

Popular Democratic Republic of Algeria  
Ministry of High Education and Scientific Research  
Abbes Laghrou University- Khenchela-  
Natural and life sciences Faculty  
Molecular and Cellular Biology Department



N° de série : .....

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES DE MASTER ACADEMIQUE

Domaine : **Sciences de la nature et de la vie**

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Biochimie Appliquée**

*Présenté par :*

***GASMI Dounia***

***AHNECHE Loubna***

**Thème**

Étude des propriétés bioactives des extraits  
de *Ziziphus lotus* L. : caractérisation  
phytochimique et potentiel thérapeutique

*Mémoire soutenu publiquement le 18/06/ 2025. Devant le jury composé de :*

**M DJEMIL Randa**

M.C.A, Université Abbes Laghrou – Khenchela, Président

**M DOUAOUYA Lilia**

M.C.A, Université Abbes Laghrou – Khenchela, Encadreur

**M SAIDI Malika**

M.C.B, Université Abbes Laghrou – Khenchela, Examinateur

Année Universitaire

2024/2025

# Remerciements

*« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».*

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée le pouvoir, la force et la patience...*

*J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à mon encadreur Dr. DOUAOUIA. Merci d'avoir accepté de diriger ce travail, Merci pour votre encadrement sans faille tout au long de la période de réalisation de ce travail. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir d'avoir pu faire votre connaissance avant tout...*

*Je remercie Dr. Djemil Randa d'avoir accepté de juger mon travail en tant que président.*

*Je remercie Dr. Saidi Malika, maître de conférences, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Je remercie tout particulièrement ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix, et qui été présente chaque fois que cela a été nécessaire. Merci Maman, Merci Papa, Merci ma Sœur, C'est avec vous que j'ai partagé mes joies, mes peines, vous m'avez soutenu grâce à votre présence, à votre sourire.*

*Merci <3*

# *Dédicace*

*Je prie Dieu tout puissant de m'accorder patience et courage pour finir  
ce mémoire*

*Je tiens à dédier ce modeste travail à ceux qui m'ont toujours venu en  
aide et sacrifié leur réussite dans ma vie*

*\*\*\* A ceux qui ont sacrifié leur vie pour que je sois, ce que je suis  
aujourd'hui, qui sont les plus chères au monde :*

*\*\*\* mes parents*

*\*\*\* A ma sœur Nour*

*\*\*\* Mes cousins*

*\*\*\* A Mes meilleures amies : Hadil, Maysoune, Aya.*

*\*\*\* A toutes mes amies, lesquelles ont partagée des bons moments de  
bonheur et moment les plus difficiles pendant toute la période passée  
aux études.*

*\*\*\* A toute ma famille*

*\*\*\* A tous mes enseignants(es) et plus spécialement Mme. douaouia,  
mon maître de mémoire qui n'a pas ménagé d'efforts pour  
l'aboutissement de ce travail.*

*Dounia*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*\*\*\* A mon très cher père, Merci pour tout ce que vous avez fais pour  
moi papa,*

*\*\*\* A ma très chère maman, Que Dieu le tout puissant vous protège,*

*\*\*\* A mes sœurs :*

*\*\*\* kenza, Ibtissem, Roumaissa, Hiba*

*\*\*\* A mes frères : Riadh, Anis, Nabil*

*\*\*\* A mes nièce : illine, Layane, Cilline*

*\*\*\* A mon neveu : Aksel*

*\*\*\* A mes amies : Bouchra, Amel, Rokia, Aicha, Souhila. Akila.*

*Loubna*

# Étude des propriétés bioactives des extraits de *Ziziphus lotus* L. : caractérisation phytochimique et potentiel thérapeutique

## Résumé

Cette étude explore le potentiel phytochimique et pharmacologique des extraits de feuilles de *Ziziphus lotus* L., une plante médicinale traditionnelle, obtenus par macération hydrométhanolique et fractionnement liquide-liquide. Les analyses ont révélé que les extraits polaires (méthanolique : 37,09 %; butanolique : 17,92 %) présentaient les rendements les plus élevés, reflétant une richesse en composés polaires comme les flavonoïdes et les tanins. Les tests qualitatifs ont confirmé la présence abondante de ces composés ainsi que des saponines, alors que les alcaloïdes et terpénoïdes n'étaient présents qu'à l'état de traces. Quantitativement, les extraits butanolique et méthanolique ont montré les concentrations les plus élevées en polyphénols (245,58 µg EAG/mg) et en flavonoïdes (31,71 µg EQ/mg). Sur le plan biologique, ces extraits ont démontré une activité antioxydante marquée (inhibition du DPPH : 75,11-88,88 %), des propriétés anti-inflammatoires significatives (réduction de 86 % de l'hémolyse hypotonique et inhibition de 80,23 % de la dénaturation thermique des protéines). Ils ont également montré une activité antibactérienne notable contre *Staphylococcus aureus* (15 mm) et *Klebsiella pneumoniae* (12 mm). Ces résultats soulignent le potentiel thérapeutique de *Z. lotus*, attribuable à sa richesse en composés phénoliques, et confirment l'efficacité des solvants polaires et de polarité intermédiaire pour l'extraction optimale des métabolites bioactifs.

**Mots-clés** : Activité antioxydante, Anti-inflammatoire, Antibactérienne, Flavonoïdes, Polyphénols, *Ziziphus lotus*

# Study of the Bioactive Properties of *Ziziphus lotus* L. Extracts: Phytochemical Characterization and Therapeutic Potential

## Abstract

This study explores the phytochemical and pharmacological potential of leaf extracts from *Ziziphus lotus* L., a traditional medicinal plant, obtained through hydro-methanolic maceration and liquid-liquid fractionation. The analyses revealed that polar extracts (methanolic: 37.09%; butanolic: 17.92%) yielded the highest extraction rates, reflecting a richness in polar compounds such as flavonoids and tannins. Qualitative tests confirmed the abundant presence of these compounds, along with saponins, while alkaloids and terpenoids were only detected in trace amounts. Quantitatively, the butanolic and methanolic extracts exhibited the highest concentrations of polyphenols (245.58  $\mu\text{g}$  GAE/mg) and flavonoids (31.71  $\mu\text{g}$  QE/mg). Biologically, these extracts demonstrated strong antioxidant activity (DPPH inhibition: 75.11–88.88%), significant anti-inflammatory properties (86% reduction in hypotonic hemolysis and 80.23% inhibition of protein denaturation), and notable antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (15 mm) and *Klebsiella pneumoniae* (12 mm). These findings highlight the therapeutic potential of *Z. lotus*, attributed to its richness in phenolic compounds, and confirm the effectiveness of polar and intermediate polarity solvents for optimal extraction of bioactive metabolites.

**Keywords:** Antibacterial, Anti-inflammatory, Antioxidant activity, Flavonoids, Polyphenols, *Ziziphus lotus*.

## دراسة الخصائص الحيوية النشطة لمستخلصات السدر (*Ziziphus lotus* L): التوصيف الكيميائي النباتي وإمكاناته العلاجية

### الملخص

تستكشف هذه الدراسة الإمكانيات الفيتوكيميائية والدوائية لمستخلصات أوراق نبات *Ziziphus lotus* L، وهو نبات طبي تقليدي، تم الحصول عليها عن طريق النقع في مزيج مائي-ميثانولي والتجزئة السائلة-السائلة. كشفت التحاليل أن المستخلصات القطبية (الميثانولية: % 09.37؛ البيوتانولية: % 92.17) سجلت أعلى نسب المردود، مما يعكس غناها بالمركبات القطبية مثل الفلافونويدات والعفص. أكدت الاختبارات النوعية وجوداً وفيراً لهذه المركبات، بالإضافة إلى الصابونينات، في حين لم تُكتشف القلويدات والتربينويدات إلا بكميات ضئيلة. كما أظهرت التحاليل الكمية أن المستخلصين البيوتانولي والميثانولي احتويا على أعلى تراكيز من البوليفينولا ( 58.245 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك/ملغ) والفلافونويدات ( 71.31 ميكروغرام مكافئ كيرسيتين/ملغ). من الناحية البيولوجية، أظهرت هذه المستخلصات نشاطاً مضاداً للأكسدة قوياً (تثبيط DPPH بنسبة 11.75–88.88%)، وخصائص مضادة للالتهاب ملحوظة (انخفاض بنسبة 86% في انحلال الدم تحت تأثير نقص التوتر، وتثبيط بنسبة 23.80% لتخثر البروتينات)، بالإضافة إلى نشاط مضاد للبكتيريا ضد (*Staphylococcus aureus*) 15 مم و (*Klebsiella pneumoniae*) 12 مم). تؤكد هذه النتائج على الإمكانيات العلاجية لنبات *Z. lotus*، والتي تعزى إلى غناه بالمركبات الفينولية، كما تؤكد فعالية المذيبات القطبية وذات القطبية المتوسطة في الاستخلاص الأمثل للمواد الفعالة بيولوجياً.

**الكلمات المفتاحية:** *Ziziphus lotus*، البوليفينولات، الفلافونويدات، النشاط المضاد للأكسدة، مضاد للبكتيريا، مضاد للالتهاب

# Table des matières

Remerciements

Résumé

Abstract

Liste des figures

Liste des tableaux

Listes des Abréviations

Introduction Général 1

I Matériel et méthodes 4

I.1 Matériel . . . . . 4

I.1.1 Matériel biologique . . . . . 4

I.1.1.1 Matériel végétal . . . . . 4

I.1.1.2 Souches bactériennes . . . . . 5

I.1.1.3 Echantillons sanguins . . . . . 6

I.1.2 Médicaments . . . . . 6

I.1.3 Réactifs et appareillages utilisés . . . . . 6

I.2 Méthodes . . . . . 7

I.2.1 Etude phytochimique . . . . . 7

I.2.1.1 Préparation de l'extrait brut méthanolique (*EB MeOH*) . . . . . 7

I.2.1.2 Fractionnement de l'*EB MeOH* . . . . . 7

I.2.1.3 Détermination du rendement d'extraction . . . . . 9

I.2.1.4 Screening phytochimique . . . . . 9

I.2.1.5	Chromatographie sur couche mince des extraits poly phénoliques issus du Sidr . . . . .	10
I.2.1.6	Analyses quantitatives des extraits de <i>Ziziphus lotus</i> L . . . . .	11
I.2.2	L'étude -in vitro- des activités biologique . . . . .	12
I.2.2.1	Evaluation de l'activité antioxydante : (Test scavenger du radical libre DPPH) . . . . .	12
I.2.2.2	Évaluation de l'activité anti-inflammatoire . . . . .	13
I.2.2.3	Evaluation de l'activité antibactérienne . . . . .	16
<b>II</b>	<b>Résultats et discussion</b>	<b>21</b>
II.1	Rendements d'extraction . . . . .	21
II.2	2. Investigation phytochimique des extraits de <i>Ziziphus lotus</i> L . . . . .	23
II.2.1	Tests phytochimiques . . . . .	23
II.2.2	Etude qualitative de la chromatographie sur couche mince . . . . .	25
II.2.3	Analyses quantitatives . . . . .	28
II.2.3.1	Dosage des polyphénols totaux . . . . .	28
II.2.3.2	Dosage des flavonoïdes . . . . .	29
II.3	Étude in vitro des activités biologiques de <i>Ziziphus lotus</i> L. . . . .	30
II.3.1	Evaluation de l'activité anti-oxydante (Test scavenger du radical libre DPPH) . . . . .	30
II.3.2	Evaluation de l'activité anti inflammatoire . . . . .	32
II.3.2.1	Evaluation de l'activité anti hémolytique . . . . .	32
II.3.2.2	Test de la dénaturation du Sérum Albumin Bovin . . . . .	33
II.3.3	Evaluation de l'activité anti bactérienne . . . . .	34
	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>38</b>
	<b>Références bibliographiques</b>	<b>40</b>
	<b>Annexes</b>	

---

# Liste des figures

I.1	Photos des feuilles du <i>Ziziphus lotus</i> L. fraîches et sèches. . . . .	5
I.2	Protocole expérimental résumant l'extraction et les étapes du fractionnement . . . . .	8
I.3	Réduction du DPPH par un antioxydant . . . . .	12
I.4	Repiquage des espèces bactériennes . . . . .	17
I.5	Préparation de l'inoculum . . . . .	17
I.6	Ensemencement des souches bactériennes sur milieu gélosé (MH). . . . .	18
I.7	Préparation des disques d'aromatogrammes en présence des extraits. . . . .	19
I.8	Préparation des disques d'aromatogrammes en présence des extraits. . . . .	20
II.1	Photographie des chromatogrammes révélés sous lumière UV à 254 nm (a) et à 365 nm (b), en utilisant le système solvant BAW (4 :1 :5). . . . .	27
II.2	Histogramme représente la teneur des extraits en polyphénols . . . . .	28
II.3	Teneurs en flavonoïdes dans les différents extraits . . . . .	29
II.4	Courbe présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des extraits . . . . .	31
II.5	Évolution de l'effet anti hémolytique des extraits de <i>Ziziphus lotus</i> L. en fonction de leurs concentrations, comparée à celle du contrôle positif. . . . .	32
II.6	Effet des extraits, et de diclofénac sur la dénaturation de SAB . . . . .	33
II.7	Photo d'antibiogramme des extraits sur <i>S. aureus</i> (a), <i>K. pneumoniae</i> (b), <i>B. subtilis</i> . (c) . . . . .	35

# Liste des tableaux

I.1	Les coordonnées géographiques du site de récolte . . . . .	5
I.2	Souches bactériennes de référence utilisées pour le test de sensibilité . . . . .	6
I.3	Différents systèmes de solvants essayés . . . . .	11
II.1	Rendement de l'extraction . . . . .	22
II.2	Analyse phytochimique préliminaire des extraits de <i>Z. lotus</i> . . . . .	24
II.3	CCM des extraits Système solvant : BAW (40 : 10 :50) . . . . .	26
II.4	Résultats de diamètres des zones d'inhibition de croissance bactérienne . . . . .	35

# Listes des Abréviations

- Abs** : Absorbance
- Ac asc** : Acide ascorbique
- AlCl<sub>3</sub>** : Chlorure d'aluminium
- ATCC** : American Type Culture Collection
- C** : Concentration
- CCM** : Chromatographie sur couche mince
- DPPH** : Diphényl Picrylhydrazyl (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>)
- EB MeOH** : Extrait méthanolique brut
- EDTA** : Acide éthylène diamine tétra acétique
- FeCl<sub>3</sub>** : Trichlorure de fer
- Fr Ac Et** : Fractionnement d'acétate d'éthyle
- Fr But** : Fractionnement butanolique
- Fr Hex** : Fractionnement d'hexane
- GRH** : Globules rouges humains
- HCl** : Acide chlorhydrique
- HgCl<sub>2</sub>** : Chlorure mercurique
- HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique concentré
- I<sub>2</sub>** : Diode
- IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%
- KI** : Iodure de potassium
- Mg EQ/g E** : Equivalent milligramme de quercétine par g d'extrait
- mg EAG/mg** : Microgrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait
- mM** : Millimolaire
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium
- NCIMB** : National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria
- NCTC** : National Collection of Type Cultures

*List of Abbreviations*

**NH<sub>4</sub>OH** : Hydroxyde d'ammonium

**nm** : Nanomètre

**OH** : Groupement hydroxyle

**OH•** : Radical hydroxyle

**PBS** : Tampon Phosphate Saline

**% PI** : Pourcentage d'Inhibition

**pH** : Potential Hydrique

**Rf** : Rapport frontal

**SD** : Standard Déviation

**tr** : Tour

**UV** : Rayonnement ultraviolet

**Z. lotus** : *Ziziphus lotus* L.

**ZI** : Zone d'inhibition

**µg EQ/mg** : Microgramme Equivalent par milligramme

**µgEQ/mg d'extrait** : Microgramme d'équivalents quercétine par milligramme d'extrait

# Introduction Général

À l'heure où la recherche mondiale s'oriente résolument vers des solutions thérapeutiques plus sûres, durables et issues de la biodiversité, les plantes médicinales occupent une place centrale dans les pratiques thérapeutiques des sociétés humaines. Leur richesse en composés bioactifs leur confère un potentiel remarquable pour la prévention et le traitement de nombreuses pathologies (**Atanasov *et al.*, 2021**). Dans un contexte mondial marqué par une recrudescence des maladies chroniques, une résistance croissante aux antibiotiques et une quête de produits naturels plus sûrs et efficaces, l'intérêt pour les ressources végétales s'est intensifié au sein de la communauté scientifique (**Ekiert *et al.*, 2020 ; Heinrich *et al.*, 2021**).

La wilaya de Khenchela, située dans les Aurès en Algérie, se distingue par une biodiversité riche et variée, influencée par son climat méditerranéen à tendance semi-aride et montagneuse. Les précipitations y varient entre 300 et 600 mm/an, avec des hivers froids et neigeux en altitude et des étés secs dans les plaines. Ces conditions favorisent le développement d'écosystèmes diversifiés (**Medjahdi *et al.*, 2021**) et abritent une flore comprenant plusieurs espèces endémiques et médicinales (**Benaradj *et al.*, 2020**).

Parmi ces espèces, *Ziziphus lotus*, communément appelé jujubier lotus ou « Sedra » en Algérie, est une plante emblématique des régions arides et semi-arides, notamment à Khenchela. Cet arbuste épineux de la famille des Rhamnacées peut atteindre 2 à 3 mètres de haut. Il se caractérise par ses rameaux flexibles, ses épines robustes et ses petites feuilles ovales légèrement dentelées (**Le Floc'h *et al.*, 2010**). Ses fleurs, jaune verdâtre et regroupées en grappes, dégagent un parfum discret qui attire les pollinisateurs. Ses fruits, des drupes comestibles, passent du vert au rouge-brun à maturité et possèdent une pulpe sucrée et farineuse, traditionnellement consommée dans certaines cultures (**Benítez *et al.*, 2018**).

Sur le plan écologique, *Ziziphus lotus* joue un rôle crucial dans la lutte contre la désertification grâce à son système racinaire profond et sa grande résistance à la sécheresse (**Nabti, 2017**). Il sert également de refuge et de source de nourriture pour diverses espèces animales. En ethnobotanique, cette plante est utilisée pour ses propriétés médicinales, notamment anti-inflammatoires et antioxydantes, ainsi que comme fourrage pour le bétail. Son bois, dur et résistant, est parfois employé dans l'artisanat local. Ces caractéristiques en font une espèce clé pour la restauration des écosystèmes dégradés et l'agroforesterie en zones arides (**Boulanouar & Abdelmoumen, 2004**).

Sur le plan culturel et spirituel, *Ziziphus lotus*, également appelé Sidr, incarne la pureté, la protection et les bienfaits spirituels. Ses feuilles sont couramment utilisées dans des rituels de

purification, comme le lavage des défunts en Islam. Considéré comme une plante sacrée dans la tradition musulmane, le Sidr est aussi un remède ancestral dont les vertus sont confirmées par la science moderne. Ses applications s'étendent de la sphère spirituelle à la pharmacopée, avec des études attestant de son efficacité thérapeutique (Djebli *et al.*, 2021).

Sur le plan thérapeutique, *Ziziphus lotus* est une plante aux multiples usages médicaux, dont chaque partie (fruits, feuilles, écorce, racines) possède des propriétés spécifiques. Les fruits, riches en vitamines (C, B) et minéraux (calcium, fer), sont traditionnellement consommés pour leurs effets toniques, anti-anémiques et digestifs (Boukeloua *et al.*, 2012; Bendif *et al.*, 2018). Leurs extraits présentent également une activité anti-inflammatoire, utile dans le traitement des affections gastro-intestinales (Gulfraz *et al.*, 2011). Les feuilles, employées en infusion ou en cataplasme, sont reconnues pour leurs effets hypoglycémifiants, bénéfiques dans la gestion du diabète (Miara *et al.*, 2019), ainsi que pour leurs propriétés antimicrobiennes contre des pathogènes comme *Staphylococcus aureus* (Belhouala & Benarba, 2020). L'écorce et les racines, préparées en décoction, sont utilisées comme sédatifs naturels pour traiter l'anxiété et l'insomnie, grâce à leur teneur en alcaloïdes et saponines (Ghalem & Mohamed, 2008). En usage externe, elles soulagent les douleurs articulaires et rhumatismales (Adzu *et al.*, 2003). Les graines, quant à elles, contiennent des composés neuroprotecteurs similaires à ceux de *Ziziphus jujuba*, avec des effets calmants sur le système nerveux (Heo *et al.*, 2003).

Le *Ziziphus lotus* représente ainsi une source prometteuse de polyphénols pour des applications en nutraceutique, pharmacologie et cosmétologie. Les polyphénols et leurs sous-classes, notamment les flavonoïdes, constituent un groupe de composés phytochimiques aux multiples implications en médecine préventive et thérapeutique (Boubakri *et al.*, 2022; El Maaiden *et al.*, 2023).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, dont l'objectif principal est d'évaluer *in vitro* les activités biologiques des polyphénols extraits des feuilles de *Ziziphus lotus*, notamment leur pouvoir antioxydant, leur activité anti-inflammatoire et leur effet antibactérien.

Ce manuscrit s'articule autour de la partie pratique : outre l'introduction et la conclusion, la partie expérimentale est divisée en deux chapitres. Le premier présente le matériel et les méthodes analytiques utilisés pour l'extraction, l'investigation phytochimique et l'étude *in vitro* des activités biologiques. Le second expose les résultats obtenus et leur discussion.

# Partie expérimentale

# Chapitre I

## Matériel et méthodes

Cette étude expérimentale a porté sur l'analyse phytochimique et l'évaluation *in vitro* des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes des extraits phénoliques issus des feuilles de la plante médicinale *Ziziphus lotus* L. Les travaux ont été réalisés au laboratoire pédagogique de biochimie de l'Université Abbas Laghrour et à l'hôpital Ahmed Ben Bella de Khenchela.

### I.1 Matériel

#### I.1.1 Matériel biologique

##### I.1.1.1 Matériel végétal

Les parties aériennes (feuilles) de *Ziziphus lotus* L., utilisées dans cette étude (Fig. 1), ont été récoltées dans la région de Hemmam Salhin (Khenchela) (Tab. 1). Après récolte, elles ont été séchées à l'abri de l'humidité et de la lumière pendant un mois, puis broyées pour obtenir une poudre fine. Celle-ci a été stockée dans un flacon en verre hermétique.



FIGURE I.1 – Photos des feuilles du *Ziziphus lotus* L. fraîches et sèches.

TABLE I.1 – Les coordonnées géographiques du site de récolte

<b>Région</b>	Hemmann Salhin
<b>Localisation</b>	Situé à environ 20 km au nord-ouest de Khenchela, dans la zone montagneuse des Aurès.
<b>Altitude</b>	Approximativement 1 050 mètres au-dessus du niveau de la mer.
<b>Latitude</b>	35° 23' 00" N
<b>Longitude</b>	7° 08' 00" E
<b>Bioclimat</b>	Semi-aride à hiver froid, avec des conditions montagnardes influencées par l'altitude.

#### I.1.1.2 Souches bactériennes

Afin de tester le potentiel antibactérien in vitro des extraits de *Ziziphus lotus* L., neuf souches de référence provenant du laboratoire pédagogique de l'université Abbes Laghrour et du Centre national de biotechnologie (CRBt) de Constantine ont été utilisées (Tab. 2).

TABLE I.2 – Souches bactériennes de référence utilisées pour le test de sensibilité

Bactérie (Code)	Gram
Staphylococcus aureus (ATCC6538)	Positif
Bacillus cereus (ATCC10876)	Positif
Yersinia enterocolitica (ATCC 27729)	Négatif
Salmonella typhimurium (ATCC 14028)	Négatif
Salmonella aboni (NCTC 6017)	Négatif
Salmonella enterica (ATCC 13076)	Négatif
Escherichia coli (NCTC10538)	Négatif
Pseudomonas aeruginosa (NCIMB 8626)	Négatif
Klebsiella pneumoniae (ATCC43816)	Négatif

### I.1.1.3 Echantillons sanguins

Des prélèvements sanguins ont été effectués sur des sujets sains non-fumeurs pour mesurer l'activité anti-hémolytique des extraits.

### I.1.2 Médicaments

Deux médicaments de référence ont servi de témoins positifs pour les tests anti-hémolytique et anti-inflammatoire.

- Le médicament anti-hémolytique « Dicynone » de concentration 250 mg pour l'activité anti-hémolytique.
- Le médicament anti-inflammatoire « Diclofinac », avec une concentration de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$

### I.1.3 Réactifs et appareillages utilisés

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été employés lors de nos expérimentations, notamment le  $\text{FeCl}_3$ , l'acide acétique, l'acide sulfurique le  $\text{NaOH}$ , le  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_3\text{OH}$ ,  $\text{HCL}$ , l' $\text{AlCl}_3$ , le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'éthanol, l'hexane, le réactif de Folin-Ciocalteu, le DPPH, le carbonate de sodium, le méthanol, le n-butanol, l'acide sulfurique, l'acide ascorbique, l'acide gallique, l'acide chlorhydrique, le réactif de Mayer et le milieu de culture Mueller-Hinton Agar, tous fournis par Sigma-Aldrich. L'appareillage utilisé comprenait un rotavapor (HAHNVAPOR), un

spectrophotomètre (SPECTRUM SP-UV 2005), une chambre d'observation UV 254/365 nm (VILBER LOURMAT), un bain-marie (Nüve Bath, MEMMERT), une étuve universelle (5–220°C, MEMMERT), un agitateur magnétique (SCIOGEX), un vortex (VELP), une balance analytique (OHAUS), une balance de précision (KERN PCB), une centrifugeuse (EZ Swing 3K, Rotofix 32 A), un réfrigérateur (LIEBHERR), une plaque chauffante (LABTECH), un autoclave (RAYPA) et un pH-mètre (HANNA INSTRUMENTS).

## I.2 Méthodes

### I.2.1 Etude phytochimique

#### I.2.1.1 Préparation de l'extrait brut méthanolique (*EB MeOH*)

Un échantillon de 200 g de poudre des feuilles de *Ziziphus lotus* L. a été macéré dans un mélange méthanol/eau distillée (70 :30, v/v) pendant 24 heures. Après filtration, l'extrait hydroalcoolique a été récupéré, et l'opération a été répétée trois fois en renouvelant le solvant à chaque étape, suivant le protocole décrit par **Douaouya *et al.*** (2022). Le méthanol a ensuite été éliminé par évaporation sous pression réduite à l'aide d'un rotavapeur à 45 °C (Annexe.1). L'extrait concentré obtenu a finalement été conservé à -4 °C avant utilisation ultérieure.

#### I.2.1.2 Fractionnement de l'*EB MeOH*

L'extrait méthanolique brut a été dissous dans 400 ml d'eau distillée bouillante, puis le mélange a été maintenu à température ambiante pendant 24 heures pour permettre une homogénéisation complète. Après filtration, l'extrait aqueux obtenu a été fractionné par extraction liquide-liquide successive (Annexe 2) en utilisant trois solvants organiques de polarité croissante : l'hexane (*Fr Hex*), l'acétate d'éthyle (*Fr Ac Et*), et le n-butanol (*Fr But*). Ce protocole permet une séparation efficace des composés en fonction de leur affinité pour chaque solvant (**Smith *et al.*, 2020**). Les différentes étapes de cette procédure sont résumées dans la figure 2.

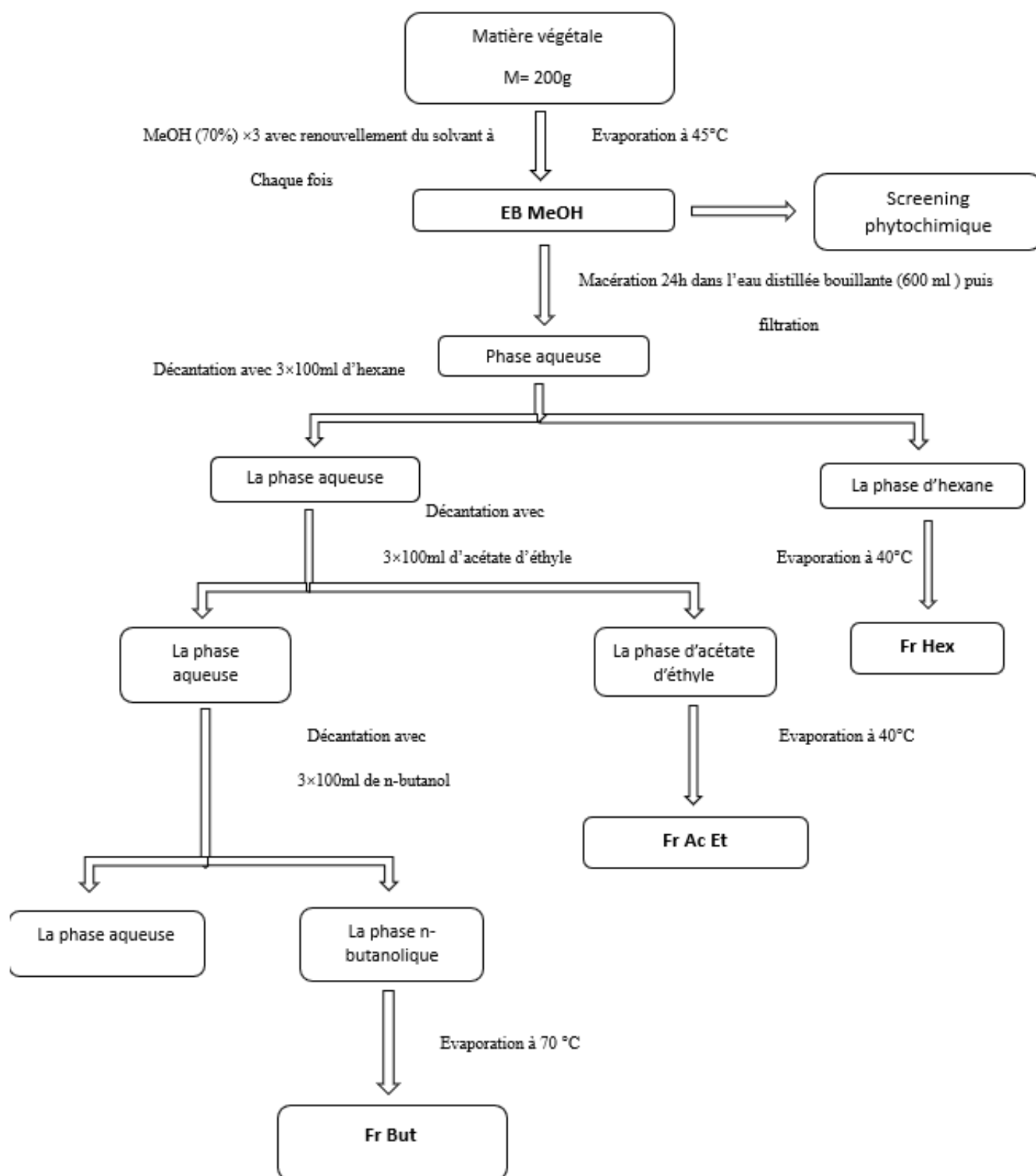


FIGURE I.2 – Protocole expérimental résumant l'extraction et les étapes du fractionnement

### I.2.1.3 Détermination du rendement d'extraction

Pour déterminer le rendement d'extraction des différents solvants (méthanol, hexane, acétate d'éthyle et n-butanol), vous devez peser les résidus ou poudres obtenus après évaporation du solvant et appliquer la formule suivante (**Sarker *et al.*, 2012**) :

$$\text{Rendement (\%)} = \left( \frac{\text{Masse de l'extrait}}{\text{Masse de l'échantillon initial}} \right) \times 100$$

### I.2.1.4 Screening phytochimique

L'analyse qualitative des composés phytochimiques consiste à réaliser des tests spécifiques ou semi-spécifiques basés sur des réactions de coloration ou de précipitation, propres à chaque classe de principes actifs. La présence ou l'absence des différentes classes de métabolites secondaires dans les extraits a été évaluée qualitativement selon les méthodes décrites par **Koffi (2009)** .

- **Dépistage des tanins** Un volume de 2 ml d'une solution aqueuse de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 1 % est ajouté à 1 ml du filtrat issu de la macération. La présence de tanins est révélée par l'apparition d'une coloration verdâtre ou bleu-noir, selon la méthode décrite par **Edeoga *et al.* (2005)**.
- **Dépistage des alcaloïdes** La présence d'alcaloïdes est confirmée par un test au réactif de Mayer (solution aqueuse de KI 5 % et  $\text{HgCl}_2$  1,358 %). Après addition de 5 gouttes du réactif à 1 ml de filtrat, la formation d'un précipité blanc-jaunâtre ou crème constitue un résultat positif (**Evans, 2009**).
- **Dépistage des saponines** Le test de détection des saponosides consiste à introduire 2 ml de filtrat dans un tube à essai, complété à 5 ml avec de l'eau distillée. Après une agitation vigoureuse de 15 secondes (mouvements longitudinaux), le mélange est laissé au repos pendant 20 minutes. Une mousse stable persistant avec une hauteur supérieure à 1 cm à la fin de cette période indique un résultat positif, révélant la présence de saponosides (**Benzahi *et al.*, 2001**).
- **Dépistage des flavonoïdes** La recherche des flavonoïdes est réalisée en mélangeant 2 ml de filtrat avec 2 ml de solution éthanolique d' $\text{AlCl}_3$  à 1%. Après 10 minutes de repos à température ambiante, une coloration jaune à jaune-verdâtre observée sous lumière naturelle révèle leur présence (**Faker *et al.*, 2022**).

- **Dépistage des terpenoïdes et des stéroïdes** Pour effectuer le test de Salkowski, dissoudre 2 ml de l'extrait filtré dans 2 ml de chloroforme. Ensuite, ajouter délicatement 1 ml d'acide sulfurique concentré ( $H_2SO_4$ ) et chauffer légèrement le tube à essai. L'apparition d'une coloration brune confirme la présence de stérols et de terpènes (**Sánchez-Rangel et al. 2016**).
- **Dépistage des Anthocyanes** Pour détecter la présence de composés phénoliques, traiter 2 ml de l'extrait avec 2 ml d'acide chlorhydrique (HCl) à 2 N, puis ajouter quelques gouttes d'hydroxyde d'ammonium ( $NH_4OH$ ). Une coloration rose-rouge apparaissant initialement et virant progressivement au bleu violacé confirme un résultat positif (**Mellouk., 2013**).
- **Dépistage des coumarines** Les résidus secs ont été dissous dans de l'eau distillée sous chauffage modéré. Après refroidissement, la solution a été répartie équitablement dans deux tubes à essai : le premier tube a servi de témoin, tandis que 0,5 mL d'hydroxyde d'ammonium ( $NH_4OH$ ) à 10 % a été ajouté dans le second. Une fluorescence bleue ou verte observée sous une lampe UV à 365 nm (**Donrop, 2007**) a permis de confirmer la présence de coumarines dans l'échantillon testé.
- **Dépistage des composés réducteurs** Ce test, basé sur la réaction de Keller-Kiliani, consiste à ajouter à 1 ml de l'extrait un mélange de 5 ml d'acide acétique et 5 ml d'acide sulfurique, tous deux contenant des traces de  $FeCl_3$ . La présence de composés réducteurs se manifeste par la formation de deux phases colorées distinctes : une phase supérieure brun-rouge dans l'acide acétique et une phase inférieure bleu-vert dans l'acide sulfurique (**Romero, 2005**).

#### I.2.1.5 Chromatographie sur couche mince des extraits poly phénoliques issus du Sidr

- **Principe** La chromatographie sur couche mince (CCM) permet de séparer les composants d'un échantillon en fonction de leur migration différentielle dans une phase mobile (généralement un mélange de solvants adapté) et de leur interaction avec la phase stationnaire, comme le gel de silice ou le polyamide. Bien que cette technique ne permette pas d'identifier formellement un composé, elle donne des indices tels que le rapport frontal (Rf) et la coloration, qui peuvent suggérer une structure potentielle (**Zeghad, 2009**).
- **Protocole de CCM sur gel de silice** Les analyses par CCM ont été effectuées sur des plaques de silice/aluminium ( $10 \times 10$  cm). Les échantillons ( $2 \mu l$ ) ont été déposés à 1,5 cm

du bord inférieur, puis les plaques ont été placées verticalement dans des cuves contenant la phase mobile, avec un niveau de solvant à 0,5 cm de hauteur. Cinq systèmes de solvants ont été testés pour optimiser la séparation (Tab. 3).

TABLE I.3 – Différents systèmes de solvants essayés

Numéro	Systèmes solvants	Pourcentage
1	Acétate d'éthyle; acide formique; acide acétique; eau distillée	(25/3/3/7)
2	Butanol; acide acétique; eau distillée	(4/1/5)
3	Acétone; eau distillée	(10/10)
4	Butanol; acide acétique; eau distillée	(10/15/25)
5	Acétate d'éthyle; acide acétique glacial; acide formique; eau distillée	(25/3/3/7)

Après développement et séchage, les plaques ont été observées sous UV (254 et 365 nm) en chambre noire. Les taches ont été décrites (couleurs et positions), et leurs rapports frontaux (Rf) calculés selon la formule :  $Rf = \text{distance parcourue par la tache} / \text{distance parcourue par le front de solvant}$ .

Ce facteur lié à la polarité des composés (Zeghad, 2009), permet d'estimer précocement la structure des flavonoïdes.

### I.2.1.6 Analyses quantitatives des extraits de *Ziziphus lotus* L

#### 1. Dosage des polyphénols

- **Principe** La teneur en polyphénols totaux a été déterminée selon la méthode colorimétrique de Wong (2006), basée sur la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu (un mélange d'acides phosphomolybdique et phosphotungstique) en milieu alcalin. Les composés phénoliques réduisent le réactif, générant une coloration bleue proportionnelle à leur concentration. L'absorbance a été mesurée à 765 nm (Vuorela *et al.*, 2005).
- **Protocole expérimental** 200 µL de chaque extrait, solubilisé dans le méthanol, ont été mélangés à 1 ml de Folin-Ciocalteu (10 %), incubés 4 min, puis additionnés de 800 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5 g/L). Après 2 h d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 765 nm.
- **Expression des résultats** La teneur en polyphénols totaux a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe 3) établie avec un standard approprié qui est l'acide gallique, et exprimée en équivalents d'acide gallique (µg EAG/mg d'extrait sec).



- **Protocole expérimental** Une solution de DPPH à 100  $\mu$ M a été préparée par dissolution dans le méthanol. À partir de la solution mère de chaque extrait (dissous dans le méthanol à une concentration de 0,5 mg/ml), des dilutions appropriées ont été réalisées. Pour chaque essai, 50  $\mu$ l d'extrait (ou de ses dilutions) ont été mélangés à 1,5 ml de la solution de DPPH. Après agitation vigoureuse, les mélanges ont été incubés à température ambiante pendant 30 minutes, à l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis. Un témoin (blanc) a été préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par du méthanol pur. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif pour valider le protocole.
- **Expression des résultats** Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (PI). Le PI du DPPH • a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{PI du DPPH} \bullet = [(AB - AE) / AB] \times 100$$

Où : A B : Absorbance initiale de la solution de DPPH (sans antioxydant).

A E : Absorbance résiduelle après incubation avec l'extrait antioxydant.

Cette méthode permet d'évaluer l'efficacité des extraits à neutraliser les radicaux libres et de déterminer la concentration inhibitrice moyenne ( $IC_{50}$ ), paramètre clé pour comparer la puissance des antioxydants

### I.2.2.2 Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

#### 1. Méthode de stabilisation des membranes de GRH (Activité anti-hémolytique)

- **Principe**

L'activité anti-hémolytique des extraits a été évaluée selon la méthode décrite par **Barka et al., (2023)**, afin d'étudier leur capacité à protéger les érythrocytes humains contre la lyse induite par des agents oxydants.

- **Préparation de la suspension érythrocytaire**

Un prélèvement de 5 ml de sang veineux a été effectué chez un donneur sain, dans un tube contenant un anticoagulant à base d'EDTA.

\*Le sang a été centrifugé à 1000 tr/min pendant 5 minutes afin de séparer les globules rouges (culot globulaire) du plasma.

\*Le surnageant (plasma) a été éliminé, et le culot globulaire obtenu a été lavé trois fois avec une solution de tampon phosphate salin (PBS) à 0,2 M, pH 7,4.(Annexe 5)

\*Chaque lavage consistait à suspendre les globules rouges dans le PBS, suivi d'une centrifugation à 1000 tr/min pendant 5 minutes.

\*Après le dernier lavage, 0,4 ml du culot globulaire a été dilué dans 9,6 ml de PBS (0,2 M, pH 7,4) afin d'obtenir une suspension érythrocytaire à 4 % d'hématocrite, utilisée pour le test anti-hémolytique.

- **Préparation des extraits**

Des solutions de chaque extrait ont été préparées dans le tampon phosphate salin (PBS, 0.2 M, pH 7.4) aux concentrations suivantes : 1 mg/ml, 0,5 mg/ml et 0,25 mg/ml. Ces dilutions ont été utilisées pour évaluer l'effet dose-dépendant des extraits sur la protection des érythrocytes contre l'hémolyse.

- **Protocole expérimental** L'évaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits a été réalisée selon les étapes suivantes :

- (a) Préparation du mélange réactionnel : dans chaque tube à essai, 1 ml de la suspension érythrocytaire à 4 % a été mélangé avec 0,5 ml d'extrait (préparé dans le tampon PBS) à différentes concentrations (1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml).
- (b) Incubation : les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 20 minutes afin de permettre l'interaction entre les composés bioactifs et les membranes érythrocytaires.
- (c) Induction de l'hémolyse : après incubation, 0,5 ml de solution de NaCl à 2 %, diluée dans du PBS, a été ajoutée à chaque tube.
- (d) Centrifugation : les échantillons ont été centrifugés à 1000 tr/min pendant 10 minutes.
- (e) Mesure de l'hémolyse : le surnageant contenant l'hémoglobine libérée a été soigneusement récupéré, puis l'absorbance a été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- (f) Calcul de l'hémolyse relative : le pourcentage d'hémolyse a été déterminé en comparant les résultats obtenus avec ceux du contrôle négatif (échantillon traité uniquement avec NaCl 2 % sans extrait). Une diminution de l'absorbance indique une protection membranaire assurée par l'extrait testé.

- **Expression des résultats** Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé afin d'évaluer l'effet protecteur des extraits sur les globules rouges. Le calcul repose sur la différence d'absorbance entre le contrôle négatif (NaCl 2 % sans extrait) et les échantillons traités avec les extraits selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left( \frac{A_c - A_{ext}}{A_c} \right) \times 100$$

Ou :

- $A_c$  = absorbance du contrôle négatif (2 NaCl sans extrait)
- $A_{ext}$  = absorbance avec extrait

## 2. Test de dénaturation de Sérum Albumin Bovin (SAB)

### • Principe

La dénaturation thermique de la BSA est un modèle *in vitro* simulant les processus inflammatoires (notamment la dénaturation des protéines lors de l'inflammation). Les composés anti-inflammatoires stabilisent la protéine, empêchant sa dénaturation, ce qui se traduit par une absorbance plus faible à 416 nm (**Gautam & Jachak, 2009**).

### • Protocole expérimental

Quatre types de solutions ont été préparés pour l'expérimentation :

\*Solution test : composée de 0,45 ml de BSA à 0,5 % (p/v) préparée dans de l'eau distillée, et 0,05 ml de l'extrait végétal à différentes concentrations (500, 1000 et 1500 µg/ml). \*Contrôle négatif : composée de 0,45 ml de BSA à 0,5 % et 0,05 ml d'eau distillée, sans extrait.

\*Contrôle produit : composée de 0,45 ml d'eau distillée et 0,05 ml d'extrait (500, 1000 et 1500 µg/ml), afin d'évaluer l'absorbance propre de l'extrait.

\*Solution standard : composée de 0,45 ml de BSA à 0,5 % et 0,05 ml de diclofénac sodique, utilisé comme anti-inflammatoire de référence, aux mêmes concentrations que les extraits.

L'ensemble des tubes a été incubé à 37 °C pendant 20 minutes, suivi d'un chauffage à 57 °C pendant 3 minutes afin d'induire la dénaturation des protéines.

Après refroidissement à température ambiante, 2,5 ml de tampon phosphate salin (PBS, pH 6,3) ont été ajoutés à chaque tube.

L'absorbance a ensuite été mesurée à 416 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

Une faible absorbance indique une meilleure inhibition de la dénaturation, traduisant ainsi un effet anti-inflammatoire plus élevé.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de protéine été calculée comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left( \frac{A_{contrôle} - A_{essai}}{A_{contrôle}} \right) \times 100$$

Ou :

- $A_{essai}$  = absorbance de la solution contenant l'extrait et la BSA (solution test)
- $A_{contrôle}$  = absorbance de la solution contrôle (BSA + eau distillée)

Le témoin négatif (contrôle) est considéré comme représentant 100 % de dénaturation. Une diminution de l'absorbance en présence de l'extrait indique une inhibition de la dénaturation protéique, et donc un potentiel effet anti-inflammatoire.

### I.2.2.3 Evaluation de l'activité antibactérienne

Dans cette partie, nous sommes à la recherche de composés antibactériens produits à partir de la plante médicinale *Ziziphus lotus* L., réputée pour ses propriétés thérapeutiques. La méthode de diffusion en milieux gélosés sur boîtes de pétri a été employée.

#### 1. Méthode des disques -Test d'efficacité

L'activité antibactérienne des extraits phénoliques du Sidr a été évaluée selon la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé, une technique standardisée pour l'étude de la sensibilité bactérienne (Khameneh *et al.*, 2023). Cette approche consiste à déposer un disque de papier imprégné de l'extrait testé sur un milieu nutritif solide préalablement ensemencé avec la souche bactérienne cible. L'agent antibactérien diffuse radialement dans la gélose, inhibant la croissance des micro-organismes sensibles. L'activité est quantifiée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (halo clair autour du disque), exprimé en millimètres. Les résultats sont interprétés selon les critères du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ou de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), selon le protocole utilisé.

##### (a) Repiquage des espèces bactériennes

Les souches bactériennes de référence ont été étalées par stries sur une gélose Mueller Hinton, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des colonies isolées. Ces dernières ont ensuite été utilisées pour préparer l'inoculum (Fig. I.4).



FIGURE I.4 – Repiquage des espèces bactériennes

(b) **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum bactérien a été préparé dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure de 24 h selon la recommandation du CA-SFM (**Amara et al., 2022**). La densité a été ajustée à 0.5 Mack Ferland (Annexe 6) (Fig. I.5)

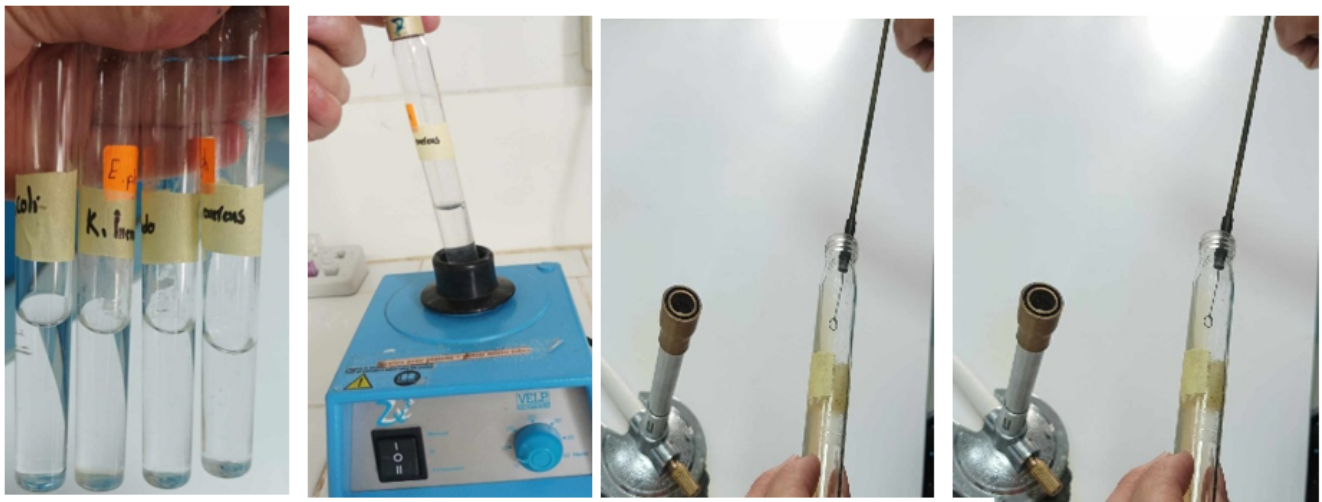


FIGURE I.5 – Préparation de l'inoculum

(c) **Ensemencement**

Il est nécessaire d'effectuer l'ensemencement en moins de 15 minutes après la préparation de l'inoculum (Fig. 6). Les étapes de l'ensemencement sont les suivantes (**Amara et al., 2022**) :

- Ajouter 20 ml de la gélose Muller-Hinton (Annexe 7) à chaque boîte de pétri, puis laisser prendre soin de la solidification.
- Insérer un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, le presser fermement et le tourner sur la paroi interne du tube pour le décharger à son maximum.
- Appliquer l'écouvillon sur toute la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en laissant des stries serrées.
- Effectuer cette opération à deux reprises, en tournant la boîte de pétri à 60° à chaque fois, en évitant de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Terminer le processus d'ensemencement en passant l'écouvillon sur la zone entourant la gélose.

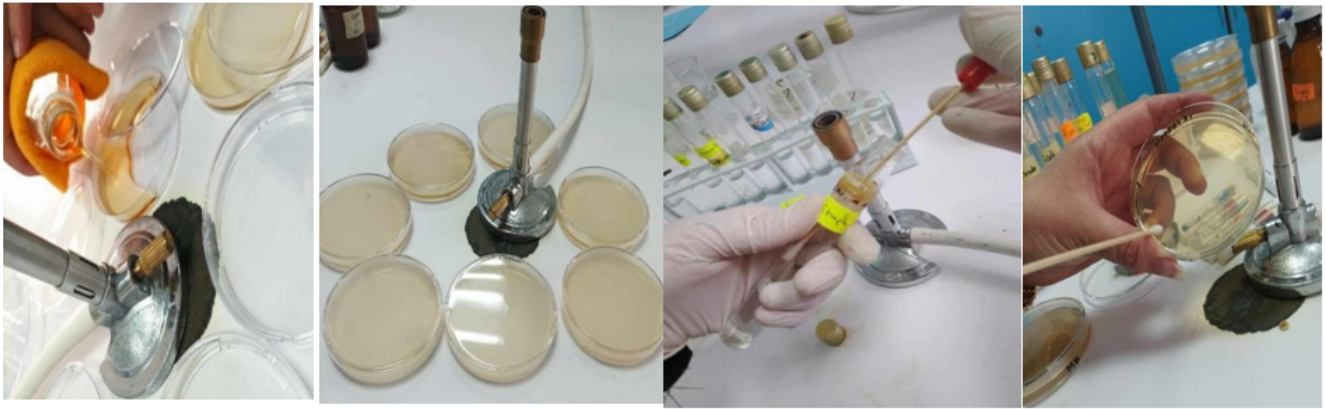


FIGURE I.6 – Ensemencement des souches bactériennes sur milieu gélosé (MH).

#### (d) Préparation des disques d'aromatogramme

Les étapes de préparation des disques d'aromatogrammes en présence des extraits sont illustrées comme suit (Fig. 7) :

- Stériliser du papier Wattman n 3 coupés en disques de 6mm de diamètre à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes
- À l'aide d'une pince stérile déposé au centre de chaque moitié de la boîte pétri un disque stérile de papier filtre.
- À l'aide d'une micropipette, ajouté 15µl d'extrait
- Préparer les disques de contrôle négatif imprégnés de Di-Méthyl-Sulf-Oxyde (DMSO)

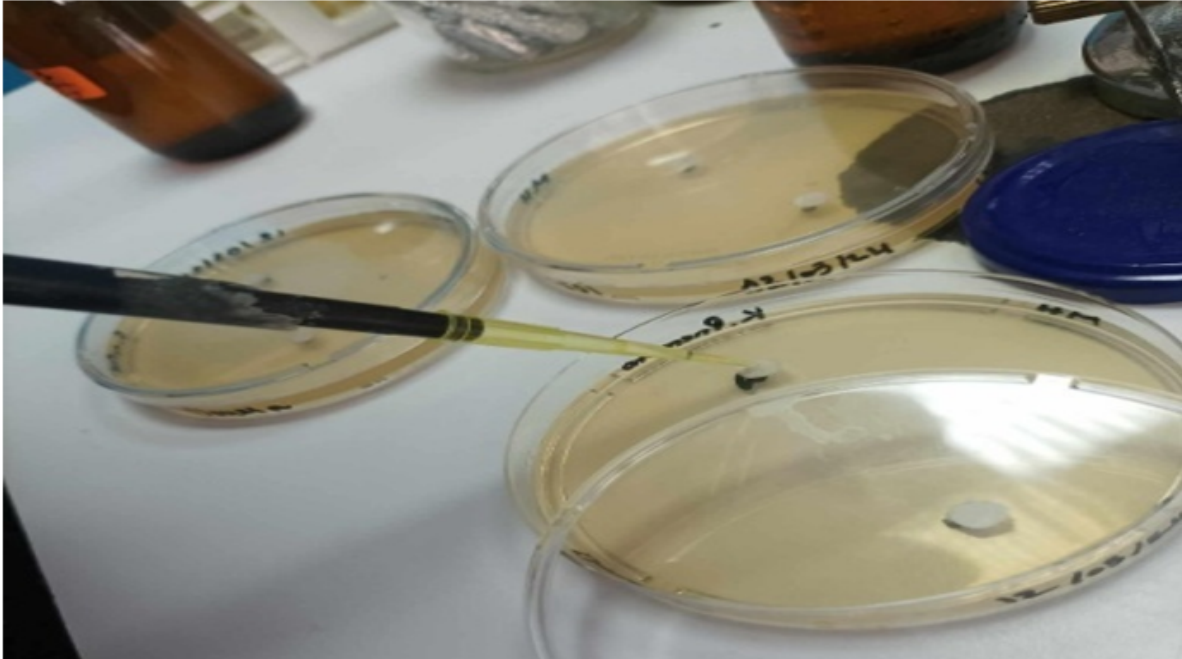


FIGURE I.7 – Préparation des disques d'aromatogrammes en présence des extraits.

(e) **Incubation et lecture**

Les diamètres des zones d'inhibition (ZI) ont été mesurés (Fig. 8) autour des disques après une pré-incubation de 30 minutes à la température ambiante suivie d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 h.

La souche ayant un diamètre  $D < 8$  mm,  $9 \leq D \leq 14$  mm,  $15 \leq D \leq 19$  mm,  $D > 20$  mm est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensible (+++)



FIGURE I.8 – Préparation des disques d'aromatogrammes en présence des extraits.

Toutes les expériences ont été faites en triple. Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type.





# Chapitre II

## Résultats et discussion

### II.1 Rendements d'extraction

L'extraction des molécules bioactives a été effectuée par macération hydro-méthanolique, suivie d'un fractionnement liquide-liquide afin de séparer les composés selon leur polarité. Trois solvants de polarité croissante ont été utilisés : l'hexane (le moins polaire), l'acétate d'éthyle (polarité intermédiaire) et le n-butanol (polaire). Cette approche a permis d'isoler trois fractions organiques distinctes, en plus de l'extrait hydro-méthanolique brut initial. L'aspect physique ainsi que le rendement de chaque extrait sont présentés dans le tableau ci-dessous.

TABLE II.1 – Rendement de l'extraction

Extrait	Aspect physique	Rendement
<i>Fr Hex</i>		2.54%
Fr AcEt		1.59%
<i>Fr But</i>		17.92%
<i>EB MeOH</i>		37.09%

Les rendements d'extraction varient significativement en fonction de la polarité des solvants

utilisés. L'extrait hydro-méthanolique (*EB MeOH*) présente le rendement le plus élevé (37,09 %), suivi de l'extrait au butanol (17,92 %), tandis que les extraits à l'hexane (2,54 %) et à l'acétate d'éthyle (1,59 %) affichent des rendements nettement inférieurs. Ces résultats indiquent une prédominance de composés polaires dans les feuilles de *Ziziphus lotus* L., en accord avec les données publiées sur des espèces apparentées. En effet, une étude menée sur *Ziziphus spina-christi* a également observé des rendements d'extraction plus élevés avec des solvants polaires, suggérant une teneur importante en métabolites secondaires hydrosolubles, tels que les flavonoïdes et les tanins (Al-Zubairi *et al.*, 2017; Hamad *et al.*, 2020).

## **II.2 2. Investigation phytochimique des extraits de *Ziziphus lotus* L**

### **II.2.1 Tests phytochimiques**

Le screening phytochimique des extraits phénoliques des feuilles de *Ziziphus lotus* L. (Sidr) permet d'identifier les principales familles de composés bioactifs présents grâce à des réactions de précipitation ou de coloration spécifiques. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau II.2 :

TABLE II.2 – Analyse phytochimique préliminaire des extraits de *Z. lotus*

Test phytochimique		Résultat	Caractéristique visuelle
Tanins	FeCl <sub>3</sub>	+	
Alcaloïdes	Mayer	+	
Saponines	Test de la mousse	+	
Flavonoïdes	AlCl <sub>3</sub>	+	
Terpenoïdes et stéroïdes	Test à la chaleur avec le réactif de Salkowski	+	
Anthocyanes	HCl (2N) + NH <sub>4</sub> OH	-	
Coumarines	NH <sub>4</sub> OH 10%	-	
Composés réducteurs	Acide sulfurique + acide acétique + FeCl <sub>3</sub>	-	

Les résultats sont exprimés selon :

- Réaction positive (+)
- Réaction négative (-)

L'analyse phytochimique de *Ziziphus lotus* met en évidence une composition dominée par des tanins, flavonoïdes et saponines en concentrations significatives, alors que les alcaloïdes et terpénoïdes/stéroïdes ne sont présents qu'à l'état de traces. Aucune trace d'anthocyanes, de coumarines ou de composés réducteurs n'a été détectée. Ces observations corroborent les données antérieures, avec notamment les travaux de **Boukeloua et al (2012)** qui attribuent aux tanins et flavonoïdes des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires notables, ainsi que ceux de **Ghazouani et al. (2020)** confirmant l'abondance des saponines et leur implication dans diverses activités biologiques. Plus récemment, une étude de **Bencheikh et al (2022)** a quantifié ces composés phénoliques et démontré leur potentiel pharmacologique. La faible représentation des alcaloïdes et terpénoïdes, déjà signalée par **Belhouala et al. (2016)**, a été confirmée par **El Moussaoui et al. (2023)**, suggérant que ces métabolites ne jouent qu'un rôle mineur dans le profil phytochimique de cette espèce.

## II.2.2 Etude qualitative de la chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) a été employée pour analyser les profils polyphénoliques des extraits, en optimisant les paramètres clés tels que la phase stationnaire (silice ou alumine), la phase mobile (systèmes d'élution de polarités variées) et les conditions de saturation de la chambre de développement (**Yrjönen, 2004**). Les composés ont été identifiés par comparaison des rapports frontaux (Rf) et des caractéristiques des taches sous UV (365 nm), avec une révélation spécifique aux flavonoïdes. Les résultats, consignés dans un tableau, ont révélé des différences chromatographiques significatives entre les extraits, confirmant l'efficacité de la méthode pour la séparation et la détection des composés phénoliques (**Wagner & Bladt, 2001**).

TABLE II.3 – CCM des extraits Système solvant : BAW (40 : 10 :50)

Couleur sous UV (365nm)	Rapport frontal Rf (cm)	Type de flavonoïdes probable	Raisonnement
Rouge/Rouge fluorescente	0.83	Flavones ou Flavonols, glycosylés	Les taches rouges fluorescentes à haut Rf sont souvent associées à des flavones ou flavonoïdes glycosylés, comme la rutine (quercétine-3-rutinoside), fréquemment rapportée dans <i>Ziziphus spp.</i> ( <b>Boukeloua et al., 2012</b> ).
Bleu	0.33	Flavonols	Les taches bleues à faible Rf pourraient correspondre à des flavonols moins polaires comme le kaempferol, identifié dans les extraits de <i>Z. lotus</i> par ( <b>Ghazouani et al., 2020</b> ).
Bleu	0.41	Flavones	Une tache bleue à Rf intermédiaire pourrait indiquer la présence de lutéoline, un flavone commun dans ce genre ( <b>Menaria et al., 2018</b> ).
Rouge/Rose fluorescente	0.58	Anthocyanes ou dérivés	Bien que les tests qualitatifs aient donné des résultats négatifs pour les anthocyanes, des dérivés ou des pigments similaires pourraient expliquer cette fluorescence rose/rouge.
Rouge/Rose fluorescente	0.59	Autres hétérosides flavoniques	Proche du Rf 0.58, pourrait indiquer un isomère ou un composé structurellement proche.
Bleu	0.54	Catechols ou tanins condensés	Les tanins condensés (détectés en tests qualitatifs) peuvent également migrer en CCM et fluorescer en bleu ( <b>Belhouala et al., 2016</b> ).

L'analyse par CCM des extraits de *Ziziphus lotus* (système butanol/acide acétique/eau, 4 :1 :5) a révélé six spots (Rf 0,33-0,83), dont des fluorescences rouges (Rf 0,58-0,59, 0,83) et bleues (Rf 0,33,

0,41, 0,54), caractéristiques des flavonoïdes et composés phénoliques (Singleton *et al.*, 1999). Ces profils (Fig.9 ), similaires à ceux décrits pour *Z. spina-christi* (Benabderrahim *et al.*, 2018), suggèrent la présence d'aglycones (Rf élevés) et de glycosides flavonoïdiques (Rf faibles), en accord avec les études LC-ESI-MS identifiant acide quinique et rutine comme composés majeurs (Borgi *et al.*, 2020 ; Touaibia, 2024). La fraction butanolique (*Fr But*) présente la meilleure séparation et la plus forte teneur en composés bioactifs, confirmant le potentiel thérapeutique de *Z. lotus*.

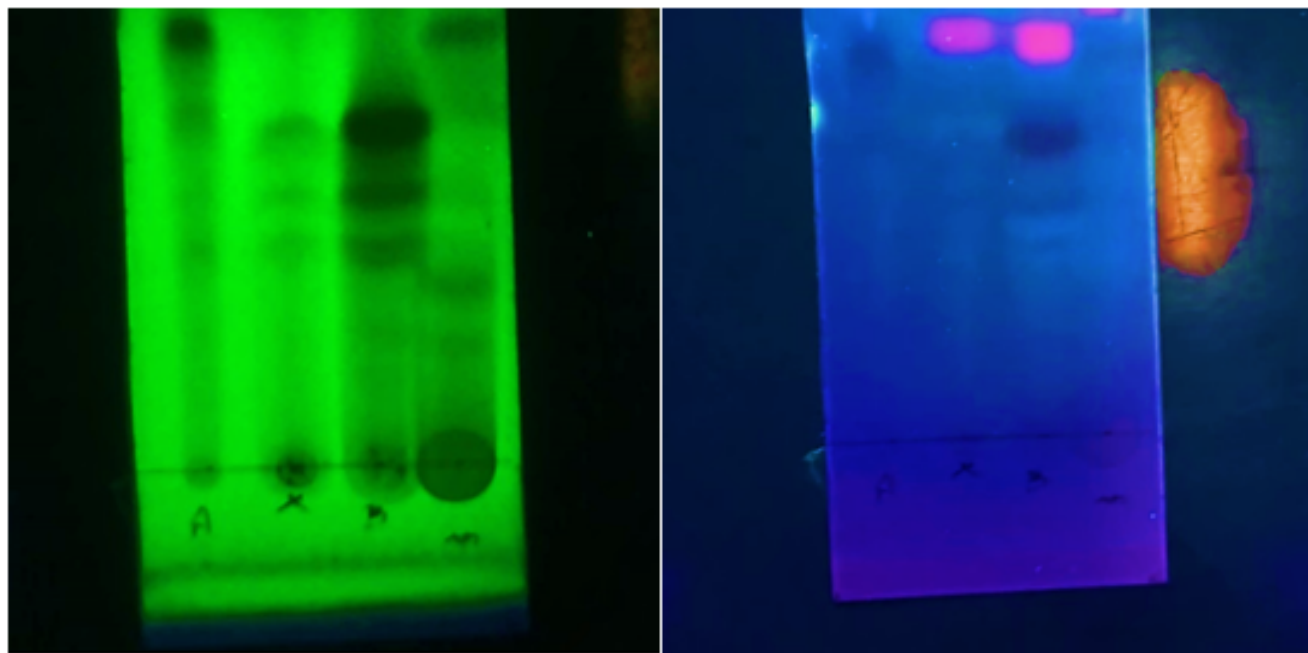


FIGURE II.1 – Photographie des chromatogrammes révélés sous lumière UV à 254 nm (a) et à 365 nm (b), en utilisant le système solvant BAW (4 :1 :5).

- m : EB MeOH
- B : Fr But
- X : Fr Hex
- A : Fr Ac Et

## II.2.3 Analyses quantitatives

### II.2.3.1 Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits de *Ziziphus lotus* L. a été déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Cette technique, largement décrite dans la littérature, constitue une référence pour le dosage des composés phénoliques dans les matrices végétales (Blasa *et al.*, 2007). L'acide gallique a été sélectionné comme étalon en raison de sa réactivité optimale avec le réactif de Folin-Ciocalteu et de son utilisation courante pour la quantification des phénols en chimie analytique (Maisuthisakul *et al.*, 2008). Les résultats ont été exprimés en équivalents d'acide gallique (EAG) par gramme de matière sèche, conformément aux protocoles standardisés. (Annexe 8)

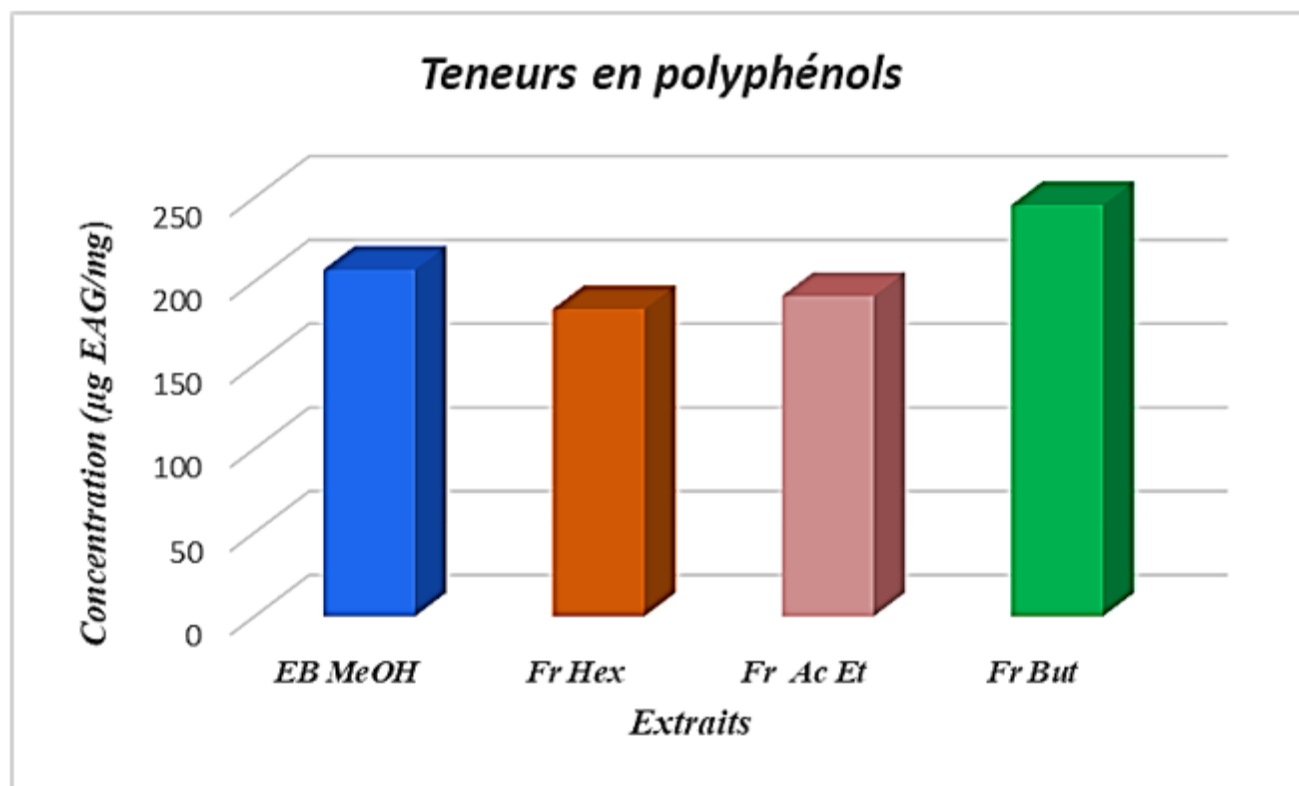


FIGURE II.2 – Histogramme représente la teneur des extraits en polyphénols

L'étude révèle des teneurs élevées en polyphénols dans les extraits polaires de *Z. lotus* avec  $245,58 \pm 4,11 \mu\text{g EAG/mg}$  (*Fr But*) et  $206,95 \pm 5,89 \mu\text{g EAG/mg}$  (*EB MeOH*), contre des valeurs inférieures pour les fractions apolaires (*Fr Hex* :  $183,44 \pm 1,01$ ; *Fr Ac Et* :  $191,28 \pm 1,01 \mu\text{g EAG/mg}$ ), confirmant l'efficacité des solvants polaires pour l'extraction (Benaissa *et al.*, 2024).

Comparativement, nos résultats s'alignent avec les données récentes pour *Z. lotus* (271,65 mg EAG/g; (Mannino *et al.*, 2022) et dépassent t celles rapportées pour *Z. spina-christi* (11,8-52,5 mg EAG/g); (Al-Rimawi *et al.*, 2016) et *Z. mauritiana* (84,69 µg EAG/mg; Abdel-Hameed *et al.*, 2024). L'identification des marqueurs phénoliques majeurs (acide quinique, rutine; (Borgi *et al.*, 2020) confirment la qualité des extraits et soulignent le potentiel thérapeutique de *Z. lotus* soutenant son utilisation traditionnelle et ouvrant des perspectives pour le développement des principes actifs antioxydants.

### II.2.3.2 Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont été quantifiés par étalonnage avec une solution de quercétine ( $y = ax + b$ ), et les résultats sont exprimés en µg EQ/mg d'extrait, reflétant leur teneur relative (Fig. 11).

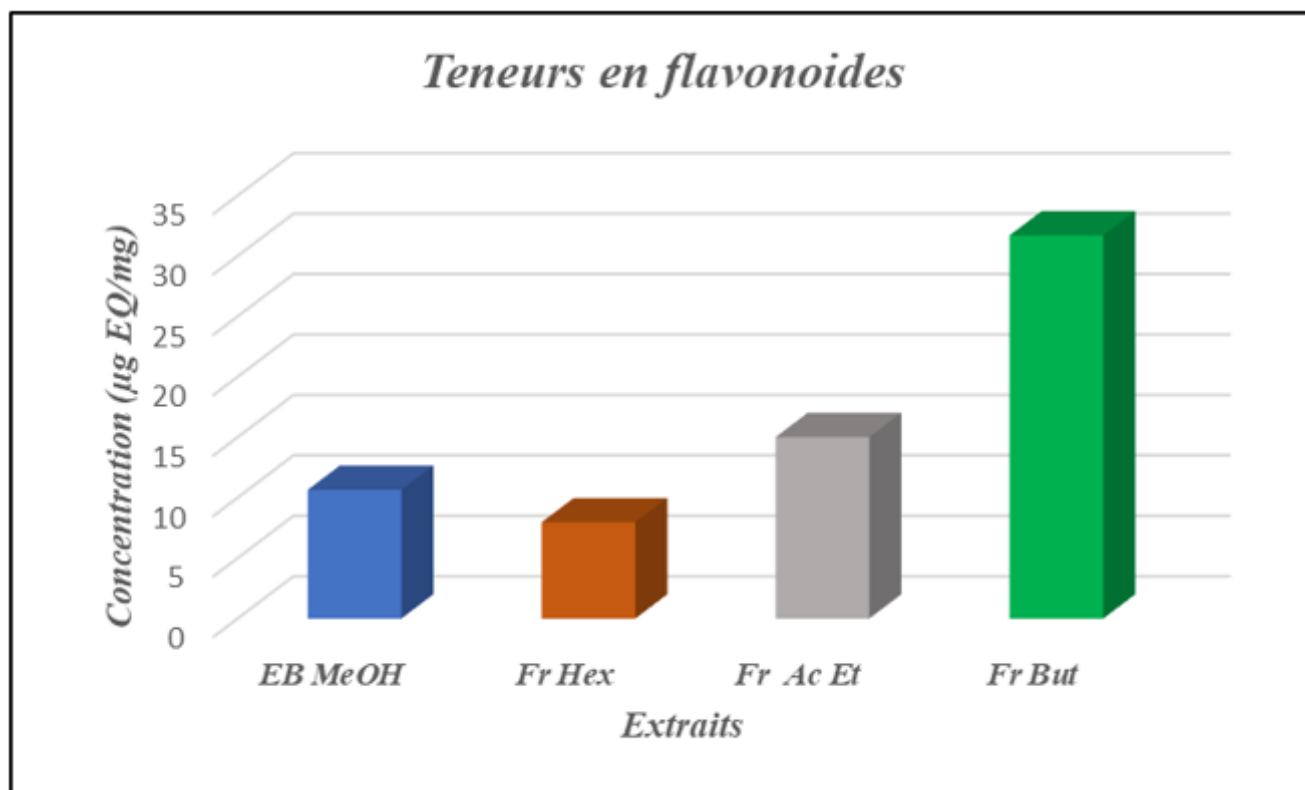


FIGURE II.3 – Teneurs en flavonoïdes dans les différents extraits

L'analyse quantitative des flavonoïdes par la méthode au trichlorure d'aluminium révèle des teneurs significativement plus élevées dans les fractions butanolique ( $31,71 \pm 2,11$  µg EQ/mg) et acétate d'éthyle ( $15,02 \pm 1,89$  µg EQ/mg) par rapport à l'extrait méthanolique brut ( $10,65 \pm 1,01$  µg EQ/mg) et à la fraction hexanique ( $7,97 \pm 0,7$  µg EQ/mg). Cette différence s'explique

par la polarité des solvants : le butanol et l'acétate d'éthyle, de polarité intermédiaire, extraient efficacement les flavonoïdes (majoritairement des hétérosides polaires comme la rutine), tandis que l'hexane, apolaire, favorise l'extraction de composés lipophiles.

Ces résultats sont en accord avec la littérature : **Alla *et al.* (2025)** rapportent des concentrations similaires (25–40 µg EQ/mg) pour le butanol chez *Z. lotus* tandis que **Belhouala *et al.* (2016)** observent des teneurs comparables (25–30 µg EQ/mg) dans l'extrait méthanolique. En revanche, d'autres espèces du genre *Ziziphus* présentent des teneurs inférieures (*Z. spina-christi* : 0,45–2,29 mg/g; *Z. mauritiana* :  $0,74 \pm 0,03$  mg EQ/g), reflétant des variations génétiques, environnementales et méthodologiques.

Les études LC-MS confirment la présence de flavonoïdes majeurs comme la rutine (1,3–3,0 µg/mL chez *Z. spina-christi*), tandis que les travaux de **Boukeloua *et al.* (2012)** soulignent l'affinité des hétérosides pour les solvants polaires. Enfin, les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes des extraits riches en flavonoïdes (**Kchaou *et al.*, 2023**) suggèrent un potentiel thérapeutique prometteur pour la fraction butanolique de *Z. lotus*.

## II.3 Étude in vitro des activités biologiques de *Ziziphus lotus* L.

### II.3.1 Évaluation de l'activité anti-oxydante (Test scavenger du radical libre DPPH)

L'activité antioxydante des extraits de *Ziziphus lotus* L. a été évaluée à l'aide de la méthode du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Cette approche spectrophotométrique repose sur la capacité des composés antioxydants à neutraliser le radical DPPH• par transfert d'un atome d'hydrogène, entraînant une réduction du radical et un changement de couleur visible de la solution, qui passe du violet intense au jaune pâle (Annexe 9). L'intensité de la décoloration est proportionnelle à la concentration en composés antioxydants dans l'extrait. L'activité antioxydante est généralement exprimée en pourcentage d'inhibition du DPPH (Fig.12).

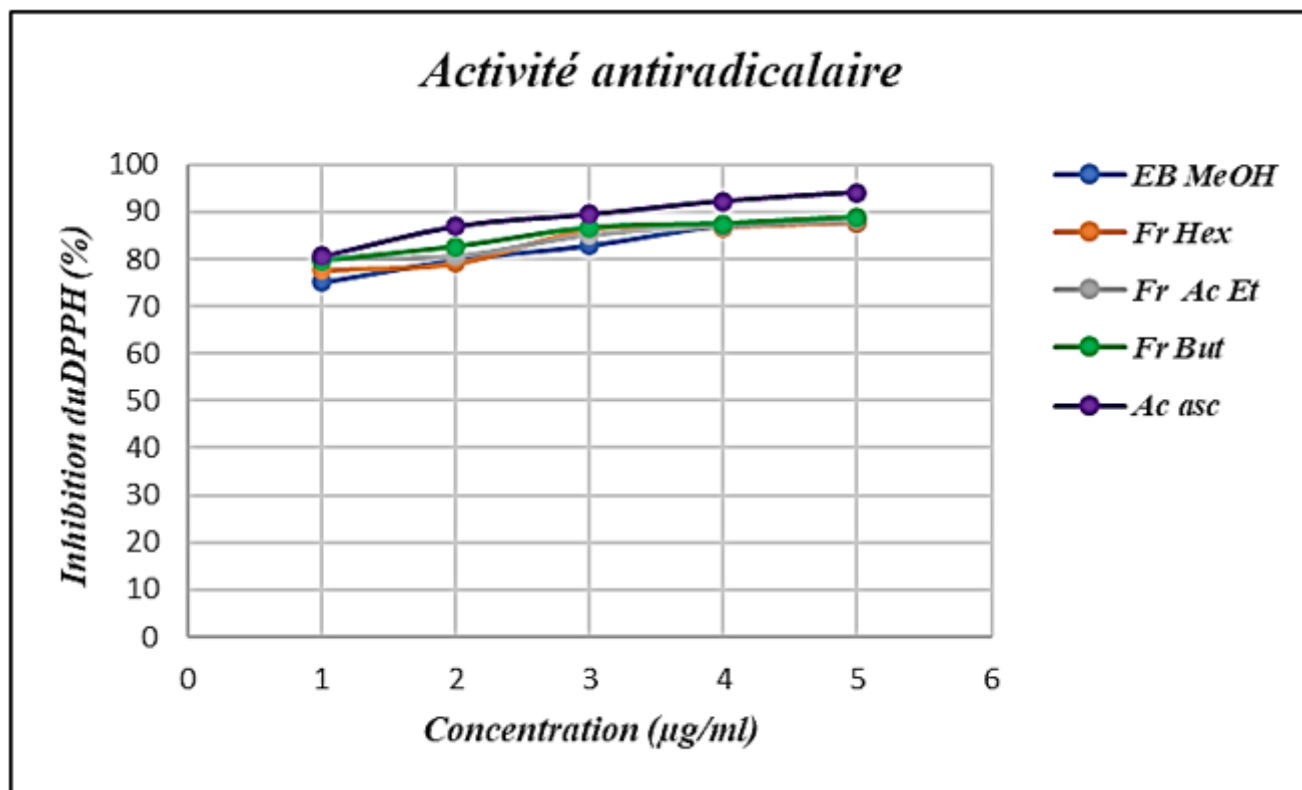


FIGURE II.4 – Courbe présentant le pourcentage d’inhibition du radical DPPH en fonction des concentrations des extraits

Les extraits de *Ziziphus* démontrent une activité antioxydante significative, corrélée à leur teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes, identifiés comme les principaux contributeurs à cette activité ( **Gao et al., 2013** ; **Ghazouani et al., 2020**). Dans cette étude, les extraits (*Fr But*, *EB MeOH*, *Fr Ac Et* et *Fr Hex*) présentent des pourcentages d’inhibition du DPPH remarquables (75,11–88,88 %), surpassant les valeurs rapportées précédemment pour *Z. mauritiana*, *Z. nummularia* (**Dureja et al., 2013**), et *Z. jujuba* (**Rashidi et al., 2017**). L’efficacité supérieure des extraits méthanoliques (*EB MeOH*) s’explique par leur capacité à solubiliser optimalement les composés phénoliques, comme le confirment **Khanam et al. (2025)**. Une relation dose-dépendante a été observée, cohérente avec les données existantes (**Bagheri et al., 2021**), tandis que les variations génotypiques et environnementales (**Choi et al., 2012** ; **Ahmad et al., 2021**) pourraient justifier les performances exceptionnelles des extraits analysés. Par ailleurs, le stade de maturation des fruits (**Chen et al., 2022**) et la présence de saponines, bien que moins étudiées, pourraient moduler l’activité antioxydante. Ces résultats soulignent l’importance des méthodes d’extraction, de l’origine géographique et des facteurs biochimiques dans l’évaluation du potentiel antioxydant des espèces de *Ziziphus*. (Annexe 8)

## II.3.2 Evaluation de l'activité anti inflammatoire

### II.3.2.1 Evaluation de l'activité anti hémolytique

L'extrait de *Ziziphus lotus* L., utilisé en médecine traditionnelle, a été évalué pour son activité anti-hémolytique sur des érythrocytes humains en milieu PBS. Des tests comparatifs avec un témoin négatif (NaCl 5 %) et un témoin positif (médicament de référence) ont révélé une activité dose-dépendante, illustrée dans la (figure 13) associée.

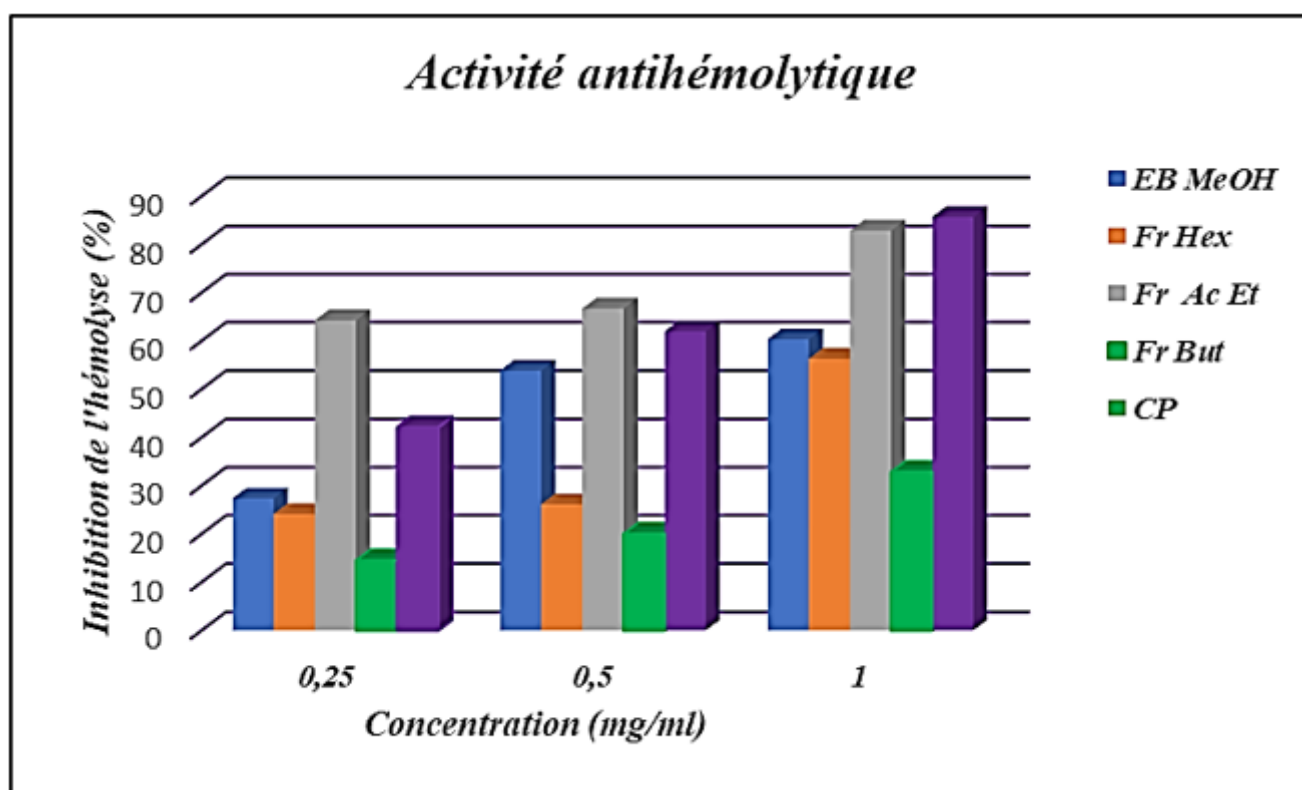


FIGURE II.5 – Évolution de l'effet anti hémolytique des extraits de *Ziziphus lotus* L. en fonction de leurs concentrations, comparée à celle du contrôle positif.

Les extraits de *Ziziphus* présentent une activité anti-hémolytique dose-dépendante, avec une inhibition progressive de l'hémolyse de 0,25 à 1 mg/ml. L'*EB MeOH* montre l'effet le plus marqué (82-86 % d'inhibition à 1 mg/ml), suivi de la fraction acétate d'éthyle (*Fr Ac Et*, 66-67 %), tandis que les fractions butanolique (*Fr But*) et hexanique (*Fr Hex*) affichent des activités plus modérées mais significatives (Annexe 10). Cette variabilité reflète la composition chimique des fractions : les polyphénols, flavonoïdes et saponines, connus pour stabiliser les membranes érythrocytaires via des interactions avec les phospholipides et la neutralisation des radicaux libres, expliquent notam-

ment l'efficacité des extraits polaires (Khandelwal *et al.*, 2008 ; Ghazouani *et al.*, 2020). Les performances moindres des *Fr Hex* et *Fr But* pourraient découler de leur affinité limitée pour les membranes, liée à leur nature lipophile ou semi-polaire (Cos *et al.*, 2006).

Ces résultats s'inscrivent dans la lignée d'études similaires, comme celles sur *Bruguiera gymnorhiza* ou les tanins hydrolysables, confirmant le rôle clé des composés phénoliques dans la protection membranaire (Rahman *et al.*, 2020 ; Delehanty *et al.*, 2020). Par ailleurs, la corrélation entre activité anti-hémolytique et potentiel anti-inflammatoire, démontrée in vivo pour *Ziziphus mauritiana* (Singh *et al.*, 2022), valide l'utilisation de ce test comme outil de screening préliminaire. L'influence déterminante du solvant d'extraction sur l'activité souligne l'importance d'optimiser les protocoles pour cibler les métabolites d'intérêt (Daneshmand *et al.*, 2013). (Annexe 9)

### II.3.2.2 Test de la dénaturation du Sérum Albumin Bovin

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro des extraits de *Ziziphus lotus* L., réalisée en mesurant les pourcentages d'inhibition de la dénaturation thermique du SAB (Fig.14).

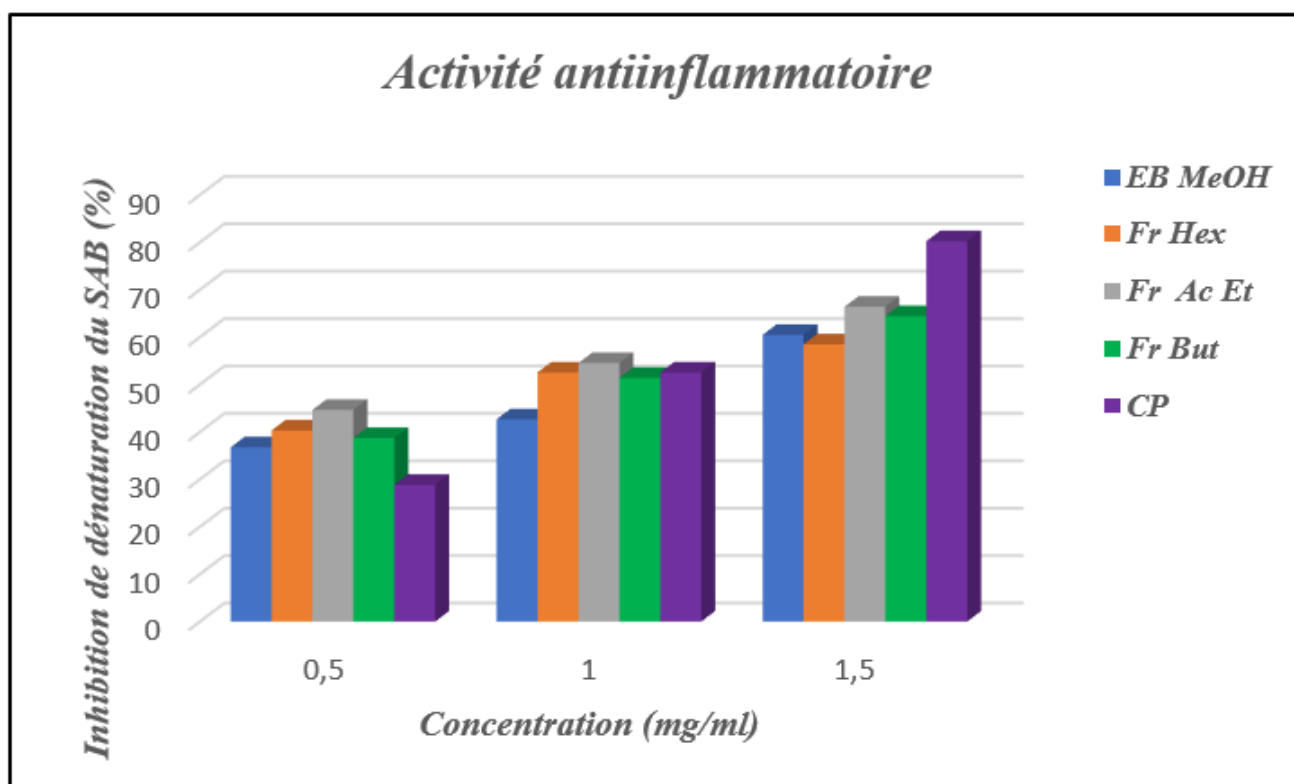


FIGURE II.6 – Effet des extraits, et de diclofénac sur la dénaturation de SAB

Les extraits de *Ziziphus* (*EB MeOH*, *Fr Hex*, *Fr Ac Et*, *Fr But*) exhibent une activité anti-

inflammatoire significative et dose-dépendante, avec des taux d'inhibition de la dénaturation protéique variant entre 28,85 % et 80,23%, en fonction de la concentration (0,5–1,5 mg/mL) et du type d'extrait. Cette activité a été évaluée via le test d'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA), une méthode validée pour le criblage de composés anti-inflammatoires (**Williams et al., 2008**). Le contrôle positif (diclofénac, 1,5 mg/mL) a confirmé la fiabilité du protocole avec une inhibition maximale de 80,23 %, servant de référence pour évaluer l'efficacité relative des extraits.

L'activité anti-inflammatoire observée est attribuable à la richesse phytochimique de *Ziziphus mauritiana*, notamment en terpénoïdes, flavonoïdes, acides phénoliques,  $\alpha$ -tocophérol,  $\beta$ -carotène et polysaccharides, comme l'ont démontré **Sakna et al. (2023)**. Ces composés agissent en synergie pour moduler les voies inflammatoires, une hypothèse corroborée par les travaux de **Raish et al. (2023)**, qui ont confirmé les propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques des extraits foliaires dans des modèles animaux. Une analyse phytochimique approfondie a également révélé la présence d'alcaloïdes, glycosides cardiaques, saponines, tanins et flavonoïdes (**Goyal et al., 2017**), connus pour leurs effets anti-inflammatoires et antioxydants.

L'influence du solvant d'extraction sur le profil phytochimique a été clairement établie : l'extrait méthanolique (*EB MeOH*) favorise l'extraction des composés polaires (flavonoïdes, tanins), tandis que les fractions hexanique (*Fr Hex*) et acétate d'éthyle (*Fr Ac Et*) isolent des métabolites moins polaires (triterpènes, saponines) (**Ghedira et al., 2013**). Cette sélectivité explique les variations d'activité entre les extraits.

La relation dose-réponse observée (augmentation de l'inhibition avec la concentration) est caractéristique des extraits végétaux bioactifs et confirme un mécanisme d'action concentration-dépendant. Ces résultats concordent avec ceux de **Saeed et al. (2023)**, qui ont rapporté une inhibition optimale de 44,03 % à 500  $\mu$ g/ml pour des extraits de fruits de *Ziziphus*.

### II.3.3 Évaluation de l'activité anti bactérienne

L'évaluation antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque, dans le but de tester l'effet de nos extraits du Sidr sur neuf souches de référence, dont trois ont été sensibles. L'activité a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait vis-à-vis des germes testés après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37 °C.

Les résultats de l'antibiogramme effectué sont représentés dans le tableau II.4 et la figure II.6

TABLE II.4 – Résultats de diamètres des zones d’inhibition de croissance bactérienne

Bactéries testées	Les extraits	Diamètre de la zone d’inhibition (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fr Ac Et	R1 : 15mm , R2 : 17mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fr Ac Et	R1 : 12mm , R2 : 8mm
<i>Bacillus subtilis</i>	Fr But	R1 : 9mm

La souche ayant un diamètre  $D < 8$  mm,  $9 \leq D \leq 14$  mm,  $15 \leq D \leq 19$  mm,  $D > 20$  mm est considérée respectivement comme souche résistante (-), sensible (+), très sensible (++) , extrêmement sensible (+++).

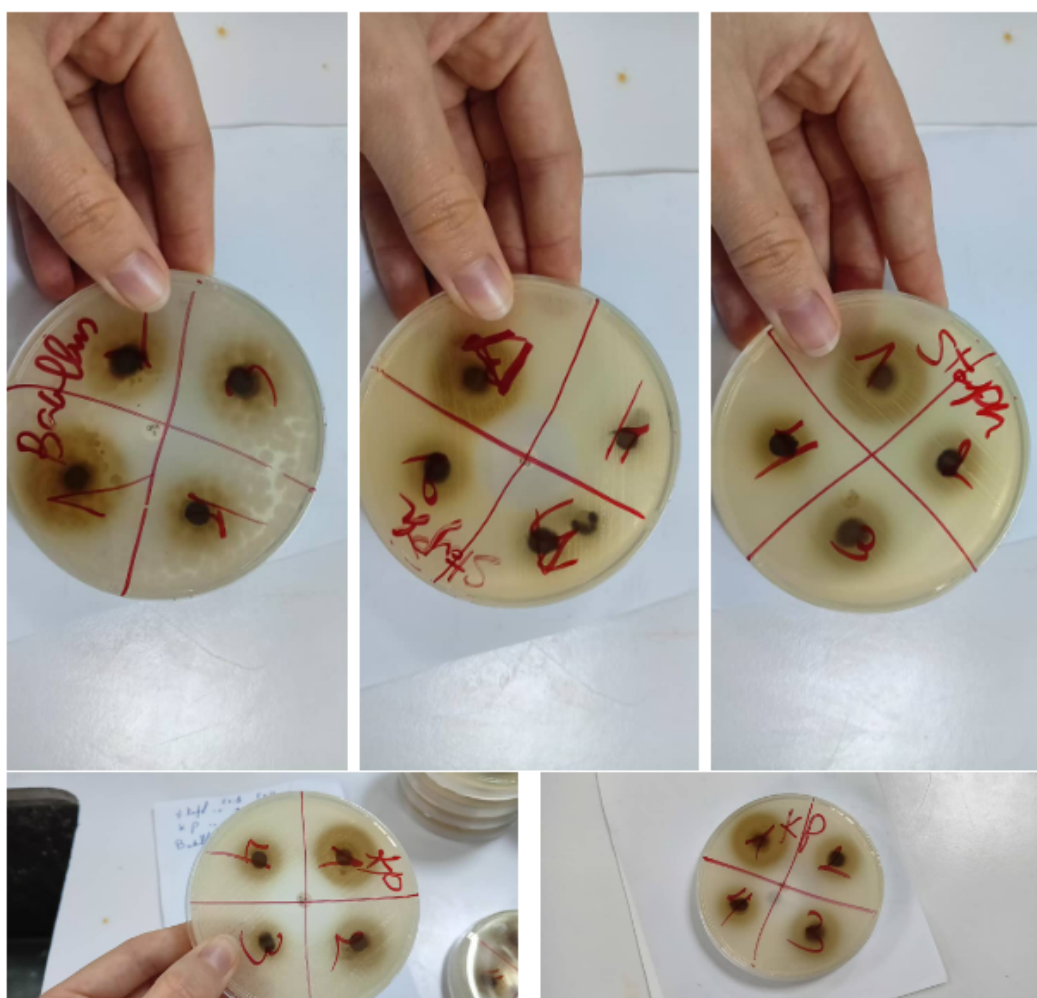


FIGURE II.7 – Photo d’antibiogramme des extraits sur *S. aureus* (a), *K. pneumoniae* (b), *B. subtilis*. (c)

Les essais réalisés révèlent que l’extrait à l’acétate d’éthyle (EAE) présente une activité anti-

bactérienne significative, avec des diamètres d'inhibition de 15 mm contre *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et 12 mm contre *Klebsiella pneumoniae* (Gram négatif). Ces valeurs s'alignent avec les données de **Benslama et al. (2017)**, qui rapportent une fourchette de 13–18 mm pour des extraits similaires de *Z. lotus*. Cette efficacité est attribuée à la présence abondante de flavonoïdes (rutine, quercétine) et de phénols simples (acide gentisique, acide gallique), connus pour leur capacité à perturber la membrane bactérienne et inhiber les enzymes clés comme la DNA gyrase. La sensibilité de *K. pneumoniae* (Gram négatif) est particulièrement notable, compte tenu de la barrière imposée par sa membrane externe lipopolysaccharidique.

Ce résultat corrobore les travaux de **Ben Yassine et al. (2020)**, qui démontrent que les terpénoïdes lipophiles (ex. lupéol) et les alcaloïdes isolés à partir d'EAE peuvent pénétrer cette paroi via des interactions hydrophobes, ciblant ensuite la synthèse peptidoglycanique.

L'extrait butanolique (BuOH), plus polaire, montre une inhibition réduite (9 mm contre *Bacillus subtilis*), suggérant une concentration moindre en métabolites actifs ou une moindre affinité pour les cibles bactériennes. Cette observation rejoint les conclusions de **Rais et al. (2019)**, qui identifient dans les fractions polaires des saponosides et des hétérosides cyanogénétiques, moins efficaces contre les Gram positifs que les composés semi-polaires. **Ben Yassine et al. (2022)** soulignent que les solvants de polarité intermédiaire (EAE, dichlorométhane) optimisent l'extraction des flavonoïdes acylés et des lignanes, aux activités synergiques.

Une extraction séquentielle permettrait de capturer la diversité des métabolites secondaires, comme proposé par **Alzahrani et al. (2023)** pour *Ziziphus spina-christi*. De plus, des études *in silico* (docking moléculaire) pourraient éclairer les interactions cibles-composés, notamment avec la topoisomérase IV chez *S. aureus*.

Ces résultats confirment que les feuilles de *Ziziphus lotus* constituent une source prometteuse d'agents antimicrobiens, surtout lorsque l'extraction privilégie des solvants de polarité intermédiaire comme l'acétate d'éthyle. La complémentarité observée entre les extraits semi-polaires et polaires suggère qu'une approche d'extraction séquentielle pourrait maximiser le spectre antibactérien, ouvrant la voie à l'isolement de principes actifs susceptibles d'être développés en thérapies naturelles.

## Conclusion et perspectives

Cette étude approfondie sur les extraits de *Ziziphus lotus* L. a permis de mettre en évidence leur richesse en composés bioactifs et leur potentiel thérapeutique significatif. Les résultats obtenus révèlent plusieurs points clés :

- Rendements d'extraction et composition phytochimique
  - Les extraits hydro-méthanoliques (*EB MeOH*) et butanoliques (*Fr But*) ont montré les rendements les plus élevés respectivement, indiquant une prédominance de composés polaires tels que les flavonoïdes, tanins et saponines.
  - Les tests phytochimiques ont confirmé la présence abondante de tanins, flavonoïdes et saponines, tandis que les alcaloïdes et terpénoïdes n'étaient présents qu'à l'état de traces.
- Analyses qualitatives et quantitatives
  - La chromatographie sur couche mince (CCM) a permis d'identifier des flavonoïdes glycosylés et aglycones.
  - Les dosages des polyphénols et flavonoïdes totaux ont révélé des concentrations élevées dans les extraits polaires, en particulier la fraction butanolique confirmant leur efficacité pour l'extraction de ces composés.
- Activités biologiques
  - Antioxydante : Les extraits ont démontré une activité antioxydante remarquable traduisant par une grande inhibition du DPPH, attribuée à leur teneur élevée en polyphénols et flavonoïdes.
  - Anti-inflammatoire : Les tests anti-hémolytiques et d'inhibition de la dénaturation de l'albumine bovine ont révélé une activité dose-dépendante, avec des performances notables pour l'extrait méthanolique. Ces effets sont liés à la présence de composés stabilisateurs de membranes et modulateurs des voies inflammatoires.
  - Antibactérienne : L'extrait à l'acétate d'éthyle (*Fr Ac Et*) a montré une activité significative contre *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*, suggérant un potentiel pour le développement d'agents antimicrobiens.

## Perspectives

## *Conclusion et perspectives*

1. Optimisation des procédés d'extraction : Explorer des méthodes d'extraction plus efficaces, telles que l'extraction assistée par ultrasons ou par micro-ondes, pour améliorer les rendements et la qualité des extraits.
2. Identification et isolement des principes actifs : Poursuivre les analyses chromatographiques (HPLC, LC-MS) pour isoler et caractériser les molécules responsables des activités biologiques, en vue de leur évaluation pharmacologique.
3. Études in vivo : Valider les effets thérapeutiques observés in vitro dans des modèles animaux pour confirmer l'efficacité et l'innocuité des extraits.
4. Développement d'applications thérapeutiques : Explorer la formulation de ces extraits dans des produits pharmaceutiques ou nutraceutiques, tels que des compléments alimentaires ou des topiques anti-inflammatoires.
5. Études mécanistiques : Approfondir les mécanismes d'action des composés bioactifs, notamment leur interaction avec les cibles moléculaires impliquées dans les voies inflammatoires et antioxydantes.

En conclusion, *Ziziphus lotus L.* se distingue comme une source prometteuse de composés bioactifs aux multiples activités biologiques, renforçant son intérêt pour la recherche en pharmacologie et en médecine naturelle.

# Références bibliographiques

- Abdel-Hameed, E. S., Salman, M. S., Fadl, M. A., & Elgindi, M. R. (2024). Phenolic profile of seedless *Ziziphus mauritiana* fruits and leaves extracts with in vivo antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*, 458, 140270.
- Adzu, B., Amos, S., Kapu, S. D., & Gamaniel, K. S. (2003). Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Sphaeranthus senegalensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2–3), 169–173.
- Ahmad, M., Qureshi, R., Arshad, M., Khan, M. A., & Zafar, M. (2021). Variations in morphological characters and antioxidant potential of different plant parts of four *Ziziphus* mill. species from the cholistan. *Scientific Reports*, 11, 23947. doi: 10.1038/s41598-021-03443-0
- Alla, C., Ali, A., Mehio, A., Salhi, Y., Bouanani, N., Legssyer, A., & Ziyat, A. (2025). Phytochemical composition of *Ziziphus lotus* (L.) lam and its impact on the metabolic syndrome : A review. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2025(1), 8276090.
- Al-Rimawi, F., Odeh, I., Bisher, A., Abbadi, J., & Qabbajeh, M. (2016). Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of three leaf extracts of *Ziziphus spina-christi* (sedr) grown in Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 9(1), 53–56.
- Al-Zahrani, S. S., & Al-Garni, S. M. (2023). Antifungal potentiality of mycogenic silver nanoparticles capped with chitosan produced by endophytic *Amesia atrobrunnea*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(9), 103746.
- Al-Zubairi, A. S., Al-Hammadi, M. A., Al-Kaf, N. J., Al-Habori, M., Al-Mahbashi, A. M., & Al-Ghazali, M. S. (2017). Phytochemical and antimicrobial studies of *Ziziphus spina-christi* L. leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(8), 142–150.
- Amara, M., Aubin, G., Caron, F., Cattoir, V., Dortet, L., Goutelle, S., ... Varon, E. (2022). *Recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie* (Vol. 1). Société Française de Microbiologie.
- Atanasov, A. G., Zotchev, S. B., Dirsch, V. M., & Supuran, C. T. (2021). Natural

- products in drug discovery : Advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(3), 200–216.
- Bagheri, G., Mirzaei, M., Mehrabi, R., & Shariatifar, N. (2021).** Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of extracts from the seed and pulp of jujube (*Ziziphus jujuba*) grown in iran. *Food Science & Nutrition*, 9(4), 1945–1954.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., ... van Wezel, G. P. (2023).** Antioxidant and anti-hemolytic properties of plant extracts : Evaluation of their protective effects on biological membranes. *Journal of Ethnopharmacology*, 302, 115872.
- Barka, S., Bouziane, A., Taïbi, K., Ait Abderrahim, L., & Mouttah, D. (2023).** Évaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits hydro-alcooliques de feuilles et d'écorce de *Rhamnus alaternus* contre la lyse induite par l'aaph sur les érythrocytes humains. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 3, Article 42.
- Belhouala, K., & Benarba, B. (2016).** Antioxidant activity and phytochemical screening of *Ziziphus lotus* l. extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 660–666.
- Benabderrahim, M. A., Yahia, Y., Nagaz, K., Jebali, I., & Ghrab, M. (2018).** Comparative study of phytochemical profile between *Ziziphus spina christi* and *Ziziphus lotus* from morocco. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2680–2690.
- Benaïssa, O., Amellal, H., Kebir, F. Z., Boukaabache, A., & Belyagoubi-Benhammou, N. (2024).** In vitro antioxidant and antibacterial activities of ethyl acetate extracts of *Ziziphus lotus* leaves and five associated endophytic fungi. *Microorganisms*, 12(12), 2671.
- Benaradj, A., Boucherit, H., & Mederbal, K. (2020).** Flore médicinale endémique et pratiques traditionnelles dans les steppes de l'est algérien. *Phytothérapie Méditerranéenne*, 8(1), 15–27.
- Bencheikh, N., Rahmani, A., Bensalah, W., Haddad, M., Saidi, A., & Mansouri, R. (2022).** Hplc-ms/ms profiling of phenolic compounds in *Ziziphus lotus* leaves and their pharmacodynamic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 285, 114857.
- Bendif, H., Miara, M., Harir, M., & Rebbas, K. (2018).** Ethnobotany of *Ziziphus lotus* fruits : nutritional and medicinal uses in eastern algeria. *Journal of Herbal Medicine*, 16, Article 100262.
- Benhassaini, H., & et al. (2022).** Caractérisation bioclimatique des écosystèmes semi-arides des aures (algérie). *Journal of Arid Environments*, 198, 104712.
- Benslama, A., Harrar, A., Gül, F., & Demirtaş, İ. (2017).** Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of *Ziziphus lotus* l. leaves extracts. *The Natural Products Journal*,

7(4), 1–7.

- Ben Yassine, Y., Essid, R., Khadraoui, N., Laamouri, A., & Hammi, K. M. (2022).** Antimicrobial, antioxidant and antileishmanial activities of *Ziziphus lotus* leaves. *Archives of Microbiology*, 204(1), 119.
- Benzahi, A., Harhar, H., & Bellakhdar, J. (2001).** Étude phytochimique de quelques plantes médicinales marocaines. *Acta Botanica Malacitana*, 26, 25–30.
- Benítez, G., & et al. (2018).** Ethnobotanical and phytochemical studies of *Ziziphus lotus*. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M. P., & Piatti, E. (2007).** Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*, 104(4), 1635–1642.
- Borgi, W., Recio, M. C., Ríos, J. L., & Chouchane, N. (2020).** Bioactive compounds, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from different plant parts of two *Ziziphus* mill. species. *PLoS ONE*, 15(5), e0232599.
- Boubakri, N. E. H., Boumediene, M., Cakmak, Y. S., Keskin, B., & Sonnet, P. (2022).** Phenolic extracts of *Zizyphus lotus* l. as alternatives to antibiotics : Antimicrobial effects on clinical multidrug-resistant pathogens. *European Journal of Biology*, 81(2), 163–183.
- Boukeloua, A., Chehma, A., & Abdeddaïm, M. (2012).** Biochemical and nutritional characterization of *Ziziphus lotus* fruits from northeastern algeria. *Annals of Food Science and Technology*, 13(2), 75–81.
- Boulanouar, B., & Abdelmoumen, M. (2004).** Les plantes fourragères dans les parcours steppiques. *Cahiers Agricultures*.
- Chen, Y., Zhang, H., Liu, R., Mats, L., Zhu, H., Pauls, K. P., ... Tsao, R. (2022).** Physicochemical and antioxidant activity of fruit harvested from eight jujube (*Ziziphus jujuba* mill.) cultivars at different development stages. *Scientific Reports*, 12, 2560.
- Choi, S. H., Ahn, J. B., Kozukue, N., Levin, C. E., & Friedman, M. (2011).** Distribution of free amino acids, flavonoids, total phenolics, and antioxidative activities of jujube (*Ziziphus jujuba*) fruits and seeds harvested from plants grown in korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6594–6604.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., vanden Berghe, D., & Maes, L. (2006).** Anti-infective potential of natural products : How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 290–302.
- Daneshmand, F., Zare-Zardini, H., Tolueinia, B., Hasani, Z., & Ghanbari, T. (2013).** Crude extract from *Ziziphus jujuba* fruits, a weapon against pediatric infectious disease.

*Iranian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 3(1), 216–221.

- Delehanty, J. B., Boeneman, K., Bradburne, C. E., Robertson, K., & Medintz, I. L. (2020).** Inhibition of interaction between *Staphylococcus aureus* -hemolysin and erythrocyte membranes by hydrolysable tannins : Structure-related activity study. *Scientific Reports*, 10, 11199.
- Djebli, N., Mohammad, M. R., Keskin, M., & Kolayli, S. (2021).** Anti-ulcerogenic and cytoprotective effects of saharian (sidr) honey from algeria. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 24(10), 1664–1670.
- Donrop, A. (2007).** The treatment of severe malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 633–634.
- Douaouya, L., Bouhalit, S., & Derouiche, F. (2022).** Évaluation in vitro du potentiel bioactif des fractions d'*Artemisia campestris* l. poussant à khenchela (algérie). *South Asian Journal of Experimental Biology*, 12(4), 445–455.
- Dureja, H., Kaushik, D., & Kumar, V. (2013).** Free radical scavenging potential and total phenolic and flavonoid content of *Ziziphus mauritiana* and *Ziziphus nummularia* fruit extracts. *International Journal of Green Pharmacy*, 7(4), 270–277.
- Edeoga, H. O., Okwu, D. E., & Mbaebie, B. O. (2005).** Phytochemical constituents of some nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 685–688.
- Ekiert, H., Szopa, A., Ekiert, R. J., & Klimek-Szczykutowicz, M. (2020).** Plant-based natural products for human health : A review. *Phytochemistry Reviews*, 19(6), 1237–1270.
- El Maaiden, E., Qarah, N., Ezzariai, A., Mazar, A., Nasser, B., Moustaid, K., ... El Kharrassi, Y. (2023).** Ultrasound-assisted extraction of isoquercetin from *Ephedra alata* (decne) : optimization using response surface methodology and in vitro bioactivities. *Antioxidants*, 12(3), 725.
- El Moussaoui, A., Benali, M., Haddadi, N., & Rahimi, S. (2023).** Alkaloid profiling and anti-acetylcholinesterase activity in *Ziziphus* species using maldi-tof and molecular docking. *Phytochemical Analysis*, 34(2), 145–156.
- Evans, E. A. (2009).** Alkaloids. In **Evans, W. C.** (Ed.), *Trease and evans' pharmacognosy* (16<sup>e</sup> éd., pp. 353–415). Elsevier Saunders.
- Faker, O. E., Bendar, S., Rais, S., & et al. (2022).** Phytochemical analysis of *Penorema canescens* jack leaf extracts. *Scientific African*, 18, e01395.
- Gao, Q. H., Wu, C. S., & Wang, M. (2013).** The jujube (*Ziziphus jujuba* mill.) fruit : A review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(14), 3351–3363.

- Gautam, R., & Jachak, S. M. (2009).** Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*, 29(5), 767–820.
- Ghalem, B. R., & Mohamed, B. (2008).** Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(10), 211–215.
- Ghazouani, N., Sifaoui, I., Bachrouch, O., Abderabba, M., Abderrabba, M., & Lorenzo, J. M. (2020).** Chemical composition and anti-acetylcholinesterase activity of *Ziziphus lotus* l. leaves. *Natural Product Research*, 34(5), 707–711.
- Ghedira, K., Goetz, P., & Le Jeune, R. (2013).** *Ziziphus* : propriétés pharmacologiques et utilisations thérapeutiques. *Phytothérapie*, 11(2), 95–102.
- Goyal, M., Nagori, B. P., & Sasmal, D. (2017).** Potential benefits of jujube (*Ziziphus lotus* l.) bioactive compounds for nutrition and health. *Nutrition Reviews*, 8(3), 145–158.
- Gulfraz, M., Zubair, M., & Shahid, M. (2011).** Evaluation of anti-inflammatory activity of *Cissampelos pareira* l. extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(3), 385–390.
- Hamad, M. N., Al-Khalifa, K. S., Salman, R. A., & Ibrahim, H. A. (2020).** Comparative analysis of polar and non-polar extracts from *Ziziphus* species : Yield and bioactive potential. *Phytochemistry Letters*, 35, 112–120.
- Heinrich, M., Mah, J., Amirkia, V., & Chung, G. (2021).** Plant-based natural products and new approaches in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 26(11), 2612–2621.
- Heo, H. J., Park, Y. J., Suh, Y. M., Choi, S. J., Kim, M. J., Cho, H. Y., ... et al. (2003).** Effects of oleamide on choline acetyltransferase and cognitive activities. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(6), 1284–1291.
- Kchaou, W., Abbès, F., Mansour, R. B., Blecker, C., Attia, H., & Besbes, S. (2023).** Ethnobotanical, phytochemical, toxicological, and pharmacological properties of *Ziziphus lotus* (l.) lam. : A comprehensive review. *Pharmaceuticals*, 16(4), 575.
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., & Fazly Bazzaz, B. S. (2023).** Review on plant antimicrobials : A mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 12(1), Article 118.
- Khanam, A., Hussain, A. I., Mohammed, E. H., Nahar, L., & Rathore, H. A. (2025).** Phenolic profile of seedless *Ziziphus mauritiana* fruits and leaves extracts with in vivo antioxidant and anti-inflammatory activities. *Chemistry & Biodiversity*, 22(1), e202401728.
- Khandelwal, S., Arya, A., Kapoor, N., Kapoor, A., & Kumar, A. (2008).** In vitro evaluation of anti-hemolytic and cytotoxic effects of traditional mexican medicinal plant extracts on human erythrocytes and cell cultures. *Life Sciences*, 14(9), 1176.

- Koffi N'Guessan, Beugré Kadja, Guédé N. Zirhi, Dossahoua Traoré, & Laurent Aké-Assi. (2009).** Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays krobou (agboville, côte d'ivoire). *Sciences & Nature*, 6(1), 1–15.
- Le Floc'h, É., Boulos, L., & Véla, E. (2010).** *Catalogue synonymique commenté de la flore de tunisie*. Banque Nationale de Gènes de la Tunisie.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008).** Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69, 1732–1738.
- Maataoui, B. S., Hmyene, A., & Hilali, S. (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 7(1), 3–8.
- Maisuthisakul, P., Pasuk, S., & Ritthiruangdej, P. (2008).** Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), 229–240.
- Mannino, G., Serio, G., Molino, C., Zaccara, S., Lauria, A., Gentile, C., & Berteà, C. M. (2022).** *Ziziphus lotus* (L.) Lam. as a source of health promoting products : Metabolomic profile, antioxidant and tyrosinase inhibitory activities. *Molecules*, 27(10), 3203.
- Medjahdi, A., Boudalia, S., & Khalil, I. (2021).** étude de la biodiversité et des écosystèmes végétaux dans les aures : implications pour la conservation. *Revue Algérienne de Biologie et Environnement*, 12(2), 45–58.
- Mellouk, K. (2013).** *étude des activités antioxydante et antimicrobienne des flavonoïdes et des fractions flavoniques de la partie aérienne de la pulpe d'olive Olea europaea L.* (Mémoire de magistère). Université d'Alger.
- Menaria, J., & Guha, P. (2018).** Phytochemical profiling of *Ziziphus mauritiana* Lam. leaves using HPTLC. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 9(2), 145–150.
- Miara, M. D., Bendif, H., Rebbas, K., Rabah, B., Hammou, M. A., & Maggi, F. (2019).** Medicinal plants and their traditional uses in the highland region of Bordj Bou Arreridj (northeast Algeria). *Journal of Herbal Medicine*, 16, Article 100262.
- Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
- Nabti, E. (2017).** Role of *Ziziphus lotus* in soil stabilization. *Arid Land Research and Management*.
- Rahman, M. A., Islam, M. S., Alam, M. B., Mathew, B., Lim, J. C., Baek, K. H.,**

- & Lee, S. H. (2020). Evaluation of antioxidant, anti-hemolytic, cytotoxic effects and anti-bacterial activity of selected mangrove plants (*Bruguiera gymnorrhiza* and *Heritiera littoralis*) in bangladesh. *Clinical Phytoscience*, 6, 8.
- Rais, C., Driouch, A., Slimani, C., Ziani, B. E., & Boukhebti, H. (2019). Antimicrobial and antioxidant activity of pulp extracts from three populations of *Ziziphus lotus* l. *Nutrition & Food Science*, 49(6), 1014–1028.
- Raish, M., Ahmad, A., Jan, B. L., & Alkharfy, K. M. (2023). Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of *Ziziphus mauritiana* lam leaves in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 289, 115–124.
- Rashidi, A. A., Khodaie, L., Hasan, M., & Mohammadi, S. (2017). Scavenging evaluation of different free radicals by three species of *Ziziphus* and their fractions. *Iranian Journal of Science*, 41(2), 351–359.
- Riaz, M. U., Raza, M. A., Saeed, A., Ahmed, M., & Hussain, T. (2021). Variations in morphological characters and antioxidant potential of different plant parts of four *Ziziphus* mill. species from the cholistan. *Plants*, 10(12), 2734.
- Romero, M. (2005). Effect of artemisinin-artesunate as inhibitors of hepatitis b virus production in an in vitro system. *Antiviral Research*, 68, 75–83.
- Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2023). Research advances in bioactive components and health benefits of jujube (*Ziziphus jujuba* mill.) fruit. *Food Science Reviews*, 15(7), 412–428.
- Sakna, S. T., Maghraby, Y. R., Abdelfattah, M. S., & Farag, M. A. (2023). Phytochemical diversity and pharmacological effects of triterpenes from genus *Ziziphus* : A comprehensive review. *Phytochemistry Reviews*, 22(6), 1611–1636.
- Sánchez-Rangel, J. C., & et al. (2016). The liebermann-burchard and salkowski assays for terpenoids and steroids. In *Methods in molecular biology* (Vol. 1405, pp. 177–185). Springer.
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (Eds.). (2012). *Methods in molecular biology : Natural products isolation* (Vol. 864). Springer.
- Singh, A., Kumar, S., Reddy, K. R., Kapoor, N., & Kaur, R. (2022). Evaluation of analgesic, anti-inflammatory, and antipyretic activities of *Ziziphus mauritiana* lam leaves in animal models. *Heliyon*, 8(11), e11300.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152–178).
- Smith, J., Doe, R., & Brown, T. (2020). Advanced techniques in liquid-liquid extraction for

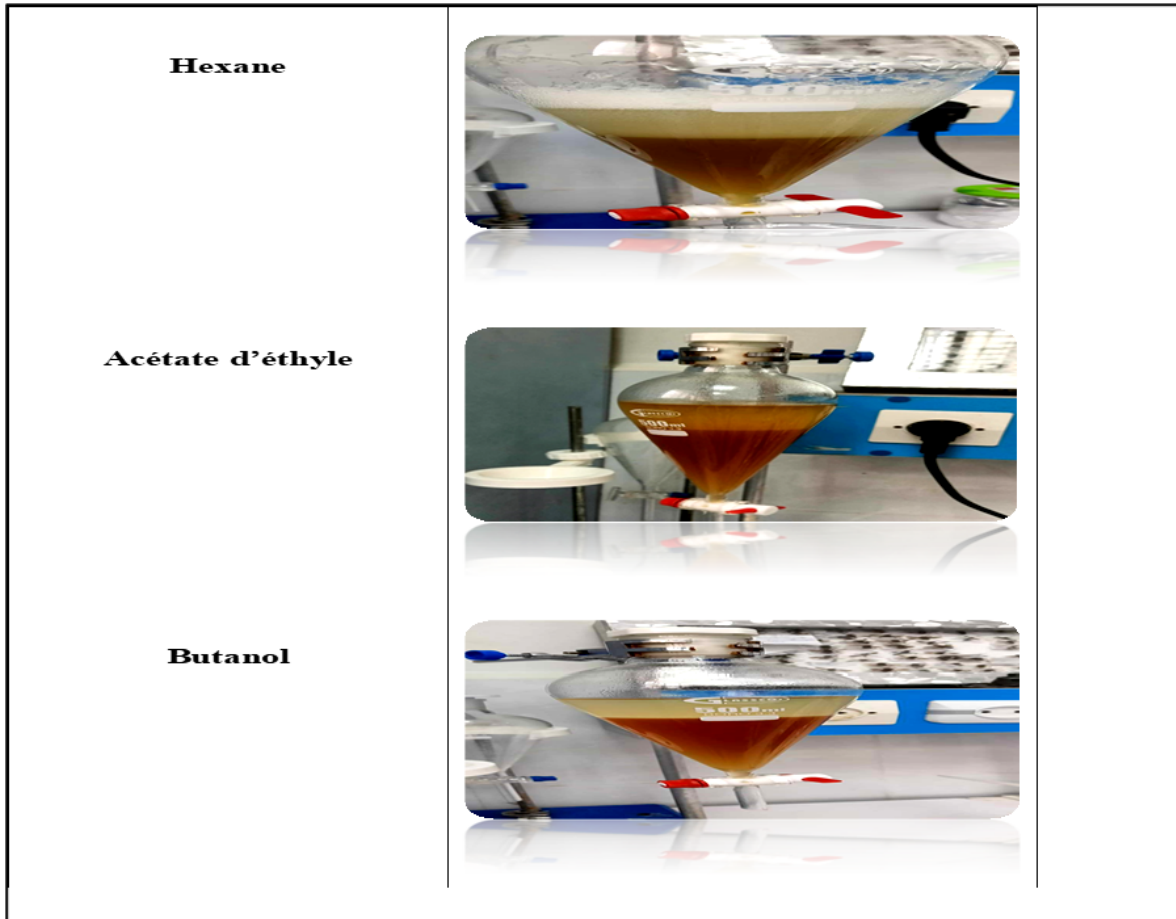
natural products isolation. *Journal of Chromatography*, 45(3), 210–225.

- Touaibia, M. (2024).** A review on phytopharmacological properties of five jujube species : *Ziziphus sativa*, *Z. mauritiana*, *Z. mucronata*, *Z. lotus* and *Z. spina christi* (rhamnacées). *Medires*, 3(1), 028.
- Vuorela, S., Salminen, H., Mäkelä, M., Kivikari, R., Karonen, M., & Heinonen, M. (2005).** Effect of plant phenolics on protein and lipid oxidation in cooked pork meat patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8492–8497.
- Wagner, H., & Bladt, S. (2001).** *Plant drug analysis : A thin layer chromatography atlas*. Springer.
- Williams, L. A., O’Connor, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J. A., ... Kraus, W. (2008).** The in vitro anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Medical Journal*, 57(4), 327–331.
- Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., & Chen, F. (2006).** A systematic survey of antioxidant activity of 30 chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97, 705–711.
- Yrjönen, T. (2004).** Thin-layer chromatography in the analysis of herbal products. In *Handbook of thin-layer chromatography* (3<sup>e</sup> éd., pp. 799–816). Marcel Dekker.
- Zeghad, N. (2009).** *Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d’intérêt économique (Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis) et évaluation de leur activité antibactérienne* (Mémoire de magistère en biotechnologie végétale). Université Mentouri-Constantine.

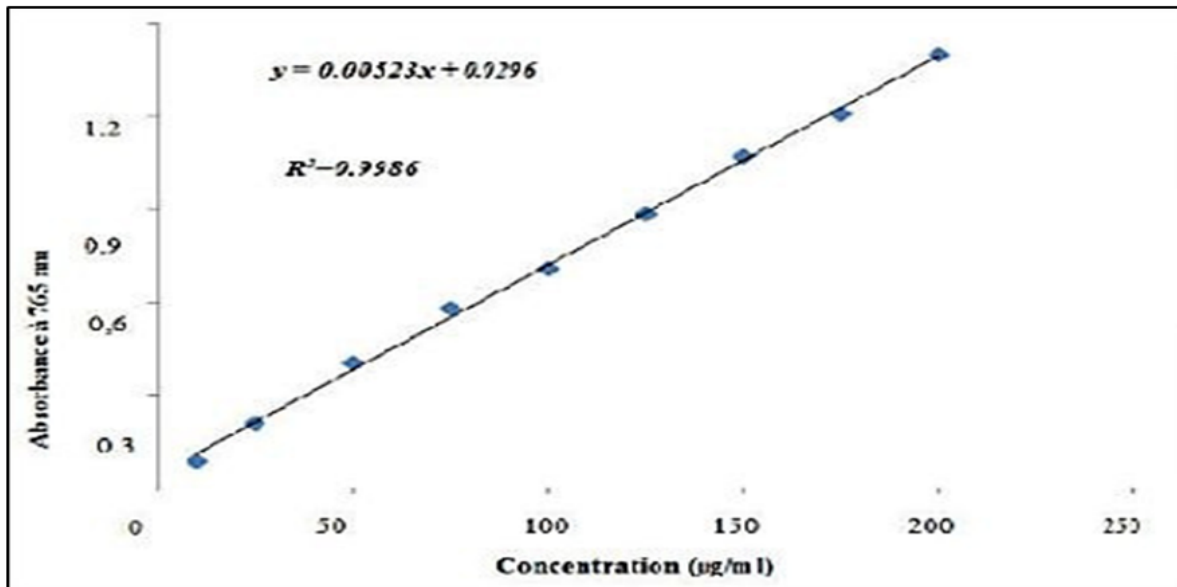
# Annexes



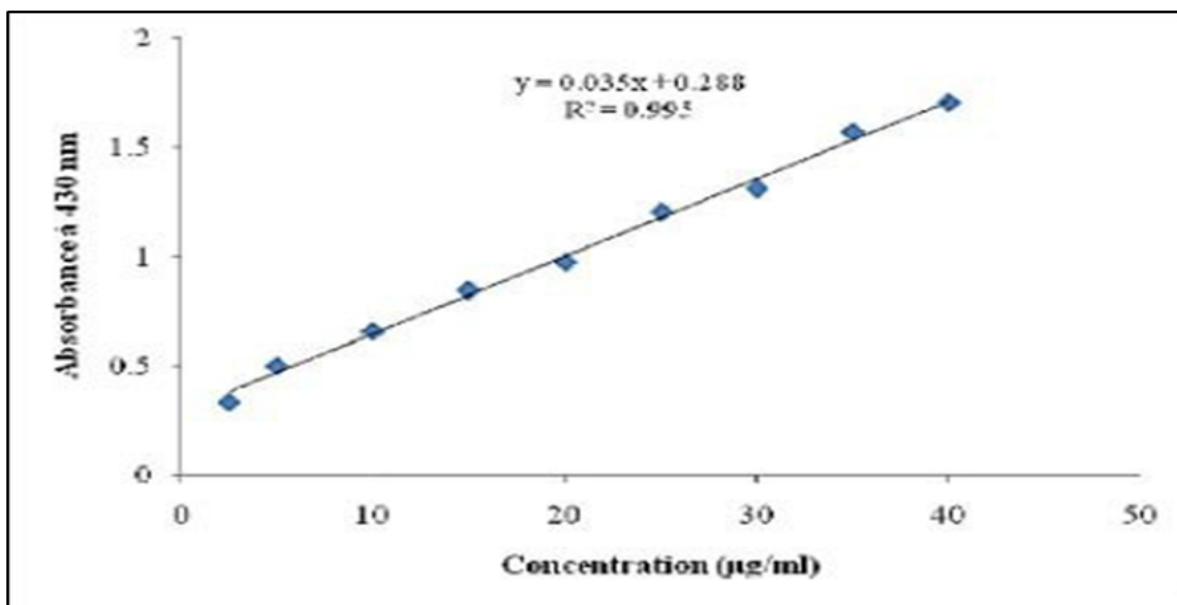
Annexe 01 : Photo du Rotavapeur utilisé pour sécher les extraits



Annexe 02 : Photo montrant l'extraction liquide-liquide



Annexe 03 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique



Annexe 04 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

## Annexe 5 : Préparation du tampon phosphate

Pour préparer 500 ml de tampon phosphate PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,2 M à pH 7,4, suivez cette procédure :

- **Composition du PBS 0,2 M (pH 7,4)**
  - NaCl : 8 g/L
  - KCl : 0,2 g/L
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (phosphate disodique) : 1,44 g/L (ou Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O : 1,78 g/L)
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (phosphate monopotassique) : 0,24 g/L
  
- **Préparation de la solution mère PBS 0,2 M**
  - NaCl : 4 g
  - KCl : 0,1 g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhydre) : 0,72 g (ou Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O : 0,89 g)
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,12 g
  
- **Étapes**
  1. Dissoudre les composants dans 400 ml d'eau distillée (ou eau ultrapure).
  2. Ajuster le pH à 7,4 avec HCl 1 M ou NaOH 1 M
  3. Compléter à 500 ml avec de l'eau distillée.
  4. Vérifier le pH au pH-mètre et ajuster si nécessaire.
  5. Filtrer sur membrane 0,22 µm pour stérilisation (si nécessaire).

## Annexe 6 : Préparation de Mc Ferland

La solution Mc Farland 0.5 est un étalon de turbidité utilisé en microbiologie pour standardiser la concentration bactérienne dans les suspensions d'inoculum. Elle permet d'estimer approximativement le nombre de bactéries présentes et d'assurer des conditions reproductibles pour les tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogrammes) ou d'autres analyses.

Caractéristiques de la solution Mc Farland 0.5 :

- Turbidité : Correspond à une densité optique d'environ 0,08 à 0,1 (à 600 nm).

- Concentration bactérienne approximative :  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (Unités Formant Colonies par millilitre).
- • Composition : Généralement préparée avec 1% de sulfate de baryum ( $\text{BaSO}_4$ ) et 1% d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

## **Annexe 7 : Préparation de gélose de Mueller-Hinton**

La gélose de Mueller-Hinton est un milieu de culture largement utilisé en microbiologie, particulièrement pour les tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogrammes).

Composition :

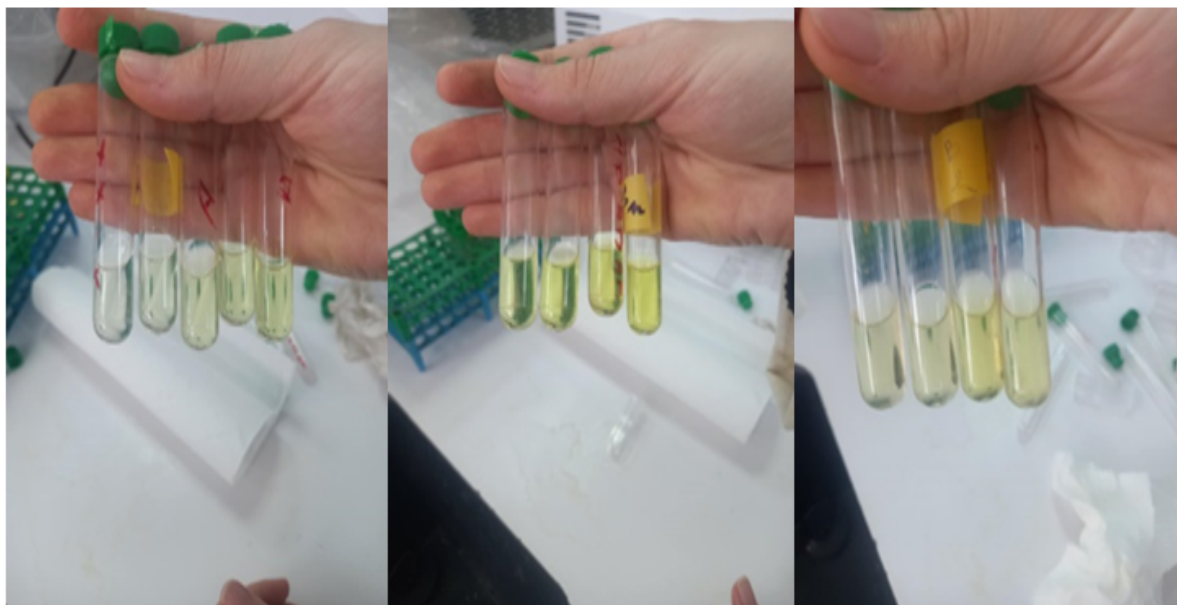
- Extrait de viande de bœuf et de caséine : Fournit des acides aminés et des peptides.
- Amidon : Absorbe les toxines bactériennes qui pourraient fausser les résultats.
- Gélose : Agent solidifiant.
- pH ajusté à  $7,3 \pm 0,1$  : Optimal pour la croissance bactérienne.

Pour la préparation de la gélose de Muller Hinton, on a besoin de 38g de la poudre du Muller Hinton Agar. Les étapes de préparation sont :

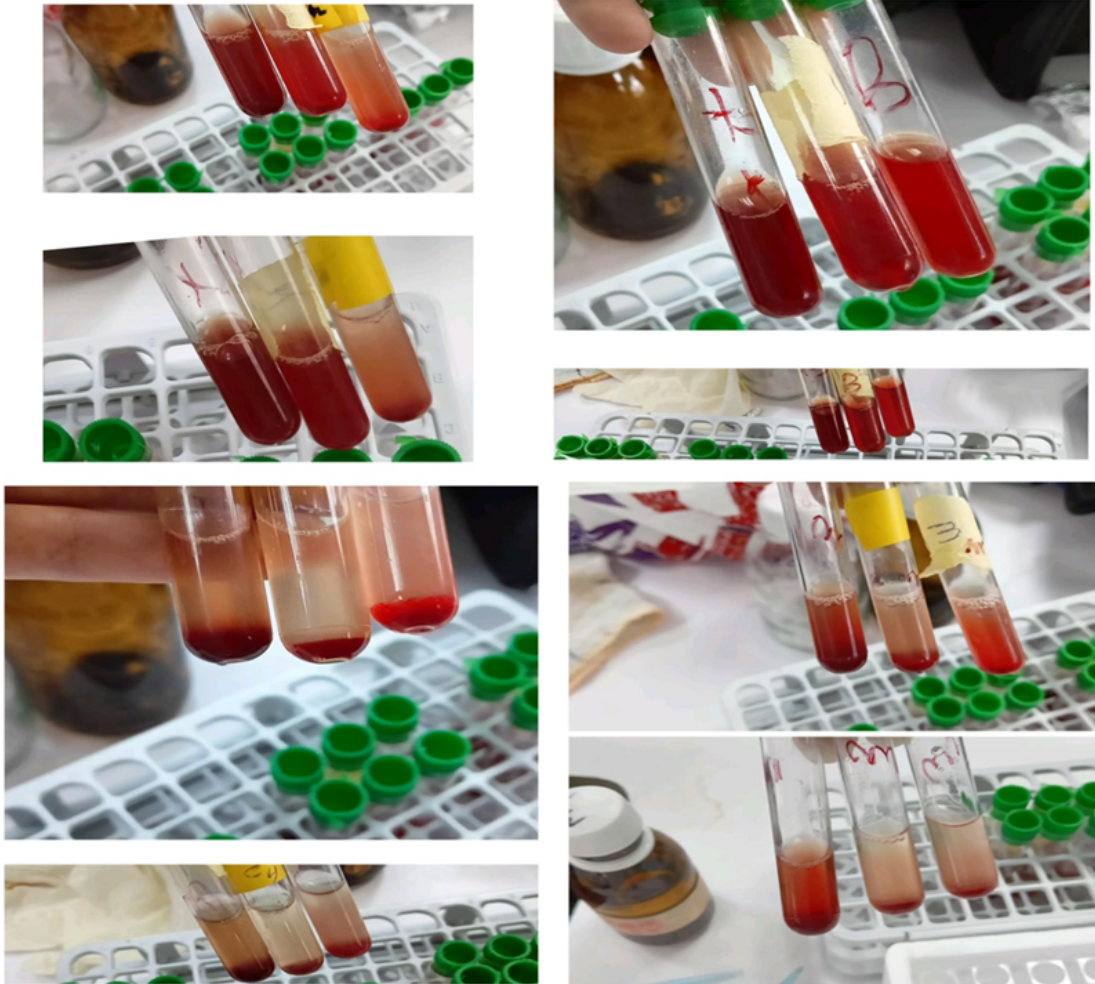
- Dans un bécher, en dissolvant la poudre dans un litre de l'eau distillée, il faut l'homogénéiser et chauffer en agitant .
- Porter à ébullition environ une minute
- Mettre dans des flacons en verre bien fermés pour le stériliser à l'autoclave pendant 15min à  $121,1^\circ\text{C}$ . Pour l'utiliser, laisser refroidir, puis le couler dans des boites de pétri (25ml par boite) dans un milieu stérile et laisser reposer. Ils sont prêts à l'utilisation immédiatement ou stocker à  $2^\circ\text{C}$  à  $8^\circ\text{C}$  pendant une semaine au plus.



Annexe 08 : Résultats du dosage des polyphénols



**Annexe 09** : Résultats de l'activité anti oxydante (Test du DPPH)



Annexe 10 : Résultats de l'activité anti hémolytique

<p><b>Nom et prénom :</b>  GASMI Dounia  AHNECHE Loubna</p>	<p><b>Date de soutenance :</b>  18/06/2025</p>
<p><b>Master Académique en :</b> Biochimie Appliquée</p>	
<p><b>Étude des propriétés bioactives des extraits de <i>Ziziphus lotus L.</i> :  caractérisation phytochimique et potentiel thérapeutique</b></p>	
<p style="text-align: center;"><b><u>Résumé :</u></b></p> <p>Cette étude explore le potentiel phytochimique et pharmacologique des extraits de feuilles de <i>Ziziphus lotus L.</i>, une plante médicinale traditionnelle, obtenus par macération hydrométhanolique et fractionnement liquide-liquide. Les analyses ont révélé que les extraits polaires (méthanolique : 37,09 % ; butanolique : 17,92 %) présentaient les rendements les plus élevés, reflétant une richesse en composés polaires comme les flavonoïdes et les tanins. Les tests qualitatifs ont confirmé la présence abondante de ces composés ainsi que des saponines, alors que les alcaloïdes et terpénoïdes n'étaient présents qu'à l'état de traces. Quantitativement, les extraits butanolique et méthanolique ont montré les concentrations les plus élevées en polyphénols (245,58 µg EAG/mg) et en flavonoïdes (31,71 µg EQ/mg). Sur le plan biologique, ces extraits ont démontré une activité antioxydante marquée (inhibition du DPPH : 75,11-88,88 %), des propriétés anti-inflammatoires significatives (réduction de 86 % de l'hémolyse hypotonique et inhibition de 80,23 % de la dénaturation thermique des protéines). Ils ont également montré une activité antibactérienne notable contre <i>Staphylococcus aureus</i> (15 mm) et <i>Klebsiella pneumoniae</i> (12 mm). Ces résultats soulignent le potentiel thérapeutique de <i>Z. lotus</i>, attribuable à sa richesse en composés phénoliques, et confirment l'efficacité des solvants polaires et de polarité intermédiaire pour l'extraction optimale des métabolites bioactifs.</p>	
<p><b>Mots-clés :</b> <i>Ziziphus lotus</i>, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne.</p>	