 et 2 diminuent le glucose sanguin de 10 et 20% respectivement de la valeur initiale des souris NOD contrôles (sans traitement). L'effet de l'extrait 2 est donc beaucoup plus marqué ; il est comparé à un antidiabétique de référence (acarbose). Les résultats montrent que l'extrait diminue significativement le niveau de glucose

sanguin alors que la diminution par l'acarbose n'est pas significative. La même chose est observée pour le niveau de fructosamine dans le sang.

## **2. Action sur le métabolisme lipidique de rats diabétiques**

Le diabète est une maladie souvent associée à des désordres métaboliques comme une hypertriglycéridémie. L'insuline joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipoprotéines. Chez la plupart des patients atteints de diabète type 1 (insulino-dépendant), l'hypertriglycéridémie est induit par une moindre activité de la lipase lipoprotéique (enzyme permettant l'hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines plasmatiques) dépendante de l'insuline.

Une étude menée en 1996 par Cignarella et coll. (17) a montré que l'administration orale (pendant 4 jours) d'un extrait hydro-alcoolique séché de feuilles de *V. myrtillus* à des rats rendus diabétiques par streptozocine pouvait diminuer le niveau de glucose plasmatique par environ 26 % et le niveau de triglycérides plasmatiques par 39%. Ainsi, l'extrait de myrtille expose une activité hypolipidémiant dose-dépendante chez les rats en stimulant le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides, probablement sous des conditions en déficits d'insuline. Par contre, à l'opposé du ciprofibrate (une molécule de référence dans le traitement de l'hypertriglycéridémie), l'extrait de *V. myrtillus* ne prévient pas la formation de thrombus veineux chez ces rats diabétiques.

Ces études *in vivo* ont montré l'action hypoglycémiant de *V. myrtillus* ; une fois les constituants isolés, cette plante à usage traditionnel pourrait également attirer l'attention sur le traitement de certains désordres du métabolisme lipidique.

## **VI. Action de *Vaccinium myrtillus* sur l'estomac**

### **1. Action sur l'ulcère gastrique**

Borrelli et coll. (10) ont listé les agents phytogéniques utilisés comme remèdes des ulcères gastriques. Des résultats ont démontré l'action significative de *V. myrtillus* dans la prévention et le traitement des ulcères. Certaines études ont montré ses effets protecteurs dans des ulcères induits par ligature du pylore, par la réserpine ou la phénylbutazone où le traitement avec les anthocyanosides de *V. myrtillus* a été donné avant ou pendant la formation de l'ulcère. La myrtille exerce un effet anti-ulcère, en partie, par une augmentation du mucus dans la paroi de l'estomac (améliorant l'efficacité de la barrière formée par ce mucus) et peut influencer la biosynthèse des mucopolysaccharides.



Magistretti et coll. (37) montrent qu'un extrait d'anthocyanosides de *Vaccinium myrtillus* possède une action anti-ulcère intéressante dans divers modèles expérimentaux. De ces résultats, les auteurs ont voulu trouver les composants de *Vaccinium myrtillus* responsables de cette action. Or, cette plante, comme nous le savons, est riche en anthocyanosides et anthocyanidines (aglycones respectifs). Cela explique pourquoi les auteurs ont étudié les effets sur l'ulcère aigu et chronique chez des rats, d'une anthocyanidine, la cyanidine ou 3, 5, 7-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxyphényl)-1-benzopyrylium chloride (IdB 1027). Les résultats montrent les effets d'IdB 1027 suivants :

- réduction de l'ulcère gastrique induit par la ligature du pylore de façon non dose-dépendante,
- inhibition de l'ulcère de stress,
- protection de l'estomac de l'ulcère induit par phénylbutazone,
- réduction de la sévérité de l'ulcère induit par indométacine de façon dose-dépendante,
- inhibe significativement l'ulcération gastrique induit par réserpine,
- protection significative mais pas dose-dépendante contre les lésions induites par l'éthanol,
- inhibe significativement et de façon dose-dépendante l'ulcère induit par histamine,
- et réduction significative les lésions induites par acide acétique.

En conclusion, l'IdB 1027 est capable de réduire ou même d'inhiber les ulcères induits par de nombreux facteurs comme la ligature du pylore, les AINS. Les mécanismes par lesquels un médicament augmente les défenses de la muqueuse gastrique sont variés ; cela peut être une influence sur la sécrétion et les propriétés physicochimiques du mucus, ou une stimulation de la régénération cellulaire, une influence sur la microcirculation de la muqueuse, la sécrétion de bicarbonate, la protection contre les dommages induits par les radicaux libres ou l'augmentation de l'AMP cyclique. Ainsi, l'IdB 1027 peut agir par une combinaison de certains de ces mécanismes comme une augmentation de la sécrétion de mucus (sans effet anti-sécrétoire gastrique) dans des conditions physiologiques normales et dans des conditions de défense altérées, la stimulation de la régénération cellulaire montrée par son activité contre l'ulcère induit par acide acétique, l'amélioration de la microcirculation de la muqueuse montrée par son activité contre l'ulcère généré par l'histamine. De plus, l'IdB 1027 est un antioxydant et les anthocyanidines sont des inhibiteurs efficaces de l'AMPc-phosphodiesterase dans des tissus variés, ce qui pourrait contribuer à l'activité pharmacologique observé.

En conclusion, les effets démontrés dans les modèles d'animaux, l'absence de toxicité et l'excellente tolérance, font de cette molécule, un bon candidat dans des études cliniques comme agent antiulcèreux.

## **2. Action sur *Helicobacter pylori***

Le traitement contre *Helicobacter pylori* est la plupart du temps constitué de deux antibiotiques et d'un inhibiteur de la pompe à protons comme l'oméprazole par exemple. Or, le problème qui se pose est l'apparition d'une résistance aux antibiotiques. De plus, la bactérie peut intervenir dans la production des radicaux libres de l'oxygène augmentant davantage le stress oxydant et ses dommages au niveau gastrique. Une augmentation de la peroxydation lipidique et un dommage à l'ADN au niveau des tissus gastriques sont alors observés. Par conséquent, des antioxydants naturels comme les anthocyanosides de *Vaccinium myrtillus* pourraient servir comme outil thérapeutique pour réduire le stress oxydant induit par *Helicobacter pylori* (15).

Chatterjee et coll. (15) ont étudié les effets de différents extraits de baies sur *Helicobacter pylori* avec ou sans clarithromycine *in vitro*, ainsi que la sensibilité de la bactérie à la clarithromycine. Plusieurs baies sont étudiées comme la myrtille sauvage (*Vaccinium myrtillus*), l'airelle, la canneberge, la fraise, la framboise, le sureau, et Optiberry® (un mélange de ces six baies). Cette étude a montré que tous les extraits, aux concentrations testées, inhibent la croissance de manière dose-dépendante de *H. pylori*, avec une efficacité supérieure pour Optiberry®. C'est la première étude montrant l'inhibition de *H. pylori* par des extraits de baies, et notamment *V. myrtillus*, lequel présente une meilleure activité que la fraise, la framboise et la canneberge, en particulier pour des basses concentrations. Enfin, un effet inhibiteur supplémentaire est obtenu avec l'ajout de la clarithromycine associée aux extraits de baies à toutes les concentrations testées.

## **VII. Autre effet de *Vaccinium myrtillus***

### **1. Action antibactérienne**

Une étude menée en 2005 par Puupponen-Pimiä et coll. (51) a montré l'activité antibactérienne de plusieurs baies nordiques, incluant *V. myrtillus*. Les résultats rapportés dans cette thèse ne se réfèrent qu'à la myrtille et sont résumés dans le tableau suivant :

	<i>Listeria monocytogenes</i> E-991205		<i>Salmonella enterica</i> sv. <i>thyphimurium</i> E-981151		<i>Staphylococcus aureus</i> E-70045		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> E-96666	
Temps d'incubation	12h	24h	12h	24h	12h	24h	12h	24h
2 mg.mL <sup>-1</sup>	-	-	+	-	++	++	-	-
10 mg.mL <sup>-1</sup>	-	-	+++	+	+++++	+++++	-	-

Tableau VI : Activité antimicrobienne de la baie de *V. myrtillus* lyophilisée

(Légende : C : concentration de la baie de myrtille ; - : pas d'effets inhibiteurs ; + : nombre de bactéries viables différent de  $10^{-5} \times 10^1$  par rapport au contrôle ; ++ : nombre de bactéries viables différent de  $5 \times 10^1 - 5 \times 10^2$  par rapport au contrôle ; +++ : nombre de bactéries viables différent de  $5 \times 10^2 - 5 \times 10^3$  par rapport au contrôle ; ++++ : nombre de bactéries viables différent de  $5 \times 10^3 - 5 \times 10^4$  par rapport au contrôle ; +++++ : nombre de bactéries viables différent de plus  $5 \times 10^4$  par rapport au contrôle)

Les résultats démontrent l'activité antimicrobienne de la myrtille lyophilisée sur les bactéries *Salmonella* et *Staphylococcus* augmente de manière concentration-dépendante. Par contre, la myrtille n'a aucune activité vis-à-vis de *Listeria* et *Lactobacillus*.

Les composés phénoliques ne sont responsables que partiellement de l'inhibition de la croissance des bactéries *Salmonella*, les effets antimicrobiens étant probablement détenus par d'autres composés comme les acides organiques.

Les baies, et notamment *V. myrtillus* pourraient être utilisées dans les aliments fonctionnels et dans l'industrie pharmaceutique en tant qu'agents antimicrobiens.

Ainsi, la myrtille utilisée traditionnellement est présente dans de nombreuses études qui ont démontré ses multiples actions dans des domaines médicaux variés et des pathologies diverses comme l'insuffisance veineuse, l'athérosclérose, le cancer, le diabète, les désordres oculaires.... Par ailleurs, son action antioxydante attire l'attention des scientifiques et il serait favorable d'entreprendre des études cliniques.

## VIII. Toxicologie

### 1. Effets indésirables

Dans les études cliniques sur les extraits de *V. myrtillus* répertoriées par Marazzoni et coll. en 1996 (43), aucun effet indésirable n'a été observé, même lors d'études où le traitement aux

extraits de *V. myrtillus* est pris sur une longue période. Cependant, la plupart des études n'incluaient qu'un petit nombre de patients. Une étude de surveillance post-marketing a inclus 2.295 sujets prenant 160 mg de Myrtocyan<sup>®</sup>, deux fois par jour pendant 1-2 mois pour des pathologies diverses (insuffisance veineuse des membres inférieurs, fragilité capillaire, modifications de la microcirculation rétinienne ou hémorroïdes). Cette étude a montré que seuls 94 sujets ont reporté des effets indésirables, surtout liés à la peau, au tractus gastro-intestinal et au système nerveux. Une étude non-contrôlée incluant des femmes enceintes avec insuffisance veineuse des membres inférieurs et en crise hémorroïdaire montre qu'une administration d'un extrait de myrtille (80 ou 160 mg) deux ou trois par jour pendant trois mois n'entraînait pas d'effets indésirables. Mais en présence de peu d'études toxicologiques et d'une sécurité de la myrtille non établie, l'utilisation de la myrtille chez la femme enceinte et allaitante devrait être proscrite.

## **2. Doses létales 50 (DL50)**

Les données toxicologiques indiquent une DL50 pour le Myrtocyan<sup>®</sup> d'environ 2 g/kg chez les souris et les rats. Chez le chien, des doses uniques de 3 g/kg n'entraînent pas d'effets indésirables si ce n'est une coloration plus foncée des urines et fèces. Une administration orale quotidienne d'extrait de *V. myrtillus* à des doses de 125 à 500 mg/kg et 80 à 320 mg/kg respectivement à des rats et des chiens pendant 6 mois n'entraînent ni mortalité, ni toxicité. Les études pharmacocinétiques réalisées chez des rats ont démontré une élimination rapide des anthocyanosides de myrtille dans les deux heures suivant une administration orale (5). Il est établi dans la Note explicative de l'Agence du médicament (1998) que si les parties de myrtille utilisées pour les phytomédicaments est une poudre de fruit frais ou sec, ou de feuille, le dossier « abrégé » de l'AMM doit présenter une étude toxicologique allégée ; celle-ci n'étant pas indispensable pour certaines formes galéniques à base de myrtille (tisane, extrait aqueux, teinture, extrait hydro-alcoolique). La monographie de la Commission E allemande précise que si la baie de myrtille est atoxique, la feuille, quant à elle, peut induire des intoxications chroniques en cas de doses élevées ou d'usage prolongé. Les premiers symptômes chez l'animal se traduisent par une anémie, une cachexie, un ictère, un état d'excitation aigüe et des perturbations du tonus pouvant à terme être fatale après une administration chronique de 1,5 g/kg/jour. Ces symptômes ressembleraient à ceux présents dans l'intoxication par l'hydroquinone ; ce diphénol n'est pourtant pas présent dans la feuille de myrtille. La Commission E, par prudence, ne justifie pas l'utilisation de la feuille dans un but thérapeutique face à ces risques. La Note explicative de l'Agence du médicament, quant à

elle, ne demande un essai toxicologique que pour la poudre de feuille mais pas pour les extraits (quelque soit le titre) (11). De ce fait, d'autres études toxicologiques seraient nécessaires.

### **3. Contre-indications de *Vaccinium myrtillus***

Même si aucune contre-indication n'est mentionnée dans la littérature, il convient toutefois de considérer un risque potentiel d'interaction entre les préparations à base de myrtille et d'autres produits médicinaux ayant des effets similaires ou opposés à ceux de la myrtille. Des études précliniques, par exemple, ont montré que les extraits de *V. myrtillus* avaient un effet anti-agrégant et pouvaient augmenter le temps de saignement (5). Une surveillance devrait être apportée lors d'association entre les spécialités à base de myrtille et les médicaments antiagrégants ou anticoagulants, même si aucune interaction n'a été rapportée. Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation de spécialités à base de myrtille est déconseillée chez la femme enceinte ou allaitante (5).

**QUATRIEME PARTIE :**  
**UTILISATIONS DE *VACCINIUM***  
***MYRTILLUS L.***

## **I. Utilisations alimentaires de *Vaccinium myrtillus***

La myrtille est avant tout un fruit très apprécié par les consommateurs pour ses propriétés gustatives et sa valeur nutritive.

### **1. Utilisations culinaires**

Les promeneurs, friands des baies de myrtille, les consomment sur place ou chez eux. Il est important de laver les baies avant leur consommation car l'homme risque d'être touché par l'échinococcose multiloculaire. Cette maladie parasitaire est une cestodose qui sévit dans l'hémisphère Nord, le Massif central, l'Est de la France et la Suisse. Le renard et autres canidés (chiens) se contaminent eux-mêmes en mangeant des rongeurs sauvages parasités (campagnoles...); ils déposent alors des selles contenant des œufs de ténia sur le sol; l'homme s'infeste en mangeant les myrtilles proches du sol. La maladie se caractérise par le développement de la larve de ténia dans le foie, y formant de nombreux alvéoles. Les symptômes principaux sont douleur sourde, amaigrissement et ictère (1).

Utilisées en cuisine, les myrtilles font l'objet de nombreuses recettes culinaires. Elles sont utilisées pour accommoder les viandes leur apportant une saveur acidulée. Des charcutiers les ajoutent même à leurs saucissons pour les rendre plus moelleux.

Les myrtilles sont souvent retrouvées dans de nombreuses pâtisseries (sablés citronnés, cakes, brioches, tartes, tartelettes, puddings, vacherins soufflés et glacés, coulis de fruits rouges, sorbets, glaces...).

Les baies peuvent aussi être utilisées pour la préparation de confiture, gelée et compote. Certains agriculteurs-récolteurs vendent les myrtilles en confiture sur les marchés locaux.

Enfin on retrouve des boissons à base de myrtilles (jus de fruit, nectar, sirop, liqueur, vin et vinaigre) (22).

### **2. Utilisation dans l'industrie alimentaire**

Les propriétés tinctoriales des anthocyanes de myrtille sont utilisées dans l'industrie alimentaire comme colorant sous la codification E 163. Grâce à leur très faible toxicité, il n'y aucune quantité maximale spécifiée (*quantum satis*), ni dose journalière acceptable. Malgré leurs propriétés tinctoriales, les anthocyanes sont peu utilisées dans l'industrie alimentaire à cause de leur instabilité (perte ou changement de couleur) en présence de certains facteurs physico-chimiques de l'environnement comme le pH, la température et la lumière. De plus,

d'autres problèmes s'ajoutent à leur utilisation comme leur réaction avec le dioxyde de soufre (substance utilisée pour la conservation d'aliments), leur faible solubilité dans l'eau et leur précipitation formant des complexes avec les protéines. C'est pourquoi, des procédés ont été recherchés pour augmenter leur stabilité comme l'utilisation d'hydrocolloïdes comme l'alginate de sodium et un surfactant ionique comme le laurylsulfate de sodium (3).

## **II. Utilisations pharmaceutiques**

Pour rappel, la liste des plantes médicinales de la Pharmacopée française X<sup>ème</sup> édition comporte deux parties (2) :

La **LISTE A** « Plantes médicinales utilisées traditionnellement » et la **LISTE B** « Plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu ».

La myrtille appartient à la liste A des plantes médicinales de la Pharmacopée française X<sup>ème</sup> édition mais n'y fait l'objet d'aucune monographie. À la Pharmacopée Européenne 6<sup>ème</sup> édition, le fruit frais et sec de myrtille font l'objet d'une monographie (Annexe II et III respectivement). En France, certaines indications thérapeutiques selon la partie de plante utilisée sont revendiquées dans la Note explicative de l'Agence du médicament (1998). Ainsi, on retrouve les indications suivantes :

- pour le fruit (frais ou sec) et la feuille par voie orale ou en usage locale : traditionnellement utilisé dans les manifestations subjectives de l'insuffisance veineuse telles que jambes lourdes et dans la symptomatologie hémorroïdaire.

Il y a d'autres indications thérapeutiques possibles comme :

- pour le fruit (frais ou sec) par voie orale : traditionnellement utilisé comme traitement adjuvant de la composante douloureuse des troubles fonctionnels digestifs,

- pour le fruit frais (voie orale ou usage local) : traitement symptomatique des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire tels que ecchymoses, pétéchies ;

- pour la feuille et le fruit sec (voie orale) : traitement symptomatique des diarrhées légères.

La Commission E allemande précise dans la monographie (1987) que le fruit de myrtille est également utilisé pour le traitement des diarrhées aiguës et pour l'inflammation locale modérée des muqueuses de la cavité buccale. Le fruit séché est utilisé à la dose de 20 à 60 g. par jour en décoction par voie orale pour le traitement de la diarrhée chez l'adulte.



Ainsi, les extraits riches en anthocyanosides des fruits de la myrtille peuvent entrer dans la composition de médicaments utilisés pour traiter les manifestations fonctionnelles de l'insuffisance veinolymphatique, la symptomatologie des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire et les troubles de la vision mésopique et scotopique\* (11).

## **1. Médicaments à base de myrtille**

### **1.1. Médicaments allopathiques (82)**

#### **Laboratoire LEURQUIN-MEDIOLANUM**

**DIFRAREL<sup>®</sup> 100** (comprimé enrobé bleu clair, conditionnement de 20 comprimés). Médicament vasculoprotecteur d'autorisation de mise sur le marché (AMM) n° 3400930311714 (1987 révisé le 24/08/2005). Il est en vente libre et non remboursé par la sécurité sociale.

C'est une spécialité pharmaceutique associant 100 mg d'un extrait anthocyanosidique de *V. myrtillus* et 5 mg de  $\beta$ -carotène, avec comme indications :

« - Traitement d'appoint des manifestations fonctionnelles de l'insuffisance veinolymphatique (jambes lourdes, douleurs, impatiences du *primodecubitus*),  
- Traitement symptomatique d'appoint des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire,  
- Traitement d'appoint des baisses d'acuité et troubles du champ visuel présumés d'origine vasculaire ».

La posologie est de 3 à 6 comprimés par jour, en cure de 20 jours par mois renouvelable si nécessaire.

**DIFRAREL<sup>®</sup> E** (comprimé enrobé blanc)

Médicament ophtalmique à visé vasculoprotectrice d'AMM n°34009**30311592** (1965/97 révisé le 28/02/2006) pour le conditionnement de 26 comprimés et n°34009**37701068** (2006) pour le conditionnement de 60 comprimés. Il est en vente libre et non remboursé par la sécurité sociale.

Cette spécialité pharmaceutique associe 50 mg d'un extrait anthocyanosidique de myrtille et 50 mg d' $\alpha$ -tocophérol, avec comme indication les troubles de la vision mésopique, scotopique (héméralopie) et la myopie.

La posologie est de 3 à 6 comprimés par jour en cure de 20 jours par mois, renouvelable si nécessaire.

## 1.2. Médicaments homéopathiques

### LABORATOIRE BOIRON

Ce laboratoire homéopathique commercialise la teinture mère de *V. myrtillus* et des dilutions homéopathiques.

À la Pharmacopée française, la myrtille a une monographie spécifique intitulée : « *Vaccinium myrtillus* pour préparations homéopathiques » (Annexe IV).

### LABORATOIRE LEHNING

**DIACURE®** (conditionnement de 60 gélules) d'AMM n° 3232544

Médicament homéopathique en vente libre et non remboursé par la sécurité sociale. Il est constitué de l'association suivante :

- *Taraxacum* pulvérisé (H) (Pissenlit) : 40 mg
- *Berberis vulgaris* (H) D3 (Epine-vinette) : 40 mg
- *Juglans regia* pulvérisé (H) (Noyer) : 120 mg
- *Achillea millefolium* (H) D2 (Achillée millefeuille) : 40 mg
- *Vaccinium myrtillus folium* pulvérisé (H) (feuille de myrtille) : 80 mg
- *Erythrea centaurium* pulvérisé (H) (Petite centaurée) : 40 mg
- *Natrum phosphoricum* (H) D3 : 40 mg

Ce médicament homéopathique est traditionnellement utilisé pour les polysurcharges métaboliques (facilite l'élimination des déchets métaboliques) et notamment comme traitement divers du diabète ; la feuille de myrtille y est utilisée pour ses propriétés hypoglycémiantes.

La posologie est de 1 à 2 gélules 3 fois par jour en dehors des repas, en cure de 1 à 2 mois (82).

**DIABENE®** (solution buvable, flacon de 30 mL) d'AMM n° 3030349 est un médicament homéopathique en vente libre et non remboursé par la sécurité sociale

Il est constitué de l'association suivante : *Alchemilla vulgaris* D3, *Kreosotum* D4, *Strychninum nitricum* D4, *Arsenicum album* D4, *Adrenalinum* D6, *Belladonna* D4, *Syzygium jambolanum* D2, ***Vaccinium myrtillus* D2**, *Taraxacum* D3, *Natrum phosphoricum* D3, *Helonias dioica* D2.

Ce médicament homéopathique est traditionnellement utilisé dans les polysurcharges métaboliques comme traitement divers de l'obésité.

La posologie est de 30 gouttes 3 fois par jour, de préférence en dehors des repas (82).

### **1.3. Compléments alimentaires**

#### **LABORATOIRE MERCK**

**BION 3 SENIOR®** (conditionnement de 30 ou 60 comprimés)

Complément alimentaire constitué de 3 probiotiques, 12 vitamines, 8 oligo-éléments et 3 extraits végétaux (100 µg de lutéine, extraits de 20 mg de ginseng et 1 mg de **myrtille**). Il est préconisé en cas de sphère ORL fragilisée, de défenses naturelles affaiblies et pour mieux faire face aux rythmes de vie actuels : alimentation déséquilibrée, stress, surmenage. La posologie est de 1 comprimé par jour en cure de 30 ou 60 jours (82).

**RICHELET® ANTI-AGE VISION** (conditionnement de 30 comprimés)

C'est un complément alimentaire composé de lutéine, 10,5 mg d'extrait de **myrtille**, des vitamines B1, B2 et B6, A, C, E et du sélénium. La myrtille est utilisée dans ce produit pour améliorer la microcirculation sanguine de l'œil et assurer le bon fonctionnement de ses constituants. La posologie est de 1 comprimé par jour pendant 3 mois, à renouveler périodiquement (82).

#### **LABORATOIRE LEURQUIN-MEDIOLANUM**

**DIFRAVISION® ANTI-VIEILLISSEMENT**

Complément alimentaire à visée oculaire comprenant des vitamines (vitamine C et E), des oligo-éléments (Zn et Se), des pigments maculaires (lutéine, extrait de maïs dont zéaxanthine), du DHA ( $\omega_3$ ), des huiles de poisson et un **extrait sec de myrtille** dosé à 100 mg (pour 2 gélules). Sur la notice du médicament, on trouve les indications suivantes : « il est conseillé pour corriger les effets néfastes au niveau oculaire des déficits antioxydants, en acides gras essentiels et en pigments maculaires ». La posologie est de 1 gélule 2 fois par jour (notice du complément alimentaire).

#### **LABORATOIRE ARKOPHARMA**

Ce laboratoire pharmaceutique fabrique des gélules contenant de la poudre totale micronisée. Aujourd'hui, seule la baie de myrtille est commercialisée par le laboratoire Arkopharma.

Les Arkogélules de myrtille (baie) sont indiquées dans la diarrhée, la colite et l'amélioration de la vision nocturne (Brochure Arkopharma).

La myrtille est présente dans beaucoup d'autres compléments alimentaires que nous ne citerons pas ici.

THESE SOUTENUE PAR : MAILLEFERT Olivia

TITRE : *Vaccinium myrtillus* L. : une plante médicinale à anthocyanosides.

## CONCLUSION

La famille des Ericacées rassemble de nombreux genres et espèces ; l'une de ses quatre sous-familles, les Vaccinioïdées, englobe le genre *Vaccinium* constitué d'environ 150 espèces dont *Vaccinium myrtillus* Linné ou myrtille sauvage. Cette plante est un sous-arbrisseau formant des tapis denses dans les bois et les landes des terrains siliceux. On la rencontre surtout dans le nord et le centre de l'Europe ; en France, la myrtille sauvage est commune dans la plupart des régions montagneuses. Sur le plan mondial, elle pousse également en Asie et en Amérique boréale. *V. myrtillus* empreinte divers noms vernaculaires comme airelle, airelle anguleuse, brimbelle, raisin des bois, raisin de bruyère... Ses propriétés thérapeutiques sont connues depuis le Moyen-âge ; les feuilles et les fruits (baies) de *V. myrtillus* ont été utilisés dans la médecine traditionnelle européenne : les fruits pour leurs propriétés astringentes, toniques, antiseptiques, particulièrement dans le traitement de la diarrhée, la dysenterie, les hémorroïdes, les inflammations gastro-intestinales, les infections buccales, le scorbut et les désordres urinaires ; quant aux feuilles, elles étaient particulièrement utilisées pour leurs propriétés hypoglycémiantes ainsi qu'en application locale lors d'inflammations oculaires, buccales, cutanées et pour les brûlures. Seule la baie de *V. myrtillus* a une monographie à la Pharmacopée Européenne (6<sup>ème</sup> édition). Le myrtillier a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ayant montré de multitudes activités pharmacologiques dans divers domaines médicaux comme le vasculaire (effets vasoprotecteur, anti-agrégant plaquettaire, vasodilatateur, anti-inflammatoire et anti-angiogénique) ; d'autres études ont démontré une action antioxydante en piégeant les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (stress oxydant impliqué dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, les complications diabétiques, les maladies neurodégénératives...), des effets anti-cancéreux, anti-ulcéreux, anti-bactérien, une action hypoglycémiante et une action sur la vision. Les activités de *V. myrtillus* démontrées *in vitro* et chez l'animal sont principalement dues à sa forte proportion en anthocyanosides, composés phénoliques de la classe des flavonoïdes, pigments responsables de la couleur de la plupart des fleurs et des

fruits. La myrtille contient quinze anthocyanosides (glucosides, galactosides et arabinosides de delphinidine, cyanidine, pétunidine, péonidine et malvidine). Ceux-ci sont fortement antioxydants, cette activité étant très recherchée pour combattre les méfaits du stress oxydant. Quant à l'activité de cette plante sur la vision, elle demeure controversée suite à diverses études cliniques. D'autres études devraient être réalisées pour confirmer chez l'homme ses diverses activités pharmacologiques et préciser la biodisponibilité et le métabolisme des extraits de *Vaccinium myrtillus*.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 29 avril 2010

LE DOYEN

Pr. Renée GRILLOT  
Directeur UFR Pharmacie  
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Professeur Renée Grillot

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Dr Serge Krivobok

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) AMARENCO, AMOR, AMOUROUX et coll., *Larousse médical*, Paris, 2001.
- (2) ANONYME , Pharmacopée française X<sup>ème</sup> édition.
- (3) ANTAL D.S., GARBAN G., GARBAL Z. The anthocyanins : biologically-active substances of food and pharmaceutical interest.  
*The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati*, 2003, fascicle **VI** : 106-115.
- (4) ARNAL B., BUREAU L, LE JEUNE R. La canneberge d'Amérique, propriétés et indications.  
*Phytothérapie*, 2008, **6** : 129-132
- (5) BAMES J, ANDERSON L.A., PHILLIPSON D. *Herbal medicines*, Pharmaceutical Press., Londres, Chicago, 2007.
- (6) BAO L., YAO X.S., YAU C.C. et coll. Protective effects of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice.  
*J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56** : 7803-7807.
- (7) BELIVEAU R., GINGRAS D. *Les aliments contre le cancer*, Editions Solar, 2008.
- (8) BERTUGLIA S., MALANDRINO S., COLANTUONI A. Effect of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on ischaemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation.  
*Pharmacological Research*, 1995, **31** : 183-187
- (9) BETTINI V., ARAGNO R., BETTINI M.B et coll. Vasodilator and inhibitory effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on the contractile responses of coronary artery segments to acetylcholine : role of the prostacyclins and of the endothelium-derived relaxing factor,  
*FITOTERAPIA*, 1991, **LXII** : 15-28

- (10) BORRELLI F., IZZO A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies.  
*Phytother. Res.*, 2000, **14** : 581-591
- (11) BRUNETON J., *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, Editions TEC&DOC, Paris, 2009.
- (12) BURDULIS D., IVANAUSKAS L., DIRSE V., KAZLAUSKAS S., RAZUKAS A., Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits,  
*Medicina*, 2007, **43** : 971-976
- (13) CANTER PH., PHD, ERNST E., MD, PHD, FRCP Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (Bilberry) for night vision-A systematic review of placebo-controlled trials.  
*Survey of ophthalmology*, 2004, **49** : 38-50
- (14) CASSINESE C., COMBARIEU E., FALZONI M., FUZZATI N., PACE R., and SARDONE N. New liquid chromatography method with ultraviolet detection for analysis of anthocyanins and anthocyanidins in *Vaccinium myrtillus* fruit dry extracts and commercial preparations.  
*Journal of AOAC International*, 2007, **90** : 911-919
- (15) CHATTERJEE A., YASMIN T., BAGCHI D. and STOHS S.J. Inhibition of *Helicobacter pylori* *in vitro* by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004, **265** : 19-26
- (16) CHUNG H.K., CHOI S.L., AHN B.O., KWAK H.H., KIM J.H., KIM W.B. Efficacy of troxerutin on streptozotocin-induced rat model in the early stage of diabetic retinopathy.  
*Arzneim-Forsch./Drug Res.*, 2005, **55** : 573-580
- (17) CIGNARELLA A., NASTASI M., CAVALLI E. and PUGLISI L. Novel lipid-lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidemia : a comparison with ciprofibrate.  
*Thrombosis Research*, 1996, **84** : 311-322



- (18) COOKE D., SCHWARZ M., BOOCOCK D. et coll. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis-Relationship with tissue anthocyanin levels.  
*Int. J. Cancer*, 2006, **119** : 2213-2220
- (19) COOKE D.N., THOMASSET S., BOOCOCK D.J. et coll. Development of analyses by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/tandem Mass spectrometry of Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins in human plasma and urine.  
*J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54** : 7009-7013
- (20) DEBUIGNE G., COUPLAN F., *Petit Larousse des plantes qui guérissent*, Editions Larousse, Paris, 2006
- (21) DELATTRE J., BEAUDEUX J.L., BONNEFONT-ROUSSELON D. *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*, Editions TEC & DOC, Paris, 2005
- (22) DEVILLE J., *LES MYRTILLES...et les airelles*, Editions du Roure, Polignac, 2004.
- (23) DUTOT M., RAMBAUX L., WARNET J.-M, RAT. P., Modulation du stress oxydant par la myrtille riche en polyphénols sur un modèle de cellules humaines de rétine.  
*J Fr. Ophtalmol.*, 2008, **31** : 975-980
- (24) FURSOVA AZh, GESAREVICH O.G., GONCHAR A.M., TROFIMOVA N.A., KOLOSOVA NG. Dietary supplementation with bilberry extract prevents macular degeneration and cataracts in senesce-accelerated OXYS rats.  
*Adv-Gerontol.*, 2005, **16** : 76-79
- (25) GUIGNARD J.-L, DUPONT F. *Botanique, systématique moléculaire*, Editions Masson abrégés, Paris, 2004
- (26) HELMSTADTER A., Antidiabetic drugs used in Europe prio to the discovery of insulin.  
*Pharmazie*, 2007, **62** : 717-720

(27) ICHIYANAGI T., HATANO Y., MATSUO S, and KONISHI T. Simultaneous comparison of relative reactivities of twelve major anthocyanins in bilberry towards reactive nitrogen species.

*Chem. Pharm. Bull.*, 2004, **52** : 1312-1315

(28) ICHIYANAGI T., SHIDA Y., RHAMAN M., HATANO Y., KONISHI T., Bioavailability and tissue distribution of anthocyanins in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract in Rats.

*J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54** : 6578-6587

(29) JONADET M., MEUNIER M.T., BASTIDE J. et P., Anthocyanosides extraits de *Vitis vinifera*, de *Vaccinium myrtillus* S et de *Pinus maritimus*.

*J. Pharm., Belg.*, 1983, **38** : 41-46

(30) JUDD SW., CAMPBELL CS., KELLOGG E.A., STEVENS P. *Botanique systématique, une perspective phylogénétique*, De Boeck Université, Paris, 2002

(31) KATSUBE N., IWASHITA K., TSUSHIDA T., YAMAKI K., AND KOBORI M. Induction of apoptosis in cancer by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins.

*J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51** : 68-75

(32) KOLOSOVA N.G, SHCHGLOVA T.V, SERGEEVA S.V, LOSKUTOVA L.V. Long-term antioxidant supplementation attenuates oxidative stress markers and cognitive deficits in senescent-accelerated OXYS rats.

*Neurobiology of Aging*, 2006, **27** : 1289-1297

(33) KONG JM., CHIA LS., GOH NK., CHIA TF., BROUILLARD R. Analysis and biological activities of anthocyanins.

*Phytochemistry*, 2003, **64** : 923-933

(34) LAPLAUD P.M., LELUBRE A., CHAPMAN M.J., Antioxydant action of *Vaccinium myrtillus* extract on human low density lipoproteins in vitro : initial observations.

*Fundam Clin Pharmacol*, 1997, **11** : 35-40

- (35) LEE J., LEE H.K., KIM C.Y. et coll. Purified high-dose anthocyanoside oligomer administration improves nocturnal vision and clinical symptoms in myopia subjects, *British Journal of Nutrition*, 2005, **93** : 895-899
- (36) LIETTI A., CRISTONI A., AND PICCI. M. Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides  
*Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 1976, **26**, 829-835
- (37) MAGISTRETTI M.J, CONTI M., and CRISTONI A. Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*.  
*Arzneim-Forsch./Drug Res.*, 1988, **38** : 686-690
- (38) MARTIN-ARAGON S., BASABE B., BENEDI J.M., VILLAR A.M. Antioxidant action of *Vaccinium myrtillus* L.  
*Phytother. Res.*, 1998, **12** : 104-106
- (39) MATSUNAGA N., CHIKARAISHI Y., SHIMAZAWA M., YOKOTA S., AND HARA H. *Vaccinium myrtillus* (Bilberry) extracts reduce angiogenesis in vitro and in vivo.  
*Evid. Based Complementary Alternativ. Med.*, 2007, **7** : 47-56
- (40) MATSUNAGA N., TSURUMA K., SHIMAZAWA M., YOKOTA S. AND HARA H., Inhibitory actions of bilberry anthocyanidins on angiogenesis.  
*Phytother. Res.*, 2009, **24** : 42-47
- (41) MAURAY M., MILENKOVIC D., BESSON C. et coll Atheroprotective effects of Bilberry extracts in Apo-E deficient mice.  
*J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57** : 11106-11111
- (42) MILBURY P.E., GRAF B., CURRAN-CELENTANO J.M., AND BLUMBERG J.B., Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells.  
*IOVMS*, 2007, **48**, 2343-2349

- (43) MORAZZONI P., BOMBARDELLI E., *Vaccinium myrtillus* L.  
*FITOTERAPIA*, 1996, **LXVII** : 3-29
- (44) MORAZZONI P., MAGISTRETTE M.J. Activity of Myrtocyan®, an anthocyanoside complex from *Vaccinium myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness,  
*FITOTERAPIA*, 1990, **LXI** : 13-21
- (45) MORAZZONI P., MAGISTRETTI M.J. Effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on prostacyclin-like activity in rat arterial tissue.  
*FITOTERAPIA*, 1986, **LVII** : 11-14
- (46) MUTH E.R., PhD, LAURENT J.M., et coll. The effect of bilberry nutritional supplementation on night visual acuity and contrast sensitivity.  
*Alternative Medicine Review*, 2000, **5** : 164-173
- (47) PERSSON I. A.-L., PERSSON K., AND ANDERSOSON R.G.G. Effect of *Vaccinium myrtillus* and its olyphenols on angiotensin-converting enzyme activity in human endothelial cells.  
*J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 4626-4629
- (48) PETLEVSKI R., HADZIJA M., SLIJEPCEVIC M., JURETIC D Effect of antidiabetic herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice.  
*Journal of Ethnopharmacology*, 2001, **75** : 181-184
- (49) POLESE JM., *La culture des fruits rouges*, Editions Artémis, Losanges, 2005
- (50) PRIOR RL., CAO G., MARTIN A. et coll. Antioxydant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species.  
*J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46** : 2686-2693
- (51) PUUPPONEN R., NOHYNEK L., SCHMIDLIN-HARTMANN S. et coll.  
Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens.  
*Journal of Applied Microbiology*, 2005, **98** : 991-1000

(52) RAHMAN MM., ICHIYANAGI T., KOMIYAMA T., SATO S., and KONISHI T. Effects of anthocyanins on psychological stress-induced oxidative stress and neurotransmitter status.

*J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56** : 7545-7550

(53) RIIHINEN K., JAAKOLA L., KARENLAMPI S., HOHTOLA A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and northblue blueberry (*Vaccinium corymbosum* × *V. angustifolium*).

*Food Chemistry*, 2008, **110** : 156-160

(54) SAKAKIBARA H., OGAWA T., KOYABAGI A. et coll. Distribution and excretion of bilberry anthocyanins in mice.

*J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57** : 7681-7686

(55) SONG J., LI Y., GE J. et coll. Protective effect of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extracts on cultured human corneal limbal epithelial cells (HCLEC).

*Phytother Res.*, 2010, **24** : 520-524

(56) SPARROW J.R., VOLLMER-SNARR H.R., ZHOU J. et coll. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells.

*The journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 18207-18213

(57) SVOBODOVA A., ZDARILOVA A., VOSTALOVA J. *Lonicera caerulea* and *Vaccinium myrtillus* fruit polyphenols protect HaCaT keratinocytes against UVB-induced phototoxic stress and DNA damage.

*Journal of Dermatological Science*, XXX (2009) XXX-XXX

(58) SZAJDEK A., BOROWSKA E.J Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits : A review,.

*Plant. Foods Hum. Nutr.*, 2008, **63**, 147-156

(59) TALAVERA S., FELGINES C., TEXIER O. et coll. Bioavailability of a bilberry anthocyanin extract and its impact on plasma antioxydant capacity in rats.

*J Sci Food Agric*, 2006, **86** : 90-97

- (60) TELLER N., THIELE W., MARCZYLO T.H., Suppression of the kinase activity of receptor tyrosine kinases by anthocyanin-rich mixtures extracted from bilberries and grapes.  
*J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57** : 3094-3101
- (61) TILLARD S. *Myrtilles, groseilles et fruits des bois*, CTIFL, Paris, 1998
- (62) VALENTOVA K., ULRICHOVA J., CVAK L., SIMANEK Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes.  
*Food Chemistry*, 2007, **101** : 912-917
- (63) VILJANEN K., KYLLI P., KIVIKARI R., AND HEINONEN M. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics.  
*J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52** : 7419-7424
- (64) WANG H., CAO G., PRIOR R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins.  
*J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45** : 304-309
- (65) WANG L., STONER G.D. Anthocyanins and their role in cancer prevention.  
*Cancer Letters*, 2008, **269** : 281-290
- (66) WEST A.L., MD, OREN G.A. et coll. Evidence for the use of nutritional supplements and herbal medicines in common eye diseases.  
*Am. J. Ophthalmol.*, 2006, **141** : 157-66
- (67) WICHTL M., ANTON R. *Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*, Editions TEC & DOC, Paris, 2003
- (68) YAO Y., VIEIRA A. Protective activities of *Vaccinium* antioxidants with potential relevance to mitochondrial dysfunction and neurotoxicity.  
*NeuroToxicology*, 2007, **28** : 93-100

(69) ZHAO C., GIUSTI M.M., MINNIE M., MOYER M.P. AND MAGNUSON B. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth.

*J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52** : 6122-6128

### **SITE INTERNET**

(70) [http://online6.edgm.eu/ep607\\_](http://online6.edgm.eu/ep607_)(consulté en avril 2010)

(71) <http://www.afssa.fr/TableCIQUAL/> (consulté en avril 2010)

(72) <http://www.biopix.eu/> (consulté en avril 2010)

(73) <http://www.esculape.com/cancerogeneral/angiogenese.html> (consulté en avril 2010)

(74) [http://www.faune-flore.be/fleurs\\_belgique/identification\\_fleur\\_arbuste\\_fruitier.htm](http://www.faune-flore.be/fleurs_belgique/identification_fleur_arbuste_fruitier.htm)

(75) <http://www.kuleuven-kortrijk.be/bioweb/?lang=fr&page=guide> (consulté en avril 2010)

(76) <http://www.labo-nutrinov.com/fr/maj-e/g1a2k3777h1/etudes-de-recherches/lipides/la-mesure-du-pouvoir-antioxydant-par-la-methode-orac.htm>(consulté en avril 2010)

(77) <http://www.libertasoccidentalis.net/libertasoccidentalis09/?p=529> (consulté en avril 2010)

(78) <http://www.netimago.com/images/N39fPxAKSFuGJgl.jpg>(consulté en avril 2010)

(79) <http://www.npsnj.org/> (consulté en avril 2010)

(80) <http://www.retina.ch/journal/2004/rsj2004-01-f-2.htm> (consulté en avril 2010)

(81) <http://www.tela-botanica.org> (consulté en avril 2010)

(82) [http://www.univadis.fr/medical\\_and\\_more](http://www.univadis.fr/medical_and_more) (consulté en avril 2010)

(83) [www.unjardinblanc.xooit.fr](http://www.unjardinblanc.xooit.fr) (consulté en avril 2010)

(84) <http://webiologie.free.fr/> (consulté en avril 2010)

## **LISTE DES ANNEXES**

**ANNEXE I** : Table de composition nutritionnelle Ciqual 2008 de l’Affsa.

**ANNEXE II** : Monographie du fruit frais de *Vaccinium myrtillus* L. (Pharmacopée européenne 6<sup>ème</sup> édition).

**ANNEXE III** : Monographie du fruit mûr séché de *Vaccinium myrtillus* L. (Pharmacopée européenne 6<sup>ème</sup> édition).

**ANNEXE IV** : « *Vaccinium myrtillus* pour préparations homéopathiques » (Pharmacopée française X<sup>ème</sup> édition).



# **ANNEXE I**

## **TABLE DE COMPOSITION NUTRITIONNELLE CIQUAL 2008 DE L'AFSSA.**

## Myrtille fraîche (teneurs pour 100 grammes d'aliment comestible)

Nom des constituants	Unité	Teneur moyenne	Min.	Max.	Nb échantillons	Source des données	Code confiance
Energie	kJ	213	-	-	-		C
Energie	kcal	50	-	-	-		C
Energie, étiquetage	kJ	213	-	-	-		C
Energie, étiquetage	kcal	50	-	-	-		C
Eau	g	83,8	83,4	84,21	2	760 743	C
Protéines	g	0,74	-	-	-		C
Protéines brutes (N x 6.25)	g	0,74	-	-	1	743	C
Glucides	g	10	-	-	-		C
Sucres	g	9,96	-	-	1	743	C
Amidon	g	0,03	-	-	1	743	C
Polyols totaux	g	0	-	-	-		D
Fibres alimentaires	g	2,4	-	-	1	743	C
Lipides	g	0,33	-	-	1	743	C
AG saturés	g	0,028	-	-	1	743	C
AG monoinsaturés	g	0,047	-	-	1	743	C
AG polyinsaturés	g	0,146	-	-	1	743	C
Cholestérol	mg	0	-	-	1	690	C
Alcool (éthanol)	g	0	-	-	1	690	C
Acides organiques	g	1,37	-	-	-	723	C
Sodium	mg	1	-	-	1	743	C
Magnésium	mg	6	-	-	1	743	C
Phosphore	mg	12	-	-	1	743	C
Potassium	mg	77	-	-	1	743	C
Calcium	mg	6	-	-	1	743	C
Manganèse	mg	0,336	-	-	1	743	C
Fer total	mg	0,28	-	-	1	743	C
Cuivre	mg	0,057	-	-	1	743	C
Zinc	mg	0,16	-	-	1	743	C
Sélénium	µg	0,1	-	-	1	743	C
Iode	µg	0,5	-	-	1	573	D
Rétinol	µg	0	-	-	1	743	C
Bêta-carotène	µg	32	-	-	1	743	C
Vitamine D	µg	0	-	-	1	445	C
Activité vitaminique E (en équivalents alpha-tocophérol)	mg	1	-	-	1	497	C
Vitamine C	mg	9,7	-	-	1	743	C
Vitamine B1 ou Thiamine	mg	0,037	-	-	1	743	C
Vitamine B2 ou Riboflavine	mg	0,041	-	-	1	743	C
Vitamine B3 ou PP ou Niacine	mg	0,418	-	-	1	743	C
Vitamine B5 ou Acide pantothénique	mg	0,124	-	-	1	743	C
Vitamine B6 ou Pyridoxine	mg	0,052	-	-	1	743	C
Vitamine B9 ou Folate totaux	µg	6	-	-	1	743	C
Vitamine B12 ou Cobalamines	µg	0	-	-	1	743	C

**Légende du code confiance :**

**Echelle de fiabilité de A à D ; A correspondant aux données les plus fiables.**

## **ANNEXE II**

# **MONOGRAPHIE DU FRUIT FRAIS DE *VACCINIUM MYRTILLUS* L. (Pharmacopée Européenne 6<sup>ème</sup> édition)**

## Myrtille (fruit frais de)

### *Myrtilli fructus recens*

#### DÉFINITION

Fruit mûr, frais ou congelé, de *Vaccinium myrtillus* L.

*Teneur* : au minimum 0,30 pour cent d'anthocyanosides, exprimés en chlorure de cyanidine 3-O-glucoside (chrysanthémine, C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClO<sub>11</sub> ; M<sub>r</sub> ►484,8 ◀) (drogue desséchée).

#### CARACTÈRES

Saveur sucrée, un peu astringente.

#### IDENTIFICATION

A. Le fruit frais de myrtille est une baie bleu-noir, globuleuse, d'environ 5 mm de diamètre. Il comporte à la base une cicatrice ou, rarement, un fragment de pédoncule. Le sommet, aplati, est surmonté par les restes du style persistant et du calice, qui forme un repli circulaire. Dans le mésocarpe violacé et juteux, 4 à 5 loges renferment de nombreuses petites graines ovoïdes brunes.

B. Le fruit frais de myrtille broyé est rouge violacé. Examinez-le au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. Il présente des cellules scléreuses, rose violacé, à paroi épaisse canaliculée, généralement en amas, provenant de l'endocarpe et du mésocarpe ; des fragments d'épicarpe brun-rouge, formés de cellules polygonales à paroi légèrement épaissie ; des fragments jaune-brun du tégument externe de la graine, composés de cellules allongées, à paroi présentant des épaississements en forme de fer à cheval ; des macles de cristaux d'oxalate de calcium.

C. Chromatographie sur couche mince (*2.2.27*).

*Solution à examiner*. A 5 g de drogue, récemment broyée, ajoutez 20 ml de *méthanol R*. Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *chrysanthémine R* dans 10 ml de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R*, *eau R*, *butanol R* (16:19:65 V/V/V).

*Dépôt* : 10 µl, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-dessous la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

Haut de la plaque	
	Une bande rouge violacé
Chrysanthémine : une bande rouge violacé	Une bande principale rouge violacé
	Un ensemble compact d'autres bandes principales :
	— une bande rouge violacé
	— plusieurs bandes bleu violacé
Solution témoin	Solution à examiner

## ESSAI

Cendres totales ([2.4.16](#)) : maximum 0,6 pour cent.

Perte à la dessiccation ([2.2.32](#)) : 80,0 pour cent à 90,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 5,000 g de drogue récemment broyée.

## DOSAGE

Broyez extemporanément 50 g de drogue. A environ 5,00 g de drogue broyée, exactement pesés, ajoutez 95 ml de *méthanol R*. Agitez mécaniquement pendant 30 min. Filtrez dans une fiole jaugée de 100,0 ml, lavez le filtre et complétez au volume avec du *méthanol R*. Diluez cette solution au 1/50 dans une solution d'*acide chlorhydrique R* à 0,1 pour cent V/V dans le *méthanol R*.

Mesurez l'absorbance ([2.2.25](#)) de la solution obtenue à 528 nm, en prenant une solution d'*acide chlorhydrique R* à 0,1 pour cent V/V dans le *méthanol R*, comme liquide de compensation.

Calculez la teneur pour cent en anthocyanosides, exprimés en chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside, à l'aide de l'expression suivante :

718 = absorbance spécifique du chlorure de cyanidine 3-*O*-glucoside à 528 nm,  
A = absorbance à 528 nm,  
M = Masse de la prise d'essai, en grammes.

## CONSERVATION

Lorsque le fruit frais de myrtille est congelé, conservez-le à une température inférieure ou égale à - 18°C.

## **ANNEXE III**

# **MONOGRAPHIE DU FRUIT MÛR SECHE DE *VACCINIUM MYRTILLUS* L. (Pharmacopée européenne 6<sup>ème</sup> édition)**

## Fruit mûr séché de *Vaccinium myrtillus* L.

*Teneur* : au minimum 1,0 pour cent de tanins, exprimés en pyrogallol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> ; M<sub>r</sub> 126,1) (drogue desséchée).

### CARACTÈRES

Saveur douce, un peu astringente.

### IDENTIFICATION

A. Le fruit sec de myrtille est une baie bleu-noir ratatinée, subglobuleuse, de 5 mm environ de diamètre avec une cicatrice à la base. Le sommet est surmonté par les restes du style et le calice persistant, qui forme un repli circulaire. Le mésocarpe violet intense et charnu renferme de nombreuses petites graines ovoïdes, brunes.

B. Réduisez le fruit sec de myrtille en poudre (355) (2.9.12). La poudre est brun-violet. Examinez au microscope en utilisant de la *solution d'hydrate de chloral R*. La poudre présente des cellules scléreuses, rose-violet, à paroi épaisse canaliculée, généralement en amas et provenant de l'endocarpe et du mésocarpe ; des fragments d'épicarpe colorés en brun-rouge, formés de cellules polygonales à paroi légèrement épaissie ; des fragments jaune-brun du tégument externe de la graine, composés de cellules allongées, à paroi présentant des épaississements en forme de fer à cheval ; des macles et des prismes de cristaux d'oxalate de calcium de différente taille.

C. Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

*Solution à examiner*. A 2 g de fruit sec de myrtille pulvérisé (355) (2.9.12), ajoutez 20 ml de *méthanol R*. Agitez pendant 15 min et filtrez.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *chrysanthémine R* dans 10 ml de *méthanol R*.

*Plaque* : *plaque au gel de silice pour CCM R*.

*Phase mobile* : *acide formique anhydre R, eau R, butanol R* (16:19:65 V/V/V).

*Dépôt* : 10 µl, en bandes.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-dessous la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner.

Haut de la plaque	
	Une bande rouge-violet de faible intensité.
Chrysanthémine : une bande rouge- violet	Une bande principale rouge-violet.
	Un ensemble compact d'autres bandes principales :
	— une bande rouge-violet
	— plusieurs bandes bleu-violet
Solution témoin	Solution à examiner

## ESSAI

Perte à la dessiccation ([2.2.32](#)) : au maximum 12,0 pour cent, déterminé à l'étuve à ► 105 °C ◀ pendant 2 h sur 1,000 g de fruit sec de myrtille pulvérisé.

Cendres totales ([2.4.16](#)) : au maximum 5,0 pour cent.

## DOSAGE

Effectuez la détermination des tanins dans les drogues végétales ([2.8.14](#)). Utilisez 1,500 g de fruit sec de myrtille pulvérisé (355) ([2.9.12](#)).



**ANNEXE IV**

**« *VACCINIUM MYRTILLUS*  
POUR  
PREPARATIONS  
HOMEOPATHIQUES »  
(Pharmacopée française X<sup>ème</sup> édition)**

**MYRTILLE**  
**POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES**  
**VACCINIUM MYRTILLUS**  
**POUR PRÉPARATIONS HOMÉOPATHIQUES**

**Vaccinium myrtillus ad praeparationes homoeopathicas**

La drogue végétale satisfait aux exigences de la monographie *Myrtille (fruit frais de)* (1602).

**SOUCHE**

**DÉFINITION**

Teinture mère de myrtille préparée au 1/20 à la teneur en éthanol de 55 pour cent *V/V*, à partir du fruit frais de *Vaccinium myrtillus* L., selon la technique générale de préparation des teintures mères (voir la monographie *Préparations homéopathiques* (1038) et la Précision complémentaire de l'Autorité française de Pharmacopée).

*Teneur* : au minimum 0,01 pour cent *m/m* d'anthocyanosides, exprimés en chlorure de 3-glucoside-cyanidol (chrysanthémine, C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClO<sub>11</sub> ; *M<sub>r</sub>* 485,5).

**CARACTÈRES**

Liquide rouge-violet.

**IDENTIFICATION**

Chromatographie sur couche mince (2.2.27).

*Solution à examiner*. Teinture mère.

*Solution témoin*. Dissolvez 5 mg de *chrysanthémine R* et 5 mg de *chlorure de delphinidine R* dans 10 ml de *méthanol R*.

*Plaque* : plaque au gel de silice pour CCM R.

*Phase mobile* : acide formique anhydre R, eau R, butanol R (16:19:65 *V/V/V*).

*Dépôt* : 10 µl, en bandes.

---

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

2007.

*Développement* : sur un parcours de 10 cm.

*Séchage* : à l'air.

*Détection* : examinez à la lumière du jour.

*Résultats* : voir ci-dessous la séquence des bandes présentes dans les chromatogrammes obtenus avec la solution témoin et la solution à examiner. Par ailleurs, d'autres bandes de faible intensité peuvent être présentes dans le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner.

<b>Haut de la plaque</b>	
Chlorure de delphinidine : une bande bleue ----- Chrysanthémine : une bande rouge-violet -----	Une bande principale rouge-violet Un ensemble compact d'autres bandes principales : – une bande rouge-violet – plusieurs bandes bleu-violet -----
<b>Solution témoin</b>	<b>Solution à examiner</b>

## ESSAI

**Teneur en éthanol (2.9.10)** : 50 pour cent *V/V* à 60 pour cent *V/V*.

**Méthanol et 2-propanol (2.9.11)** : au maximum 0,05 pour cent *V/V* ; au maximum 0,05 pour cent *V/V*.

**Résidu sec (2.8.16)** : au minimum 1,8 pour cent *m/m*.

## DOSAGE

Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (2.2.25).

*Solution à examiner.* Dans une fiole jaugée de 100,0 ml, introduisez 1,000 g de teinture mère, ajoutez une solution d'*acide chlorhydrique R* à 0,1 pour cent *V/V* dans le *méthanol R* et complétez avec le même solvant.

*Liquide de compensation.* Solution d'*acide chlorhydrique R* à 0,1 pour cent *V/V* dans le *méthanol R*.

Mesurez l'absorbance de la solution à 528 nm par comparaison avec le liquide de compensation.

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

Calculez la teneur pour cent  $m/m$  en anthocyanosides, exprimés en chlorure de 3-glucoside-cyanidol, à l'aide de l'expression :

$$\frac{A \times 100}{718 \times m}$$

en prenant 718 comme valeur de l'absorbance spécifique du chlorure de 3-glucoside-cyanidol à 528 nm.

$A$  = absorbance à 528 nm,

$m$  = masse de la prise d'essai de teinture mère, en grammes.

---

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

**2007.**



# Serment des Apothicaire



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



## ***Vaccinium myrtillus* L. : une plante médicinale à anthocyanosides**

### **RÉSUMÉ :**

*Vaccinium myrtillus* Linné ou myrtille sauvage est un sous-arbrisseau de la famille des Ericacées. On la retrouve dans le nord et le centre de l'Europe, en Asie et en Amérique Boréale. En France, la myrtille est commune dans la plupart des montagnes entre 400 et 2.500 mètres d'altitude. Elle est différente de la myrtille cultivée ou *Vaccinium corymbosum* L. Son fruit est une baie bleu-noir globuleuse à saveur sucrée et acidulée. *V. myrtillus* L. renferme de nombreux composés phénoliques dont les anthocyanosides ; ceux-ci sont principalement retrouvés dans la peau et la pulpe du fruit de la myrtille ; ils sont à l'origine de la plupart de ses propriétés thérapeutiques, même si d'autres composés participeraient à l'action bénéfique de la myrtille.

*V. myrtillus* L. est une plante médicinale inscrite sur la liste A de la Pharmacopée française X<sup>ème</sup> édition. Le fruit (frais et sec) de la myrtille fait l'objet d'une monographie dans la Pharmacopée européenne 6<sup>ème</sup> édition. Les propriétés thérapeutiques des feuilles et des fruits de *V. myrtillus* L. ont été utilisées dans la médecine populaire : les fleurs, pour leurs propriétés toniques, astringentes, antiseptiques, dans le traitement de la diarrhée, de la dysenterie ; quant à la feuille, elle était surtout utilisée pour ses propriétés hypoglycémiantes. Certaines indications sont validées et figurent dans la Note explicative de l'Agence du médicament de 1998 et la Commission E allemande. Si la baie est atoxique, la feuille présenterait un risque d'intoxication lié à des fortes doses ou à une utilisation chronique.

La myrtille a fait l'objet de nombreuses études *in vitro*, *in vivo*, et quelques études cliniques, ayant montré une faible biodisponibilité (surtout chez l'homme) ; mais des effets bénéfiques dans le domaine vasculaire, dans certaines pathologies où le stress oxydant est impliqué (cancer, maladies neurodégénératives, DMLA...) ; cette activité reste à être prouvée chez l'homme. Quant aux études cliniques concernant l'action de la myrtille sur la vision (surtout nocturne), elles restent controversées ; mais des études *in vitro* récentes ont montré ses effets bénéfiques sur la régénération des cellules cornéennes. Enfin, outre son emploi en cuisine, la myrtille est utilisée dans l'industrie pour ses anthocyanes aux propriétés tinctoriales et dans le domaine pharmaceutique où l'on retrouve des médicaments et des compléments alimentaires à base de myrtille pour diverses indications (traitement de la fragilité capillaire, de l'insuffisance veineuse, et dans les troubles de la vision mésopique et scotopique).

**MOTS-CLEFS :** *Vaccinium myrtillus* - Myrtille - anthocyanosides - phytothérapie - stress oxydant.

### **THESE SOUTENUE LE 19 MAI 2010**

Par : Olivia Maillefert  
86, rue des Ecoles  
73230 St Alban Laysse

### **COMPOSITION DU JURY**

Président du jury :

Mr KRIVOBOK Serge, Docteur en Pharmacie et Maître de Conférences en Botanique

Membres du jury :

Mr CORJON Gilles, Docteur en Pharmacie

Mr CHOVELON Michel, Docteur en Pharmacie