



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministre de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHAROUR - KHENCHELA-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE VIE

DEPARTEMENT : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

FILIERE : Sciences Biologiques

OPTION : Biochimie Appliquée

Thème

**Investigation phytochimique et étude –in vitro-
de l'activité antioxydante des extraits de
feuilles de *Ziziphus lotus* (L) Desf. de la wilaya
de Khenchela**

Présenté par :

KAFFALI Assia & HARRATH Khaoula

Jury de soutenance :

Président : **ZERAIB Azzeddine**

MCB.Univ. Abbès Laghrour - Khenchela

Encadreur: **BOUHALIT Samira**

MAA. Univ.Abbès Laghrour - Khenchela

Examineur : **RAHAL Khaled**

MAA. Univ.Abbès Laghrour - Khenchela

Promotion : juin 2017

Le travail à été réalisé au laboratoire pédagogiques, Université de Khenchela .

DEDECACES

A la mémoire de mon père

A ma chère maman

Avec toute mon infinie reconnaissance

*A tous mes frères et sœurs, et une spéciale dédicace à
mon frère Abd Alaziz*

A toute ma famille

*A toutes mes amies surtout : Khaoula, Mina, Nawel
et Manel*

*Et une spéciale dédicace à Meriem mathazzem pour
son aide le long de ces années .*

A tous qui aime la science

Assia

DEDECACE

Je dédie ce modeste travail

A mes chères et respectueux parents (Hafsia & Nacer) que je remerciais éternellement pour leur amour et leur appui inconditionnel durant toutes ces années.

A tous mes frères et sœurs

Et une spéciale dédicace à mon frère Aïssam

A mes chères amies : Assia, Nawel, Mina, Manel, Assma, Hadhriya et Amira.

A toutes ceux et toutes celles qui m'ont encouragé et m'ont souhaité du bien de près ou de loin

Et témoignage de profonde affection

Sans oublier mes camarades de la promotion

2^{ème} année master biochimie appliquée (2016-2017)

Khaoula

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

En second lieu, Nous tenons de remercier les membres du jury pour avoir accepté l'évaluation de ce travail et tout particulièrement le président de jury Dr. ZERAIBE Azzedine, Maître de conférence classe B, qui m'a fait un grand bonheur de présider le jury, et l'examineur Mr. RAHAL Khaled, Maître assistant classe A, pour accepter d'examiner ce modeste travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre encadreur de mémoire M. BOUHALIT Samira pour ses précieux conseils, son aide et son suivi tout au long de ce travail. Merci pour votre disponibilité à tout moment, votre compréhension et votre gentillesse.

Nous adressons notre profond remerciement aussi à M. KARA ALI W. et Mr. BOUAZZA I.

Nous remercions précisément nos très chères familles qui ont le droit de recevoir nos chaleureux remerciements pour le courage et le sacrifice qu'ils ont consentis pendant la durée de nos études

Enfin, nos plus sincères remerciements vont aussi à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours soutenus et encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à toute personne qui nous a aidés de loin ou de près.

Assia & Khaoula

Résumé :

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits préparés à partir des feuilles du *Ziziphus lotus* L., L'analyse qualitative de ces extraits par CCM a révélé la présence des flavonoïdes dans différents extraits, ce qui est confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des composés phénoliques, des flavonoïdes dont les extraits ACE, CH et AQ2 sont les plus riches en ces molécules, où la teneur en composés phénoliques est 36.50 ± 0.26 EAG/mg d'extrait pour l'extrait ACE et 29.74 ± 0.20 EAG/mg d'extrait pour l'extrait CH et 31.14 ± 0.38 EAG/mg d'extrait pour l'extrait AQ2. Pour les flavonoïdes on trouve 4.83 ± 0.042 EQ/mg dans ACE, 0.96 ± 0.35 EQ/mg dans CH et 0.50 ± 0.021 EQ/mg dans AQ2.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de test du DPPH a montré que le pouvoir antioxydant des extraits ACE, CH et AQ2 est le plus élevé dont l'extrait ACE représente l'extrait le plus actif, avec une activité antioxydante IC_{50} de l'ordre de $203 \mu\text{g/ml}$. À partir de ces résultats, on peut dire que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits à pouvoir antioxydant puissant.

Mots clés : *Ziziphus lotus* L., activité antioxydante, composés phénoliques, flavonoïdes.

Abstract

Natural extracts from plants contain a variety of biologically active molecules. In this context, we have tried to evaluate the antioxidant activity of the various extracts prepared from the leaves of *Ziziphus lotus* L.. The qualitative analysis of these extracts by TLC revealed the presence of flavonoids in different extracts, this being confirmed by A quantitative analysis based on the assay, phenolic compounds, flavonoids whose ACE, CH and AQ2 extracts are the richest in these molecules, where the content of phenolic compounds is 36.50 ± 0.26 EAG/mg extract for the ACE extract, 29.74 ± 0.20 EAG/mg extract for the CH extract and 31.14 ± 0.38 et EAG/mg for AQ2. For flavonoids we find 4.83 ± 0.042 EQ/mg in ACE , 0.96 ± 0.35 EQ/mg in CH and 0.50 ± 0.021 EQ/mg in AQ2.

The study of antioxidant activity by the DPPH test method confirme that the antioxidant power of the ACE, CH and AQ2 extracts is the most important where ACE extract represents the most active extract, with an antioxidant activity IC₅₀ of 203µg/ml. From these results it can be said that the extracts richest in phenolic compounds are the extracts with a powerful antioxidant power.

Key words: *Ziziphus lotus* L., antioxidant activity, phenolic compounds, flavonoids.

الملخص

المستخلصات الطبيعية المشتقة من النباتات تحتوي على مجموعة متنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجيا. وفي هذا السياق حاولنا تقييم النشاط المضاد للأكسدة لمختلف المستخلصات المحضرة من أوراق لوتس السدر حيث كشف التحليل النوعي لهذه المستخلصات (TLC) احتوائها على الفلافونويدات، وهذا ما يؤكد التحليل الكمي على أساس الجرعة، للمركبات الفينولية و الفلافونويد حيث ان مستخلصات ACE، CH و AQ2 هي الأكثر غنى بهذه الجزيئات (محتوى المركبات الفينولية هو 0.26 ± 36.50 EAG / ملغ من مستخلص ل ACE و 0.20 ± 29.74 EAG / ملغ من مستخلص ل CH و 0.38 ± 31.14 EAG و 0.042 ± 4.83 EAG. اما الفلافونويدات 0.021 ± 0.50 EQ / ملغ في AQ2). 0.35 ± 0.96 EQ / ملغ في CH و 0.021 ± 0.50 EQ / ملغ في AQ2).

أظهرت الدراسة باستعمال طريقة DPPH أن القدرة المضادة للأكسدة للمستخلصات ACE، CH و AQ2 هي الأعلى حيث ان ACE هو المستخلص الأكثر نشاطا، وهذا النشاط مترجم بالجرعة المثبطة لخمسين بالمئة من اكسدة DPPH (IC50) تقدر ب $203 \mu\text{g} / \text{ml}$.

من هذه النتائج يمكننا القول أن المستخلصات الغنية بمركبات الفينول و الفلافونويد هي التي تمتاز بالنشاط المضاد للاكسدة الاقوى.

كلمات البحث: لوتس السدر, نشاط مضادات الأكسدة ,مركبات الفينول , مركبات الفلافونويد.

Table de matières

| | |
|---|----|
| Dédicaces | |
| Remerciements | |
| Résumé | |
| Table de matière | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Introduction | 01 |
| Synthèse bibliographique | |
| Chapitre 01 | |
| 1. Stress oxydatif..... | 03 |
| 1.1. Les radicaux libres..... | 03 |
| 1.1.1. Principaux radicaux libres et leurs origines..... | 04 |
| 1.2. Sources des EAO..... | 06 |
| 1.3. Les cibles biologiques des EAO..... | 08 |
| 1.4. Maladies liées aux stress oxydatif..... | 09 |
| 1.5 Le système de protection antioxydants..... | 10 |
| 1.5.1. Les antioxydant enzymatique (endogène)..... | 10 |
| 1.5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques..... | 12 |
| 1.5.2.1. Les antioxydants <i>non enzymatiques</i> endogènes..... | 12 |
| 1.5.2.2. Les antioxydants non enzymatiques exogènes..... | 14 |
| Chapitre 02 | |
| 2. <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 16 |
| 2.1 Généralité | 16 |
| 2.2. Description botanique | 16 |
| 2.4. Répartition géographique..... | 17 |
| 2.5. Composition biochimique..... | 18 |
| 2.6. Activité biologique et thérapeutique de <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 19 |
| 2.7. Toxicité | 19 |
| 2.8. Usages traditionnels du jujubier sauvage | 19 |

Chapitre 03

| | |
|---|----|
| 3. Métabolites secondaires..... | 21 |
| 3.1. Généralités..... | 21 |
| 3.2. Classification..... | 21 |
| 3.2.1. Les polyphénols..... | 21 |
| 3.2.2. Alcaloïdes..... | 25 |
| 3.2.3. Activité et intérêt pharmacologiques des alcaloïdes..... | 26 |
| 3.2.4. Terpénoïdes..... | 27 |

Partie expérimentale

Chapitre 01

| | |
|---|----|
| 1. Matériel | 29 |
| 1.1. Matériel végétal..... | 29 |
| 1.2. Réactifs chimiques et instrumentations..... | 29 |
| 2. Méthodes..... | 30 |
| 2.1. Détermination de la teneur en eau..... | 30 |
| 2.2. Préparation des extraits à partir des feuilles du <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 30 |
| 2.3. Screening phytochimiques..... | 33 |
| 2.4. Criblage phytochimiques par chromatographie sur couche mince (CCM)..... | 38 |
| 2.5. Etude quantitative..... | 39 |
| 2.5.1 Dosage des polyphénols totaux..... | 39 |
| 2.5.2. Détermination des flavonoïdes totaux..... | 40 |
| 2.5.3. Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode au DPPH..... | 41 |
| 2.6 Analyse statistique..... | 43 |

Chapitre 02

| | |
|--|----|
| 1. Résultat et discussion..... | 43 |
| 1.1. Détermination de la teneur en eau dans les feuilles du <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 43 |
| 1.2. Rendement d'extraction..... | 44 |
| 1.3. Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques | 45 |
| 1.3.1. Analyse qualitative..... | 45 |
| 1.3.1.1 Tests phytochimiques préliminaires..... | 45 |
| 1.3.1.2. Résultat du criblage par CCM..... | 48 |
| 1.3.2. Analyse quantitative (Polyphénols et flavonoïdes)..... | 50 |
| 1.4. Évaluation de l'activité antioxydante de DPPH..... | 53 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| Conclusion..... | 57 |
| Références bibliographiques | 59 |
| Annexe..... | |

Liste des abréviations

| | |
|-------------------------|--|
| $^1\text{O}^2$ | L'oxygène singlet |
| ACE | Extrait d'acétate d'éthyle |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| AQ1 | Extrait aqueux 1 |
| AQ2 | Extrait aqueux 2 |
| Cat | La catalase |
| CCM | Chromatographie sur couche mince |
| CH | Extrait chloroformique |
| DL50 | la dose létale pour 50% |
| DPPH | 1-1 diphényl 2 picryl hydrazyle |
| EAO | espèce activées d'oxygène |
| GPxs | Les glutathion peroxydases |
| GSH | le glutathion forme réduite |
| GSSG | le glutathion forme oxydée |
| H_2O_2 | Peroxyde d'Hydrogène |
| IC50 | concentration inhibitrice 50% de l'oxydation de DPPH |
| LOO° | Radical peroxyde |
| LOOH | Peroxyde lipidique. |
| MET | Extrait Méthanolique |
| n-BUT | Extrait de n-butanol |
| NO | Monoxyde d'azote |
| $\text{O}_2^{\bullet-}$ | Radical superoxyde |
| OH° | Radical hydroxyl |
| OMS | l'Organisation Mondiale de la Santé |
| ONOO⁻ | Peroxynitrite |
| Rf | Rapport frontal |
| RL | radical libre, radicaux libres |
| ROO° | radical peroxyde |

| | |
|-------------|---------------------------|
| SH | groupement sulhydrile |
| SOD | Le superoxyde dismutase |
| TrxR | la thiorédoxine réductase |
| UV | ultra violet |
| Vis | visible |

Liste des figures

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figure 1 | Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie | 06 |
| Figure 2 | Les principales sources des EAO..... | 07 |
| Figure 3 | Différentes catégories de lésions de l'ADN..... | 08 |
| Figure 4 | Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques | 13 |
| Figure 5 | Aire de répartition du <i>Ziziphus lotus</i> L. en Algérie | 17 |
| Figure 6 | Feuilles, fruite et arbrisseau de <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 18 |
| Figure 7 | Les principales types des flavonoïdes | 22 |
| Figure 8 | Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (la quercétine)... | 23 |
| Figure 9 | Structure des tanins hydrolysables et les acides associés | 24 |
| Figure 10 | Feuilles de <i>Ziziphus lotus</i> L. sèches..... | 29 |
| Figure 11 | Les différentes étapes de macération et d'extraction liquide-liquide de la poudre de feuilles de <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 32 |
| Figure 12 | Schéma des tests phytochimiques réalisés par l'infusé 5%..... | 36 |
| Figure 13 | Schéma des tests phytochimiques..... | 37 |
| Figure 14 | Schéma qui représente le protocole de dosage des polyphénols..... | 40 |
| Figure 15 | Schéma qui représente le protocole de dosage des flavonoïdes..... | 41 |
| Figure 16 | le pourcentage de rendement des extraits de <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 45 |
| Figure 17 | Plaque de la chromatographie sur couche mince des extraits des feuilles de après révélation par $AlCl_3$ (sous UV à 365)..... | 48 |
| Figure 18 | Teneur en polyphénols totaux pour les différents extraits des feuilles de <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 52 |
| Figure 19 | Teneur en flavonoïdes pour les différents extraits des feuilles de <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 52 |
| Figure 20 | Pourcentages d'inhibition du DPPH [•] en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique..... | 55 |
| Figure 21 | Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH [•] en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits des feuilles de..... | 56 |

Liste des tableaux

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Tableau 1 | Principales espèces réactives oxygénées | 05 |
| Tableau 2 | La teneur en eau dans les feuilles du <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 44 |
| Tableau 3 | Rendements et caractéristiques des extraits des feuilles de <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 44 |
| Tableau 4 | Résultats des testes préliminaires sur les différents extraits de <i>Ziziphus</i> <i>lotus</i> L..... | 47 |
| Tableau 5 | Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits des feuilles de <i>Ziziphus lotus</i> L. dans S4, gel de silice..... | 49 |
| Tableau 6 | Résultats de dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans les feuilles de <i>Ziziphus lotus</i> L..... | 50 |
| Tableau 7 | Valeurs des IC ₅₀ trouvées pour les extraits des feuilles de la plante et standard..... | 53 |



Introduction

Introduction

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs, elles ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé. À l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments.

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques. La matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie, Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes (Bahorun, 1997 ; Bérubé-Gagnon, 2006).

Des remèdes traditionnels à base de plantes ont été longtemps employés sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action, bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal étaient attribués à des métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes et les composés polyphénoliques (Bahorun, 1997).

Dans ce contexte, s'inscrit ce présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les différents extraits des feuilles de *Ziziphus lotus* L. largement utilisées dans le traitement de certaines maladies comme : les troubles digestives, la faiblesse, les affections du foie, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections cutanées, la fièvre, la diarrhée et l'insomnie (Abu-Zarga et al., 1995; Abdel-Zaher et al., 2005; Suksamrarn et al., 2005).

D'ailleurs, elle possède plusieurs activités pharmacologiques: anti-inflammatoire, analgésiques, antiulcérogénique, hypotensive, antidiabétiques, astringente et hémostatique (Borgi et Chouchane., 2006 ; Borgi et al., 2008 ; Menkovic et al., 2011).

Ce présent travail s'inscrit dans le but d'une contribution à une meilleure connaissance de cette plante médicinale de la région des Aurès et de découvrir certains constituants chimiques et l'étude de certaines activités biologiques des feuilles de *Ziziphus lotus* L. Les objectifs de ce présent travail sont fixés dans les quatre points suivants :

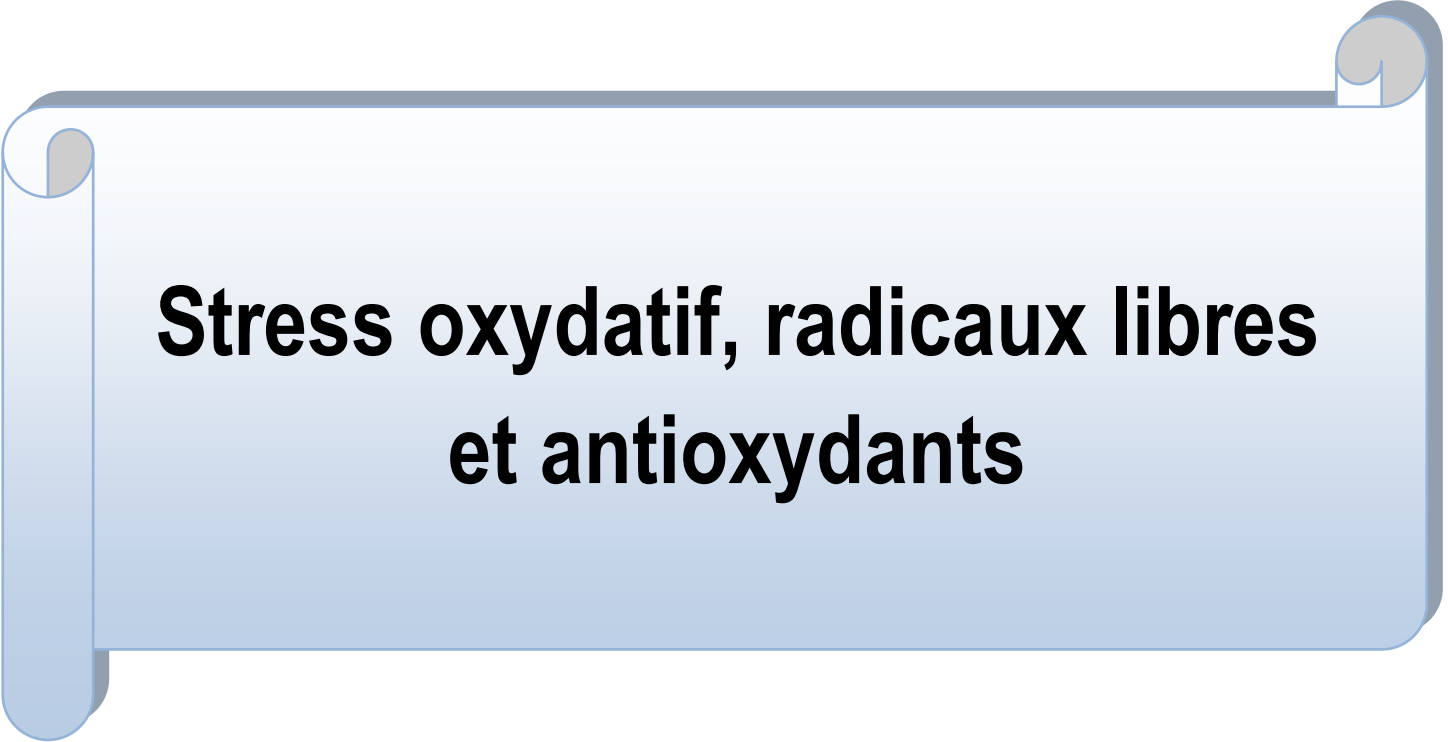
- L'analyse des différents extraits organiques et aqueux des feuilles de *Ziziphus lotus* L. en utilisant la CCM.

- Le dosage du contenu en polyphénols, et en flavonoïdes des différents extraits.
- L'étude de l'activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Ziziphus lotus* L. en utilisant le test au DPPH.

A la lumière des résultats obtenus, différentes perspectives de recherche seront évoquées.



Synthèse bibliographique



**Stress oxydatif, radicaux libres
et antioxydants**

1. Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les pro-oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, avec conséquences l'apparitions des dégâts irréversibles par la cellule à concentration plus élevées, les EAO peuvent en effet engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire. Ce que se traduit par divers altérations biochimiques intracellulaires ; oxydation de l'ADN, de protéines et la peroxydation des lipides. (Cheurfa et *al.*, 2015; Bidri et Choay 2016 ; Kehili et *al.*, 2017)

1.1. Les radicaux libres

Un radicale libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou un simple atome capable d'avoir une existence indépendante (libre) en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi vie très courte. En effet ce radicale libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable ; il va donc se réduire en oxydant un autre composé (Goudable et Favier, 1997)

Le rôle physiologique des EAO et des radicaux libres est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de :

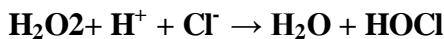
- Impliquées lors de processus de fécondation au du quel les spermatozoïdes secrètent des grandes quantités des EAO pour percer la membrane de l'ovule.
- NO \cdot qui participe à maintien de tonus vasculaire (homéostasie), neurotransmetteurs, fonctionnement rénale (Haleng et *al.*, 2007)
- Défense immunitaire : O \cdot^{-2} produits par les phagocytes pour l'inactivation des Verus et bactéries et H $_2$ O $_2$ utilisé par la myeloperoxydases pour produire l'hypochlorite qui permet de tuer les organismes pathogènes (Goudable et Favier, 1997).
- Régulation de l'activité de divers enzymes, et sont utilisées comme des messagers secondaires notamment de réguler le phénomène de l'appoptose et la différenciation cellulaire en activant des facteurs de transcription (Haleng et *al.*, 2007).

1.1.1. Principaux radicaux libres et leurs origines

➤ Le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) H_2O_2

Produit à partir de $O_2^{\cdot -}$ en présence de superoxyde dismutase. Il est plus stable que l'anion superoxyde c'est pourquoi il diffuse facilement à travers les membranes cellulaires. Il est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires. Faiblement toxique et peut former le radical hydroxyle. Il se forme par dismutation de l'anion superoxyde sous l'action d'une enzyme : la superoxyde dismutase (SOD) (belkheiri, 2010 ; Goudable et Favier, 1997 ; Tessier et Marconnet, 1995).

L'acide hypochloreux HOCl, Essentiellement produit par les myeloperoxydases (MPO) leucocytaires à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ion chlorure (belkheiri, 2010) :



➤ L'oxygène singlet O_2^1 :

Est une espèce non radicalaire, très réactive et peut initier une lipopyroxidation. Il se forme probablement au cours de l'attaque de l'eau oxygénée par la MPO qui est une enzyme hémique présente en concentrations importantes ($\pm 5\%$ en poids) dans les granules primaires des cellules polymorphonucléaires neutrophiles, durant la phagocytose (belkheiri, 2010 ; Tessier et Marconnet, 1995).

➤ L'anion superoxyde le peroxynitrite (HOONO) :

Oxydant très puissant diffusible à travers les membranes cellulaires et provoque l'endommagement de nombreuses molécules dans l'organisme (Haleng et *al.*, 2007)

➤ Le radical hydroxyle OH^{\cdot} :

Il est très réactif mais peut diffuser à travers les membranes cellulaires, et produit principalement par la photolyse de l'eau cellulaire (radiation ultra violet) dans tous les organismes vivants. Il est aussi produit à partir de l'eau oxygénée (selon la réaction de fenton) (Tessier et Marconnet, 1995 ; Goudable et Favier, 1997).



Il peut initier la peroxydation lipidique ce qui provoque l'altération des protéines et acides ribonucléiques (Tessier et Marconnet, 1995).

➤ **L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$:**

Est produit à partir de l'oxydation de l'oxygène moléculaire principalement par les phagocytes. Il est peu réactif mais toxique, peut générer le radical hydroxyle Fig.2 . Cet anion participe à l'inactivation des Virus et Bactéries. Cependant il peut stimuler de façon excessive et inappropriée les cellules immunitaires ce qui provoque des lésions tissulaires sévères (Tessier et Marconnet, 1995 ; Goudable et Favier, 1997)

➤ **Le radical hydroperoxyde HO_2^{\cdot}**

C'est la forme protonée de l'anion superoxyde. L'anion superoxyde est en équilibre constant avec le radical perhydroxyle (HO_2^{\cdot}) qui est beaucoup plus oxydant que lui. L'anion superoxyde peut être alors transformé soit spontanément, soit par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)(Tessier et Marconnet, 1995).

➤ **Le monoxyde d'azote radicalaire NO^{\cdot}**

Synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétase (NOS) sur L-arginine. Molécule labile très diffusible à travers les membranes cellulaires, et elle des effets régulateurs sur la plus part des fonctions physiologiques de l'organisme. (Haleng et al.,2007). Le peroxyde d'azote est cytotoxique et oxydant pour les résidus méthionine, les thiols et les thioéthers (belkheiri,2010).

➤ **Le radical peroxyde RO_2^{\cdot}**

C'est un radical très réactif avec la plupart des molécules, il est impliqué notamment dans la propagation de l'oxydation des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires.

Tab.1 Principales espèces réactives oxygénées (Antwerpen, 2006).

| Espèces non radicalaires | Espèces radicalaires |
|---------------------------------|---|
| Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 | Radical hydroxyle OH^{\cdot} |
| L'oxygène singlet O_2^1 | L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ |
| Le peroxyde d'azote $HOONO$ | Radical hydroperoxydes HO_2^{\cdot} |
| Acide hypochloreux $HOCl$ | Monoxyde d'azote radicalaire NO^{\cdot} |
| Peroxyde d'azote $ONOO^{\cdot}$ | Le radical peroxyde RO_2^{\cdot} |

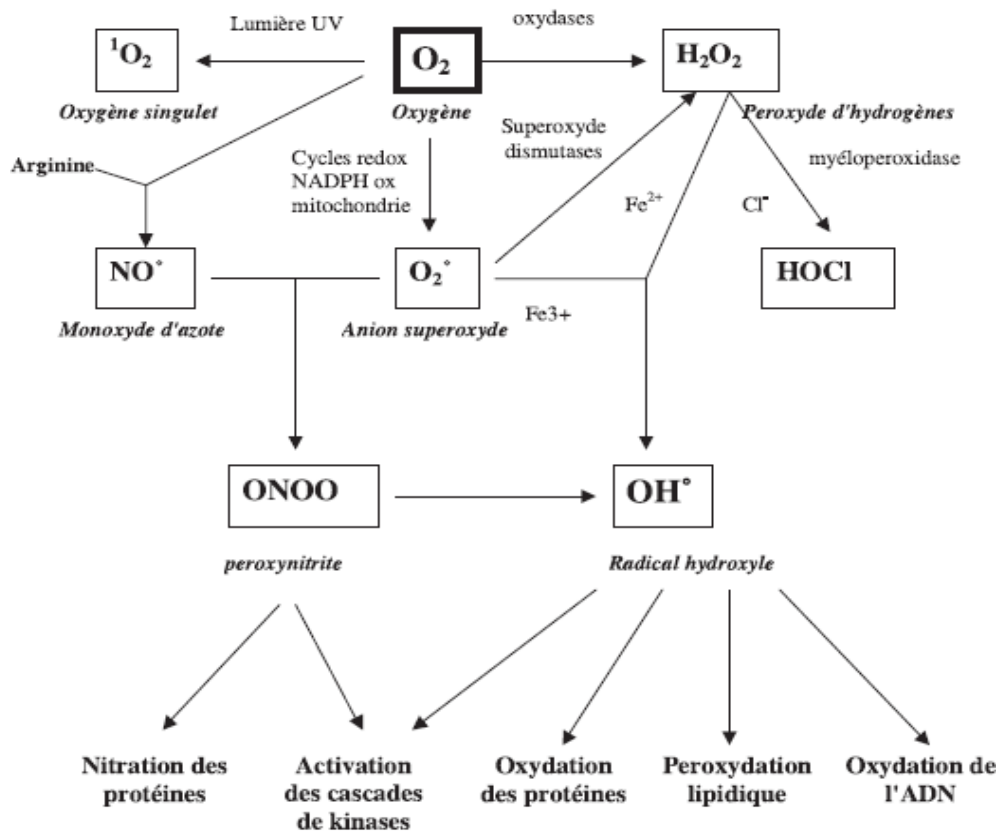


Fig.1 Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

1.2. Les Sources EAO :

➤ Source endogène :

A l'intérieur des cellules vivantes, la chaîne respiratoire mitochondriale (dans laquelle les êtres aérobies puisent leur énergie) joue un rôle capitale dans la cellule en couplant l'oxydation des coenzymes transporteurs d'hydrogène ou électrons avec phosphorylation d'ADP en ATP. Les conséquences de cette activité mitochondriale sont doubles et paradoxales ; d'une part la mitochondrie fournit à la cellule une source d'énergie importante puisque 36 ATP à haut potentiel énergétique sont générées lors de la réduction de l'oxygène moléculaire. Par contre, dans les conditions physiologiques, dans le cytoplasme et donnent naissance à des EAO.

De nombreux systèmes enzymatiques identifiés dans les cellules sont également capables de générer des oxydants :

- Les NAD(P)H oxydases sont des enzymes présentes dans la paroi vasculaire et qui génèrent $O_2^{\bullet-}$ en utilisant NADH ou NADPH comme substrat.

- La xanthine-oxydase joue un rôle important dans la production des EAO (particulièrement $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2)

- Lors du métabolisme de l'acide arachidonique, ce dernier peut être oxydé soit par les cyclooxygénases, soit par les lipooxygénases (métallo-enzymes à fer), pour former entre autre des hydroperoxydes qui sont des précurseurs de leucotriènes, puissants médiateurs de l'inflammation (belkheiri, 2010 ; ; Tessier et Marconnet, 1995).

➤ **Source exogène :**

L'organisme vivant est exposé à différentes agressions externes qui peuvent générer les EAO comme l'irradiations (ultra violet) ,polluant de l'aire (N , NO_2),solvants organiques, les métaux, anesthésiques, antibiotique, pesticides, drogues, xénobiotiques, hyperxies et le tabagisme .(Tessier et Marconnet, 1995)

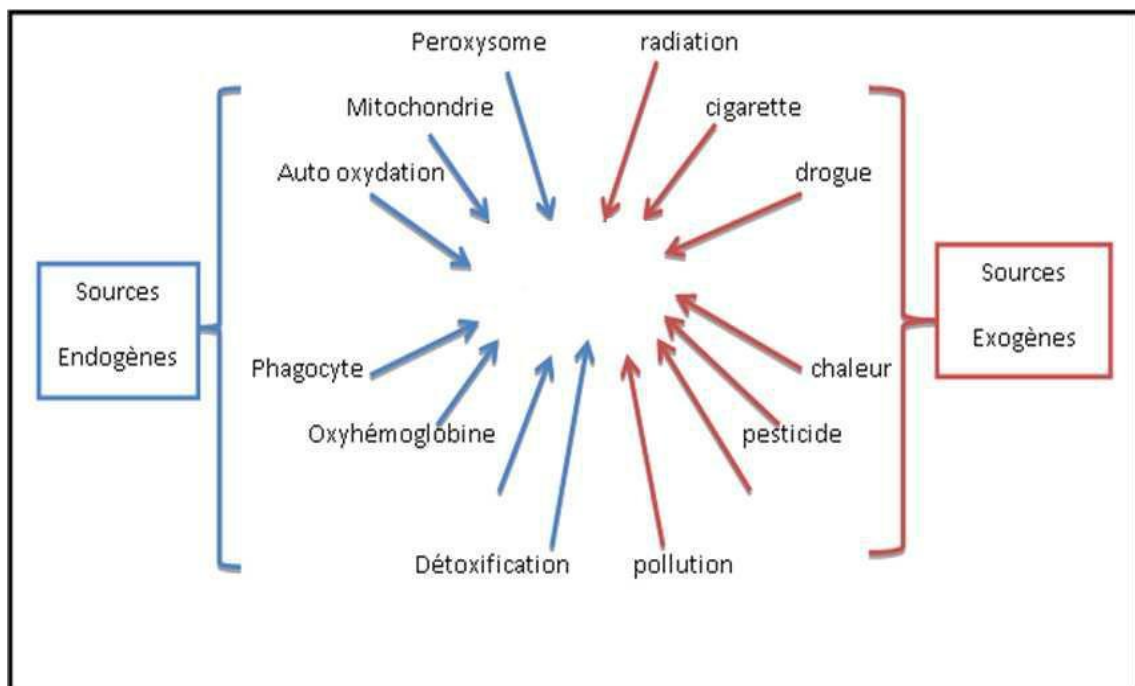


Fig2. Les principales sources des EAO (Humblet et Godeau, 2005)

1.3. Les cibles biologiques des EAO

Les EAO ont une structure électronique instable c'est pourquoi elles peuvent provoquer des attaques radicalaires sur les composants cellulaires et les biomolécules ce qui provoque des dysfonctionnements dans les activités vitales cellulaires qui est l'origine de divers pathologies.

➤ Oxydation des acides nucléiques :

L'ADN est une cible privilégiée pour les EOA. La guanine, par exemple, peut réagir avec OH^\bullet pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement (Tessier et Marconnet, 1995).

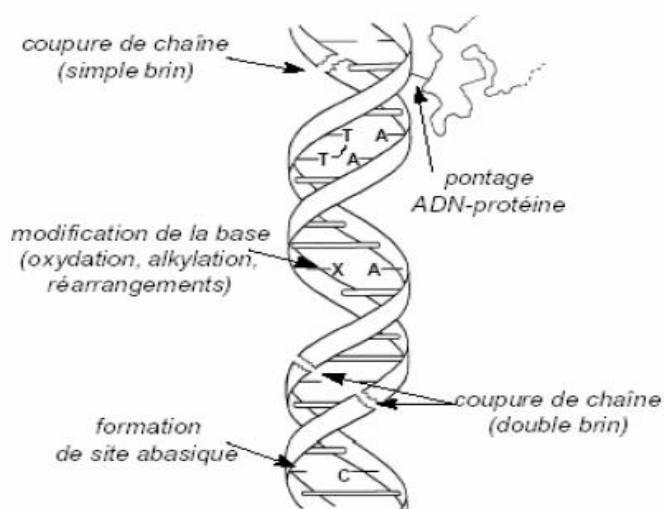


Fig3. Différentes catégories de lésions de l'ADN (Daum-Badouard, 2006)

➤ Oxydation des protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des EOA. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées

sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Tessier et Marconnet, 1995)

➤ **Oxydation des lipoprotéines**

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. L'activité de ces récepteurs n'étant pas régulée par la concentration intracellulaire en cholestérol, les macrophages se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les complexes immuns formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les macrophages (belkheiri,2010 ; ; Tessier et Marconnet, 1995).

➤ **Peroxydation des lipides membranaires**

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO•), suffisamment réactif pour arracher un H⁺ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal) Les groupements aldéhydiques du MDA réagissent efficacement avec les groupements amines et thiol; ces aldéhydes provoquent la formation de diverses lésions génétiques, et plus précisément la formation des adduits, qui entraînent la modification de l'information génétique. (Haleng et *al.*, 2007).

1.4. Maladies liées aux stress oxydatif

Le stress oxydatif est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies tel que les maladies cardiovasculaires (oxydation des lipides) et l'athérosclérose, arthrite rhumatoïde, le diabète, différents types de cancer (oxydation de l'ADN), maladies de système nerveux central comme les maladies neurodégénératives (Alzheimer), maladie de parkinson, la chorée de huntington, asthme, l'hypertension artérielle, déficience immunitaire des sujets âgés ... (Cheurfa et, 2015; Bidri et Choay 2016 ; Haleng et *al.*,2007 ; Favier, 2003 ; Fiorucci, 2006)

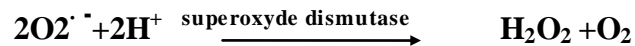
1.5. Le système de protection antioxydants

Les cellules possèdent différentes stratégies antioxydante afin de contrôler la quantité de radicaux libres. Une stratégie fréquemment retrouvée repose sur la présence de composés antioxydants synthétisés par la cellule (endogène) contrairement à d'autres apportés par l'alimentation (exogène) (Carange, 2010).

1.5.1. Les antioxydant enzymatique (endogène)

➤ Le superoxyde dismutase (SOD) (EC 1.15.11)

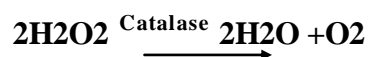
Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (belkheiri,2010).



Cette enzyme est capable de neutraliser 80% du superoxyde fournis par la mitochondrie. SOD est caractérisée par une vitesse de réaction remarquablement élevée, elles existent sous plusieurs isoformes le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutase à manganèse protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutase à cuivre-zinc protégeant le cytosol, la face externe de la membrane des cellules endothéliales ou le plasma sanguin. L'activité des SOD est dépendante des apports nutritionnels en cuivre et un moindre degré de zinc (Tessier et Marconnet, 1995 ; Carange, 2010 ; Favier, 2003 ; Goudable et Favier, 1997).

➤ La catalase (Cat) (EC 1.11.1.6)

Est une enzyme tétramérique formée de quatre sous unités identiques comportant chacun un groupe hème. Cette enzyme catalyse la transformation du H_2O_2 en oxygène et en eau.

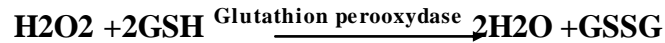


La catalase est considérée comme une des enzymes dotée d'une remarquable efficacité, elle présente dans les hématies et les peroxysomes hépatique. L'enzyme agit sur le même substrat que la GPx, avec laquelle elle peut entrer en compétition, mais son action

prédomine si la production d'H₂O₂ est élevée (Carange, 2010; Favier, 2003 ; Tessier et Marconnet, 1995) .

➤ **Les glutathion peroxydases (GPxs) (1.11.1.9)**

est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH).



Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium. Malgré que la CAT et la GPx partagent le même substrat, il a été suggéré que la GPx serait une source importante de protection contre les faibles niveaux de stress oxydant tandis que la CAT aurait un rôle plus important dans la protection contre les hauts niveaux de stress oxydant (Haleng et *al.*, 2007 ; Carange, 2010)

➤ **Le système thiorédoxine**

Le milieu intracellulaire est plutôt réducteur, les protéines contiennent des groupements thiols libres et les ponts disulfures sont rares. L'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (Haleng et *al.*, 2007).

➤ **L'hème oxygénase**

L'hème oxygénase dégrade l'hème (peroxydant) en bilirubine qui est un antioxydant capable de prévenir l'oxydation des LDL. Il existe l'hème oxygénase constitutive et inductible. Cette dernière est induite par le stress oxydant et les LDL oxydés (belkheiri, 2010).

Le rôle des SOD et des peroxydases est complémentaire car une bonne protection ne peut être obtenue par le superoxyde dismutase seules. Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydant comme les peroxyredoxines, la glutathion transférase. La plupart des enzymes décrites ci-dessus, de même que les enzymes de réparation des dommages

oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante. (Favier, 2003).

1.5.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

1.5.2.1. Les antioxydants non enzymatiques endogènes

Qui sont fabriqués par les cellules de notre corps.

➤ Le glutathion et les protéines-thiols

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine). Il est le thiol (-SH) majoritaire au niveau intracellulaire (l'albumine étant son équivalent plasmatique) où il est présent sous forme essentiellement réduite (GSH). Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible (Haleng et *al.*, 2007)

Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. Les autres propriétés antioxydantes du GSH sont nombreuses : cofacteur de la GPx, chélateur des métaux de transition, régénérateur final des vitamines E et C, à partir de leur forme radicalaire. (Haleng et *al.*, 2007)

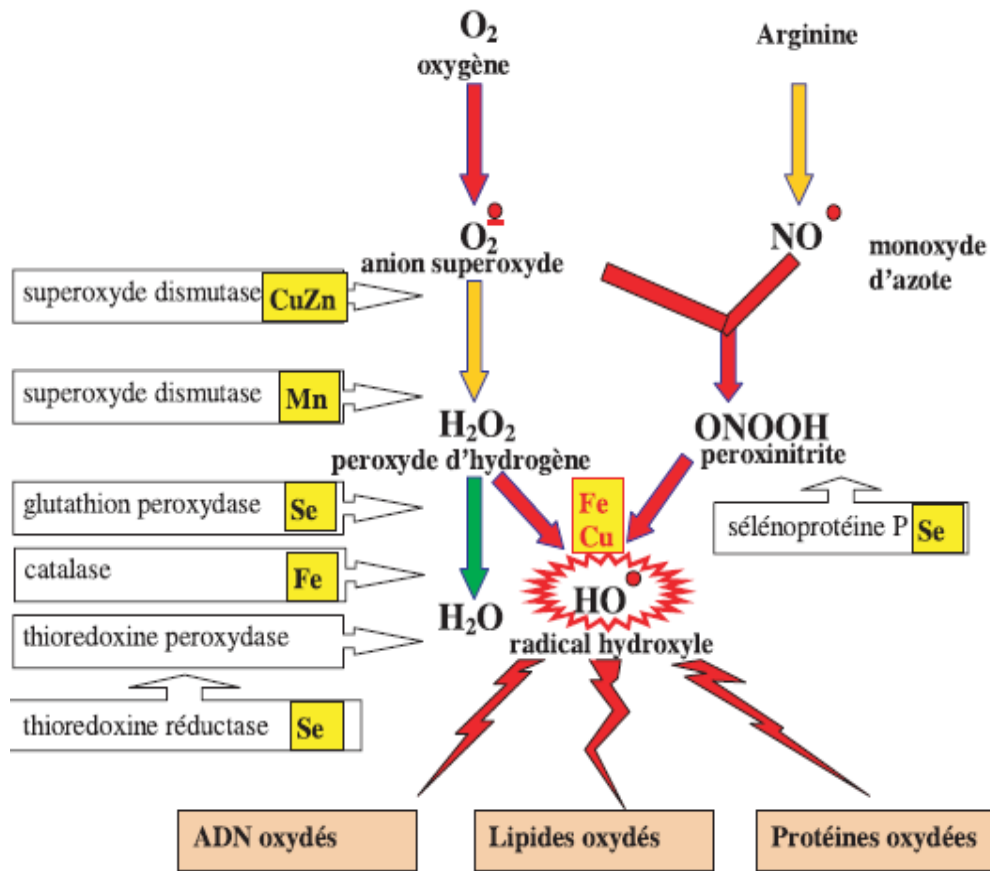


Fig4. Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

➤ L'acide urique

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piègeur puissant de radicaux ($\text{OH}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{NOO}\cdot$...). Les réactions de l'acide urique avec ces EAO génère des radicaux moins réactifs que $\text{HO}\cdot$ qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C) (belkheiri, 2010).

➤ La bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules réticuloendothéliales.. La bilirubine est un composé non hydrosoluble capable de piéger $\text{ROO}\cdot$ et l'oxygène singlet.

Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Haleng et *al.*, 2007).

1.5.2.2. Les antioxydants non enzymatiques exogènes

Ce sont ceux que nous consommons tous les jours dans notre régime alimentaire, notamment ceux contenus dans les fruits et légumes

➤ La vitamine E

D'un point de vue biologique, deux isomères sont particulièrement intéressants, l' α - et le γ -tocophérol. Leur caractère hydrophobe leur permet de s'insérer au sein des membranes riches en acides gras polyinsaturés, où ils jouent un rôle protecteur en réagissant avec les radicaux peroxy (ROO^\bullet) pour former un radical tocophéryle, empêchant ainsi la propagation de la lipoperoxydation. La réduction de la vitamine E oxydée est assurée par la vitamine C. Donc les concentrations de ces deux vitamines sont donc nécessairement liées pour la protection contre la peroxydation lipidique (Goudable et Favier, 1997 ; Haleng et *al.*, 2007).

➤ La vitamine C (ou acide ascorbique)

La vitamine C est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les compartiments hydrophiles. Agit principalement en piégeant directement les EAO (majoritairement $\text{O}_2^{\bullet-}$ et le ONOO^-). Ses fonctions sont nombreuses : contribution au bon fonctionnement du système immunitaire, implication dans la synthèse du collagène et des globules rouges ainsi que dans les mécanismes de métabolisation du fer (belkheiri, 2010).

➤ Les caroténoïdes

Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β -carotène (provitamine A) capte l'oxygène singlet, il a le pouvoir de terminer les réactions de lipoxydation et protège les structures cellulaires contre les agressions oxydantes. Le β -carotène se retrouve dans l'abricot, le melon, la carotte, les légumes verts (épinards, laitue...) : l'apport journalier recommandé est de 1 à 5 mg (Goudable et Favier, 1997 ; Haleng et *al.*, 2007).

➤ **Le Coenzyme Q10**

Le coenzyme Q10, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E (Haleng et *al.*,2007)

➤ **Les polyphénols**

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. Ils sont présents dans les fruits, les agrumes, l'huile de lin, le thé, le chocolat, les pomme. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des EOA et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Haleng et *al.*,2007).

➤ **Les flavonoides :**

L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène (belkheiri, 2010 ; Goudable et Favier, 1997).

Les oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et zinc jouent un rôle de cofacteurs dans le système antioxydants



***Ziziphus lotus* (L) Desf.**

2. *Ziziphus lotus* L.

2.1. Généralité

Les jujubiers (*Ziziphus spp*) appartiennent à la famille des Rhamnaceae qui regroupe des plantes dicotylédones ; elle comprend 900 espèces réparties en près de 50 genres. Ce sont des arbres, des arbustes, des lianes ou des plantes herbacées, souvent avec la fonction chlorophyllienne transférée aux tiges, certains adaptés aux zones arides, parfois épineux, des régions tempérées à tropicales. C'est une famille largement répandue. Parmi ces espèces : *Z. spina-christ* (L.), *Z. vulgaris* (Mill.), *Z. lotus* (L.), *Z. mauritiana*. Parmi ces espèces, *Z. mauritiana* et *Z. jujuba* *Z. lotus* (L), le jujubier appelé communément Sedra, N'beg, Zerb, Azzougar ou Tazougart, présente dans plusieurs biotopes des régions aride et semi-aride (Rsaissi ,2013 ; El hachimi et al, 2015)

2.2. Description botanique

Le *Ziziphus lotus* L. (jujubier) est un arbuste fruitier, très répondeu, épineux appartenant à la famille des Rhamnaceae et les dicotylédones. Il forme des touffes de quelques mètres de diamètres pouvant atteindre 2m de haut, Ses feuilles sont courtement pétiolées, glabres, caduques alternées et ovales à marges entières. Chaque feuille porte à sa base deux stipules transformées en épine inégale et vulnérable. Les fleurs sont jaunes, pentamères et groupées en inflorescence cymeuses. Les fruits sont des drupes à noyaux soudés, l'endocarpe mucilagineux appelé "Nbeg (Djmai Zoughlache, 2009)

2.3. Classification botanique

Règne : végétal

Embranchement : magnoliophyta (phanérogames)

Sous- embranchement : magnoliophytina (angiospermes)

Classe : magnoliopsida (dicotylédones)

Sous classe : Rosidae

Ordre : rhamnales

Famille : rhamnaceae

Tribu : zizyphae

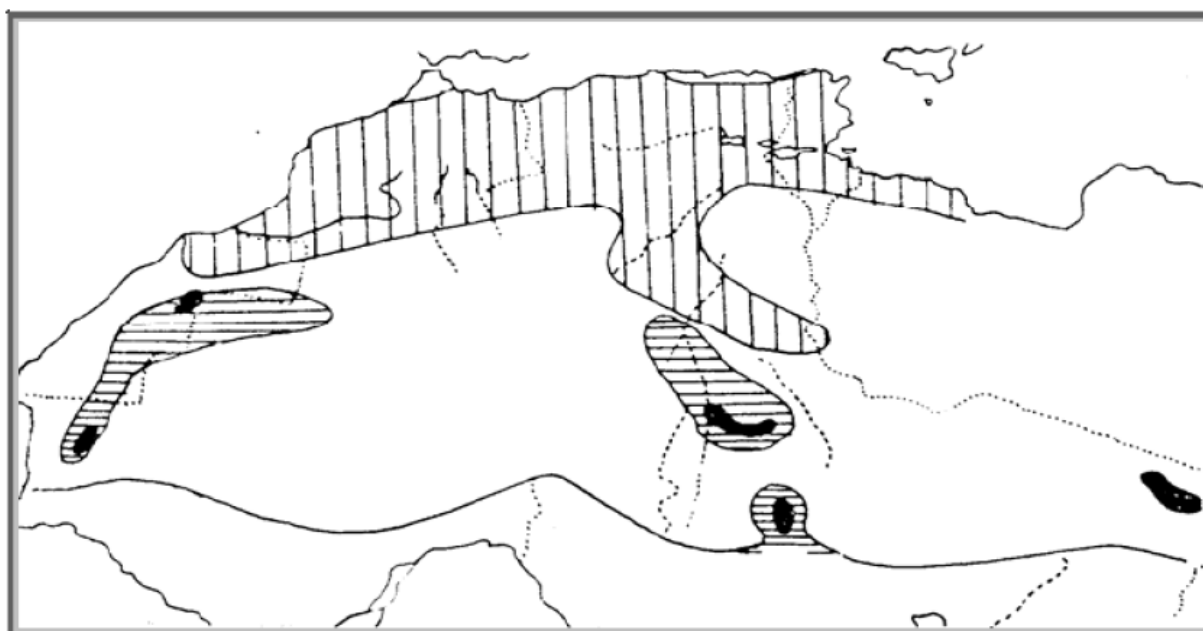
Genre : *Ziziphus* Mill.

Espèce : *Ziziphus lotus*(L) Desf. (Quezel et Santa, 1962)

2.4. Répartition géographique

Il est distribué principalement dans les régions méditerranéennes, tropicales et subtropicales du monde) faible pénétration dans le Sahara septentrional : Maroc, Algérie, Tunisie, Libye. Elle réapparaît ensuite au Yémen, dans l'île de Socotra, au Moyen-Orient : en Palestine, en Syrie, en Turquie et à Chypre. On la retrouve enfin en Grèce, en Sicile et en Espagne méridionale. (Ghedira , 2013 ; El hachimi et *al*, 2015)

Le *Zizyphus lotus* L. est répandu dans toute l'Algérie sauf le Tell Algéro-constantinois




 Aire de *Zizyphus lotus* L.

Fig5. Aire de répartition du *Zizyphus lotus* L. en Algérie (Quezel et Santa, 1962)



Fig.6 Feuilles, fruite et arbrisseau de *Ziziphus lotus* L.

(Ghedira, 2013 ; Djamai Zoughlache, 2009)

2.5. Composition biochimique

Les études photochimiques menées sur le *Ziziphus lotus* L. montrent la présence de métabolites primaires et secondaires.

Elle contient environ 20 à 30% de sucres, 0.1 à 0.3 de lipides et 0.8 à 2.1. aussi cette plante est riche en métabolites secondaires : alcaloïdes (lotosines ...), saponosides (lotosides), flavonoïdes (quercitrines), stérols (β - sitosterol) citer par Ghedira (2013) et Djmai Zoughlache (2009)

2.6. Activité biologique et thérapeutique de *Ziziphus lotus* L.

Est une espèce utilisée dans la phytothérapie traditionnelle pour traiter différentes pathologies ; lithiase urinaire maladies infectieuses, inflammatoires (Cheurfa et al., 2017) aussi il a une capacité antiperitique et tonique (El hachimi et al. , 2015 ; Khouchlaa et al. , 2017) .

Les extraits de différentes parties de *Ziziphus lotus* L. ont montré une activités très puissantes à l'égard de radical DPPH dans différentes études, Activité anti-inflammatoire et analgésique, les flavonoïdes et les saponines de l'écorce des racines du ont montré *Ziziphus lotus* L. une activité anti-inflammatoire significative, Action antispasmodique, Activités anti-ulcérogéniques attribuée à la présence des tanins et les flavonoïdes connus par leur effet gastroprotecteur (Djmai Zoughlache, 2009 ; Cheurfa et al., 2017 ; Borgi et al . 2008 ; Borgi et al ., 2007).

2.7. Toxicité

L'administration par voie intrapéritonéale d'un extrait aqueux issu des écorces de racines à raison de 50 mg/kg n'entraîne aucune mortalité. La DL50 a été évaluée à 400 mg/kg, tandis qu'une dose de 1 000 mg/kg est responsable de 100 % de mortalité chez la souris (Ghedira , 2013)

2.8. Usages traditionnels du jujubier sauvage

Les fruits de *Ziziphus lotus* L. ou jujubes seraient encore consommés par quelques tribus berbères au Maghreb. En Tunisie, le fruit ou Nbeg est apprécié autant comme friandise que comme aliment. Dans les régions où l'espèce est abondante, les fruits sont séchés et réduits en une farine dont on fait une Zemmita, d'un goût agréable et succulent ou des galettes de saveur très agréable qui font partie des provisions du nomade lors de ses grands déplacements. Les feuilles et les fruits réduits en poudre et mélangés avec de l'eau ou du lait sont utilisés au Sahara central comme emplâtres sur les furoncles. Les feuilles sèches, pulvérisées au mortier, sont utilisées par les malékites, du fait de leurs propriétés saponifiantes, pour laver les morts.

La racine écrasée et exprimée laisse couler un jus qui serait efficace dans les cas de leucomes oculaires.

En médecine traditionnelle, Paris et Dillemann (1960) soulignent les propriétés émollientes du fruit qui en faisaient un des quatre fruits pectoraux entrant dans la confection, encore actuelle de pâtes béchiques pectorales.

Selon Bellakhdar, les jujubes sont considérés comme fébrifuges, tonifiants et revigorants, justifiant leur emploi, dans la convalescence. Au Sahara occidental, elles ont gardé, encore la réputation d'être antivarioliques et actives contre, la rougeole. Dans le Sud marocain, cette espèce est indiquée contre les furoncles et les abcès. La décoction des (Ghedira , 2013)



Métabolites secondaires

3. Métabolites secondaires

3.1. Généralités

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes ils contiennent des substances très recherchées par les industries des cosmétiques, de la pharmacie et de la phytothérapie (Amara et Melouk, 2016)

La production des métabolites secondaires est étroitement liée au métabolisme primaire, résultent généralement de trois voies de biosynthèse: la voie deshikimate, la voie de mévalonate et du pyruvate

D'après leur biosynthèse, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois classes: Polyphénols; terpénoïdes; stéroïdes et alcaloïdes (Amara et Melouk, 2016)

3.2. Classification

3.2.1. Les polyphénols

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. Sont solubles dans la solution de carbonate de sodium. Chimiquement, ils sont réactifs et donnent souvent lieu à des liaisons hydrogènes, ou chélateur des métaux pour les O-dihydroxyphénols (catéchol); Enfin, ils sont sensibles à l'oxydation (Amara et Melouk, 2016 ; Lyasi et *al.*, 2003). Les classes des polyphénols :

A. Polyphénols monomériques

➤ Acides phénoliques

Les acides phénoliques, ou acides phénols ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols, Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils se divisent en deux classes: les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) (Amara et Melouk, 2016)

➤ Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, Les flavonoïdes sont des dérivés benzo-y-pyranne . Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C.ils sont distribués dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes. Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, elles se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques (Boudjouref ,2011 ; Seyoum et *al.*, 2006 ; Medic et *al.*, 2003).

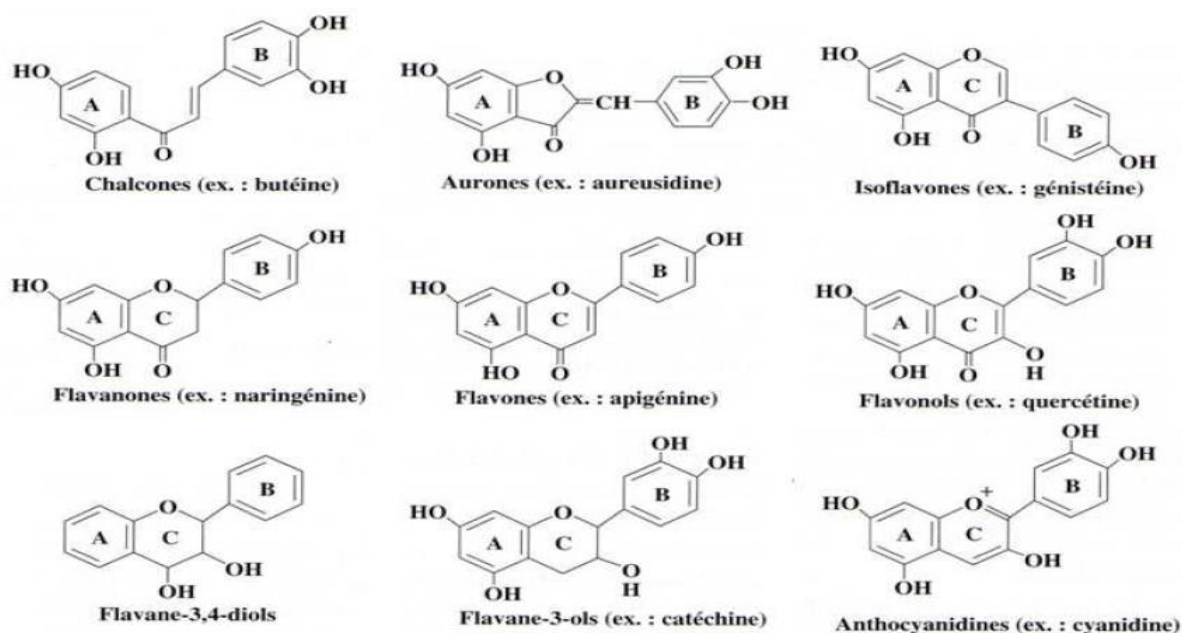


Fig7. Les principaux types des flavonoïdes (Benjabeur, 2012)

➤ Activités biologiques et propriétés pharmacologiques :

Les flavonoïdes possèdent de nombreuses activités biologiques, ils ont des propriétés antioxydantes(L'action antioxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces

réactives de l'oxygène), activités antimicrobiennes, Les effets antiallergiques, moduler le fonctionnement du système immunitaire, Effet anticancéreux, antihépatotoxique, anti-ostéoporotique, activité hypocholestérolémiant, activité antidiabétique, activité antimitotique, anti protozoaires et activité anxiolytique ... (Zoughlache, 2009 ;Cotelle, 2001 ; Boudjouref, 2011)

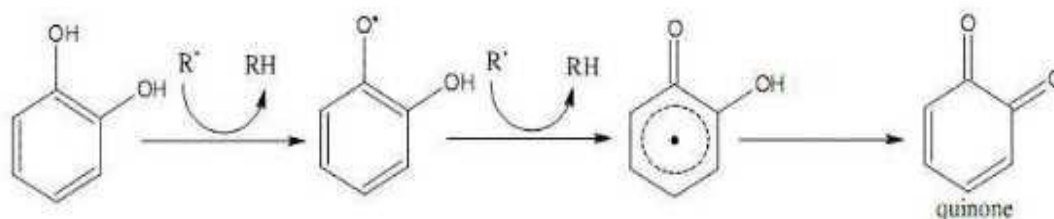


Fig.8 Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (la quercétine) (Marfak, 2003)

B. Polyphénols sous forme de polymères

➤ Tanins

Les tanins sont des métabolites secondaires polyphénoliques. Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides, et essentiellement les protéines. Parmi les caractéristiques des tanins le goût astringence qui est une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (Peronny, 2005).

Le rôle biologique des tanins dans la plante est lié à sa propre protection contre les infections, les insectes et les animaux herbivores, en plus de la protection contre les attaques fongiques et bactériennes. Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, ils sont particulièrement abondants chez les Conifères, les Fagacée, les Rosacée. Tous les organes végétaux peuvent en renfermer. Les tanins sont présents dans une variété de plantes utilisées dans l'alimentation notamment les céréales, les légumineuses, les fruits (zoughlache ,2009 ; Peronny, 2005 ; Ghestem et *al.* , 2001).

A la base de leur caractéristique structurale, il est possible de diviser les tanins en deux groupes :

○ **Tanins hydrolysables:**

Sont des hétéro polymères possédant un noyau central constitué d'un polyol, il s'agit souvent d'un D-glucose; ces substances s'hydrolysent facilement en milieux acides et alcalins ou sous l'action d'enzymes (telle que la tannase), pour donner des glucides et des acides phénoliques, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques (Gallo tanins), ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique et les tanins ellagiques (Ellagitanins), Ainsi sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique (Amara et Melouk, 2016).

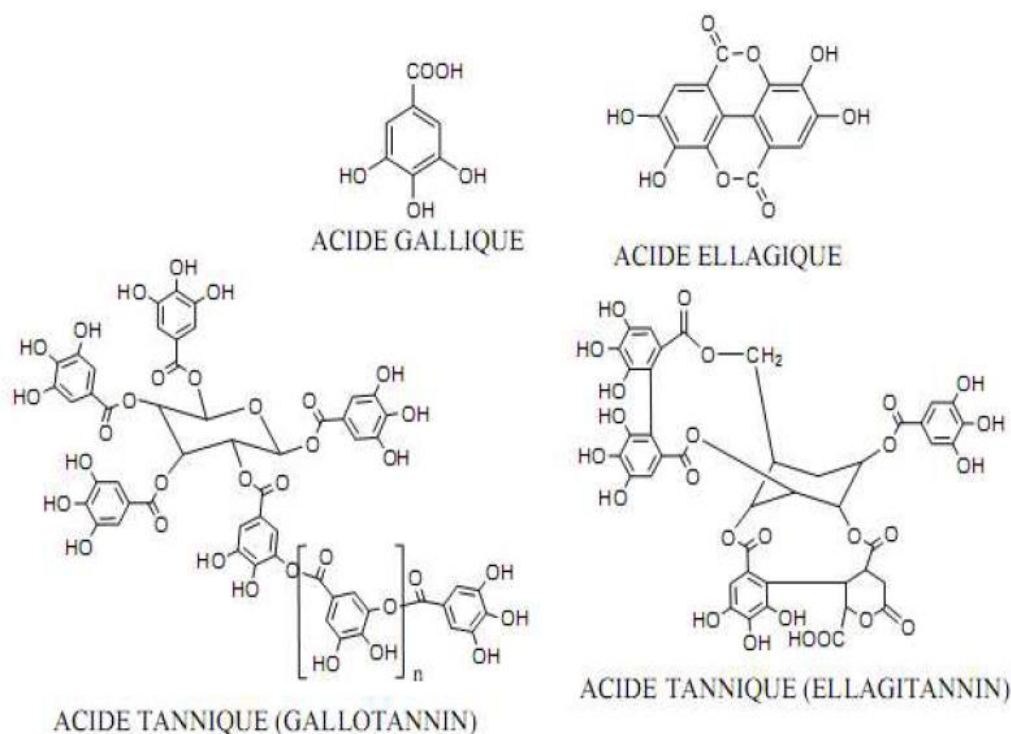


Fig9. Structure des tanins hydrolysables et les acides associés (Peronny, 2005).

○ **Tanins condensés (proanthocyanidines)**

Ce sont des polymères ou oligomères flavanique, constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités. Ces unités liées entre elles par une seule liaison carbone-carbone C4-C8 ou

C4-C6 dans le type B des proanthocyanidines ; ou par une liaison interflavanique double (C4-C8 ou C4-C6) et (C2-O-C7) dans le type A (Zoughlache ,2009)

➤ **Activités biologiques et propriétés pharmacologiques des tanins**

Les tanins sont des molécules biologiquement actives, douées d'activités pharmacologiques remarquables et des effets significatifs sur la santé humaine, ils ont une grande capacité antioxydante due à leurs noyaux phénols (inhibition de la lipoperoxydation, neutraliser les radicaux libres...), En plus les tanins ont d'autres activités très intéressantes ; ils sont utilisés comme anti diarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes. Ils sont largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans celle des vernis et peintures (Boudjouref, 2011 ; Peronny, 2005 ; Perret, 2001).

➤ **Lignines :**

C'est l'un des polymères biosources les plus abondants sur Terre, elle constitue de 15 à 40% de la matière sèche des arbres et de 5 à 20% des tiges des plantes annuelles. C'est également le polymère aromatique naturel le plus abondant. Subissant les contraintes de la gravité, la lignine est apparue afin notamment de rigidifier les parois cellulaires. Le rôle des lignines dans l'évolution des végétaux, ils forment une barrière mécanique, de goût désagréable, et réduisant la digestibilité des sucres de la paroi, les lignines participent à la résistance des plantes aux microorganismes et herbivores, la lignification est une réponse courante à l'infection ou la blessure (Amara et Melouk, 2016)

➤ **Coumarines**

Les coumarines sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7-cinnamiques. Elles existent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) sont plus ou moins solubles dans l'eau. La coumarine et ses dérivés ont des actions phyto biologiques, bactériostatiques et anti fongiques. Ils ont un effet antioedémateux (Amara et Melouk, 2016)

3.2.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques naturelles composés de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote. Ils peuvent être présents dans tous organes . Leur teneur est très variable, généralement comprise entre 0.1% et 2 à 3 % du poids sec de la drogue (Amara et Melouk, 2016).

Les alcaloïdes existent rarement à l'état libre dans la plante, mais le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques ou à des tanins. Ils sont des molécules très intéressantes au point de vue biologique car certaines sont le principe actif de plusieurs extraits de plantes anciennement utilisés comme médicaments, comme poisons ou encore comme psychotropes. Insolubles ou fort peu solubles dans l'eau; ils sont solubles dans l'alcool plus à chaud qu'à froid, l'éther, les acides et dans l'ammoniaque (Amara et Melouk, 2016 ; Ziegler et Facchini, 2008 ; Hess, 2002).

On distingue trois types d'alcaloïdes :

- **Alcaloïdes vrais** : d'après certains auteurs, ils sont issus seul règne végétal. Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé (Brunoton, 1999).
- **Pseudo-alcaloïdes** : ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés (Brunoton, 1999).
- **Proto-alcaloïdes** : se sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ; ils ont une réaction basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés (Brunoton, 1999).

Les alcaloïdes peuvent être divisés aussi en plusieurs groupes.

- **Phénylalanines**: comme capsaïcine chez piment, colchicine chez colchique.
- **Alcaloïdes isoquinoléiques** : comme: morphineéthylmorphine, codéine et papavérine continues dans l'opium du pavot; et des alcaloïdes indoliques: ergométrine, ergotamine et ergotoxine de l'ergot des céréales.
- **Alcaloïdes quinoléiques**: se trouvent dans les écorces de Cinchona .
- **Alcaloïdes pyridiques et pipéridiques**: par exemple: ricinine chez ricin.
- **Alcaloïdes dérivés du tropane** : comme scopolamine et atropine chez la belladone.

➤ **Alcaloïdes stéroïdes**: racine de vératre, douce-amère ou aconite (aconitine) par exemple (El aloui-kefi ,2013).

3.2.3. Activité et intérêt pharmacologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes présentent fréquemment de propriétés pharmacologiques marquées et ont de nombreuses utilisations en thérapeutique, notamment au niveau de système nerveux central, du système nerveux autonome et du système cardiovasculaire. On notera aussi l'existence d'anti-tumoraux, d'antiparasitaires, de curarisants, les alcaloïdes sont utilisées comme anti-cancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (Aref Et Heded, 2015 ; Gazengel et Orecchioni, 2013).

3.2.4. Terpénoïdes

Appelés aussi terpènes, constituent une vaste groupe de métabolites secondaires, sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur unité de base un C5 qui s'appelle l'isoprène (Amara et Melouk, 2016 ; Hellal, 2011).

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : les terpènes ou monoterpènes en C10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C20, les triterpènes C30, et les tétraterpènes C40 (Guignard, 1996).

➤ **Triterpénoïdes et stéroïdes**

Les triterpènes sont des composés en C30 issus de la cyclisation de l'époxysqualène ou du squalène. Les stéroïdes sont dérivés de triterpènes tétracycliques et possèdent un squelette cyclopentaperhydro phénanthrène. Beaucoup de stérols se produisent sous forme de glycosides caractérisés par les saponines stéroïdiens (Hanson, 2003).

➤ **Saponines (Groupes de stéroïdes)**

Le mot saponine est dérivé du mot latin *sapo*. Les saponines ont reçu leur nom du fait qu'elles produisent une mousse semblable à celle du savon, Ils sont des glycosides à poids moléculaire élevé, regroupant un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules triterpéniques ou stéroïdes. Elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe (un noyau stéroïdique ou triterpénique) liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile (Wallace, 2004 ; Hart *et al.*, 2008)

➤ **Tétraterpènes (comme Caroténoïdes)**

Les caroténoïdes sont des pigments rouges ou jaunes, possédant un chromophore caractéristique (au moins 10 doubles liaisons conjuguées) expliquant leur couleur jaune-orangée et leur sensibilité à l'oxydation. Pour cela, les caroténoïdes sont employés en industrie agro-alimentaire principalement pour leur pouvoir colorant mais on peut aussi noter qu'ils sont préconisés en cas de photo dermatose puisqu'ils interfèrent avec les processus de photo-oxydation (Krief, 2003 ; Hanson, 2003).



Partie expérimentale



Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des feuilles de *Ziziphus lotus* L., récoltées en mois de septembre 2016 de la région de Khenchela, dont l'identification a été effectuée par M^{me} Bouhalit Samira ; maître assistant à université Abbès Laghrour Khenchela.

Pour la préparation des différents extraits, la partie aérienne cueillie de la plante est séchée à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante.

Les feuilles sont isolées et séparément réduites à l'aide d'un broyeur en poudre fine qui est soigneusement conservée dans un bocal en verre jusqu'à son utilisation.



Fig.10 Feuilles de *Ziziphus lotus* L. sèches

1.2. Réactifs chimiques et instrumentations

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: , FeCl_3 , acide sulfurique (H_2SO_4) , HCl , acide acétique, NaOH , NH_4OH , méthanol, AlCl_3 , méthanol, n-butanol, Éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme, Acétone, Plaque CCM.

Parmi l'appareillage utilisé : Rotavapeur, spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau , Chambre d'observation UV, Bain Marie, Etuve universelle de 5 à 220°C avec Ventilation, Agitateur magnétique, et Balance, balance de précision.

2. Méthodes

2.1. Détermination de la teneur en eau

Pour déterminer la teneur en eau, on fait une dessiccation de la matière fraîche à la température de $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à une mesure pratiquement constante. La teneur en humidité est définie comme étant la perte de poids subit lors de la dessiccation. Pour évaluer la qualité de la conservation (Audigie *et al.*, 1978).

$$\text{Le teneur en eau (humidité)\%} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \cdot 100$$

H% : taux d'humidité ou teneur en eau.

M1 : masse en g de l'échantillon avant la déshydratation.

M2 : masse en g de l'échantillon après la déshydratation.

2.2. Préparation des extraits à partir des feuilles du *Ziziphus lotus L.*

➤ Préparation d'extrait aqueux par infusion :

c'est le résultat d'une simple infusion à 10%, suivant la méthode de Drissa *et al.*, (2004) ; 10g de la poudre de plante sont introduits dans 100 ml d'eau bouillante pendant 30 mn (50°C) en suit le filtrat est récupéré et évaporé à 45°C dans une étuve

➤ Préparation d'extrait aqueux par décoction :

Elle est basée sur la préparation d'une décoction, en introduisant 30g de la poudre végétale dans 300ml d'eau distillée, le tout est chauffé jusqu'à l'ébullition pendant 3h et réduction du volume initiale à $1/10^{\text{ème}}$. Après refroidissement et filtration, le filtrat récupéré est évaporé à 50°C à l'aide d'une étuve (Boubacar Souley, 2005).

➤ Préparation d'extrait méthanolique :

100g de la poudre de *Ziziphus lotus L.* est introduit dans un bécher qui contient le mélange hydro alcooliques ; méthanol/eau distillée (8:2 V/V) pendant une nuit. Cette technique est effectués 3 fois, les filtrats sont récupérés, réunis et soumis à une évaporation

rotative à 50 °C utilisant un évaporateur rotatif pour obtenir un extrait méthanolique. L'extrait sec obtenu est ensuite stocké à une température de +4°C.

B. Fractionnement de l'extrait brut (Extraction liquide- liquide)

L'extrait brut méthanolique est fractionné en utilisant une série de solvants à polarité croissante. 10 g d'extrait méthanolique sont initialement dilués dans 100 ml d'eau bouillante, filtrés et le filtrat est mélangé avec 50 ml (x2) de chloroforme (V/V). Après décantation la phase aqueuse inférieure est récupérée et destinée à l'évaporation dans l'étuve à 45°C (phase chloroformique), alors que la phase supérieure subit un autre fractionnement par 50 ml d'acétate d'éthyle (V/V), puis on fait une décantation. La phase inférieure est soumise à une autre macération par n-butanol pendant 1h. Tous les extraits sont soumis à une évaporation dans l'étuve à 35-40°C

➤ **Calcul des rendements d'extraction :**

Le rendement des différents extraits obtenus est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenue et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé par l'équation :

$$R(\%) = (Me / Mv) \times 100$$

R (%) : Rendement en %,

Me : Masse de l'extrait après l'évaporation du solvant,

Mv : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction (Cheurfa, 2017)

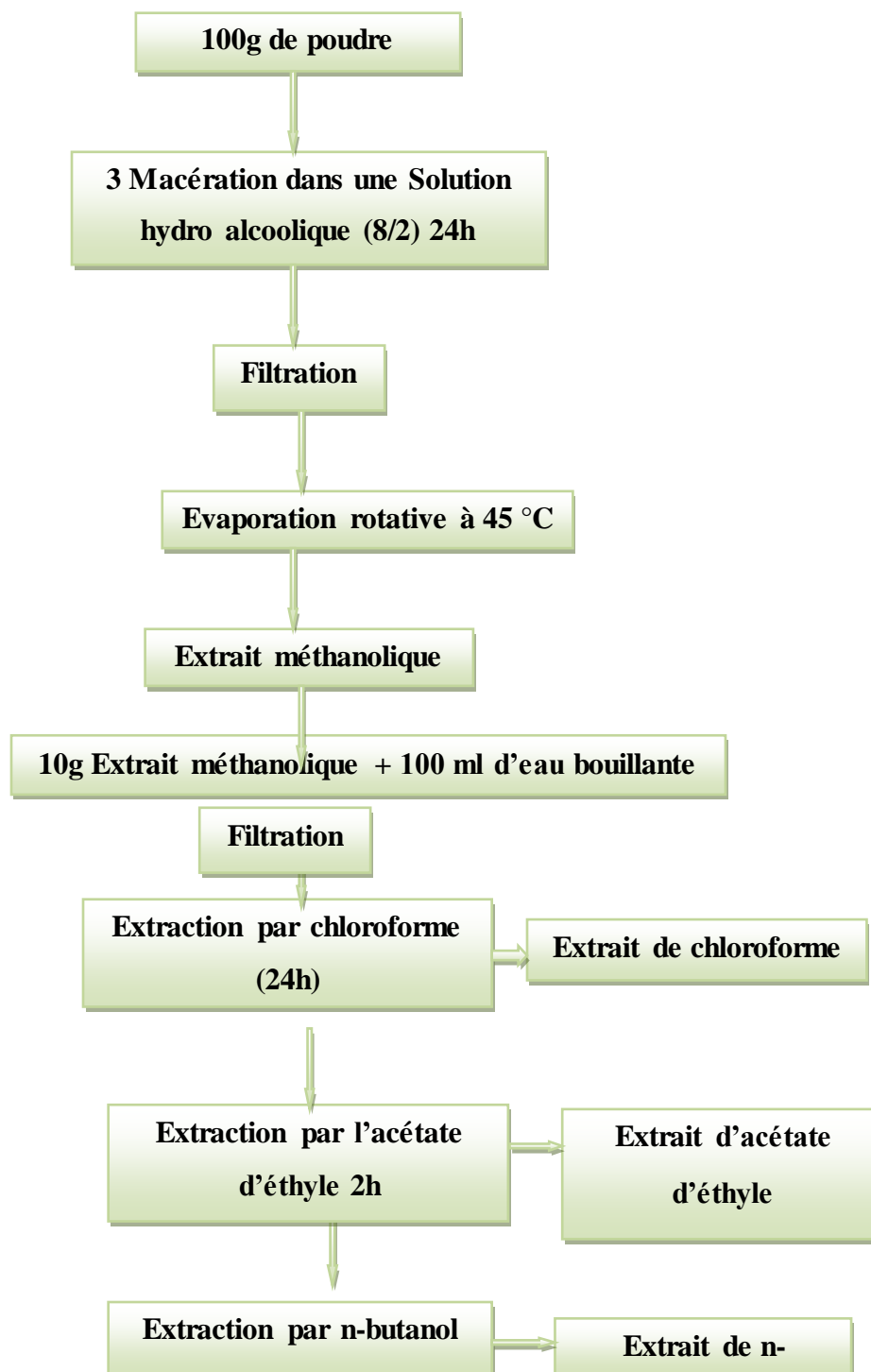


Fig.11 Les différentes étapes de macération et d'extraction liquide-liquide de la poudre de feuilles de *Ziziphus lotus L.*

2.3. Screening phytochimiques

Le screening chimique est un ensemble de réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des principales contenues dans une plante et responsables de propriétés pharmacologiques.

Les tests phytochimiques sont réalisés sur la poudre, l'infusés ou l'extraits bruts de feuilles de *Ziziphus lotus* L.

➤ Détection des flavonoïdes :

Macérer 2g de la poudre sèche dans 30 ml d'HCl dilué à 1% pendant 24h, filtrer et procéder au test suivant : prendre 10 ml du filtrat, le rendu basique par l'ajout du NH₄OH. Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai.(Sharma, 2013)

➤ Détection des alcaloïdes :

On fait la macération de 1g de poudre végétale dans 5ml de H₂SO₄ (10%).Après la filtration on ajoute à 1ml de filtrat quelque gouttes de réactif de Wagner l'appariation de précipité brun indique la présence des alcaloïdes (Kanoun, 2011)

On confirme ce test par l'addition de quelque goutte de réactif de Mayer à 1 ml de filtrat précédent ; l'apparition d'un précipité blanc jaunâtre confirme la présence des alcaloïdes (Qnais, 2007).

➤ Détection des Coumarines

La présence de coumarines est révélée après ajout dans les tubes avec 1ml extrait (éthérique évaporé) de 0,5ml de NH₄OH à 25% et observation de la fluorescence sous une lampe UV à 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube ou il a été ajouté l'ammoniaque indique la présence de coumarines

➤ Détection Anthocyanes

Infusion de 5 g de poudre végétal dans 100 ml d'eau bouillant (15 min) , après la filtration on mètre 2 ml d'infusé (5%) et on ajoute 2 ml HCl (2N) avec quelques

gouttes d'ammoniac; Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, conclure à la présence d'anthocyanes (Debray et *al.*, 1971).

➤ **Détection Mucilages :**

1ml d'infusé est ajouté à 5ml d'éthanol après quelques minutes la présence d'un précipité indique la présence des mucilages

➤ **Détection Caroténoïdes**

20 g de poudre des plantes ont été infusés séparément dans 150 ml d'eau distillé. Les filtrants ont été repartis dans des tubes à essai à raison de 3 ml.

3 ml de l'extrait aqueux, quelques millilitres (3 ml) d'HCl ont été ajoutés dans chaque tube à essai puis 3 ml de H₂SO₄. Il apparaît dans les deux cas une coloration vert-bleu qui témoigne la présence des caroténoïdes

➤ **Détection Terpénoïdes**

Ils sont mis en évidence par l'ajout de 2ml de CHCl₃, 1ml d'anhydride acétique et 1 ml d'acide sulfurique concentré aux différents extraits (méthanolique et aqueux). L'apparition d'une coloration violette indique leur présence des terpénoïdes

➤ **Détection Stérols**

Macéré 5 g de poudre végétal dans 20 ml d'éther pendant 24h, après la filtration on évaporé le filtrat, puis on ajoute 0.5 ml d'Anhydride acétique et 0.5 ml de Chloroforme avec un peu d'acide sulfurique; On observe une anneau rouge-brunâtre, alors qu'en présence de stérols (Trease et Evans., 1987)

➤ **Détection Tanins (Cathélique ou Gallique)**

5ml d'infusé à 5% (1 ml de l'extrait éthanolique), et 1ml de solution aqueuse de FeCl₃ à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration bleu-vert (tanins Cathélique) ou bleu-noire (tanins Gallique) (Dohou, 2003).

La différenciation des tanins catéchiques et galliques est obtenue par la réaction de Stiasny

Introduire dans un ballon 3ml d'infusé à 5% et ajouter 1,5ml de Réactif de Stiasny (10ml de formol à 40% + 5ml d'HCl concentré). Chauffer au Bain-Marie à 90°C pendant 15 mn. L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques. Filtrer et saturer le filtrat d'acétate de sodium pulvérisé, ajouter quelques gouttes d'une solution de FeCl₃ à 1%, le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny

➤ **Détection Saponines**

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 1 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Le mélange est laissé pendant 15 minutes. La persistance de mousse d'au moins 1 cm pendant 15 min indique la présence de saponosides (Rizk ,1982).

➤ **Détection des quinones**

2g de poudre ont été mouillés avec une solution d'acide chlorhydrique à 10%. Il s'en est suivi une macération dans 0,3 ml d'un mélange d'éther du pétrole durant 3 minutes

Après filtration, 1 ml de cette solution a été traité avec 1 ml d'une solution aqueuse de soude caustique (NaOH) 1%. Une coloration rouge-rosâtre apparaît témoignant la présence des quinones (Etudes rwandaises, 1977).

➤ **Détection des l'amidon**

On ajoute quelque gouttes de légole à 1ml d'infusé 5%, une coloration bleu foncée confirme la présence de l'amidon

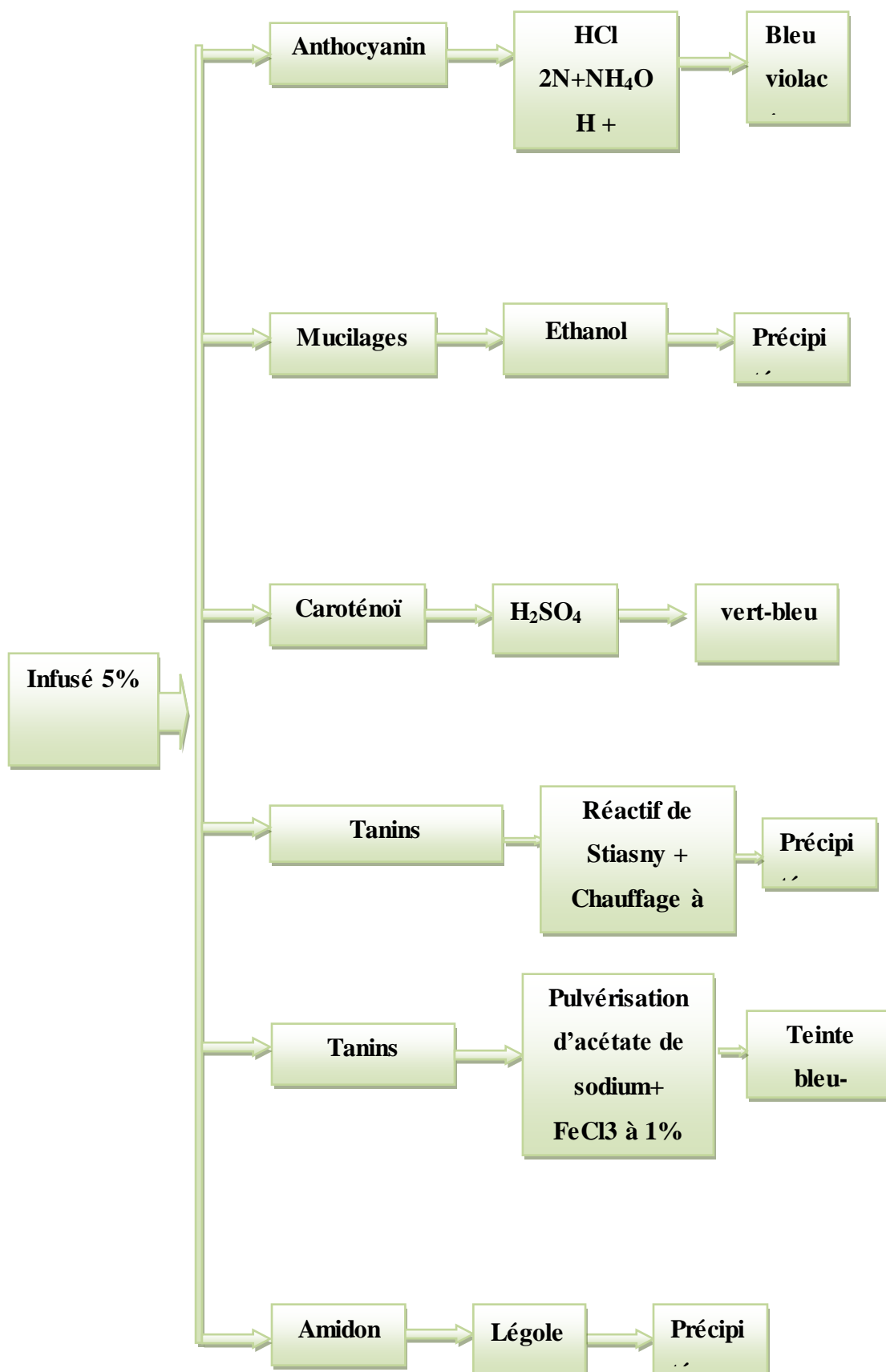


Fig.12 Schéma des tests phytochimiques réalisés par l'infusé 5%

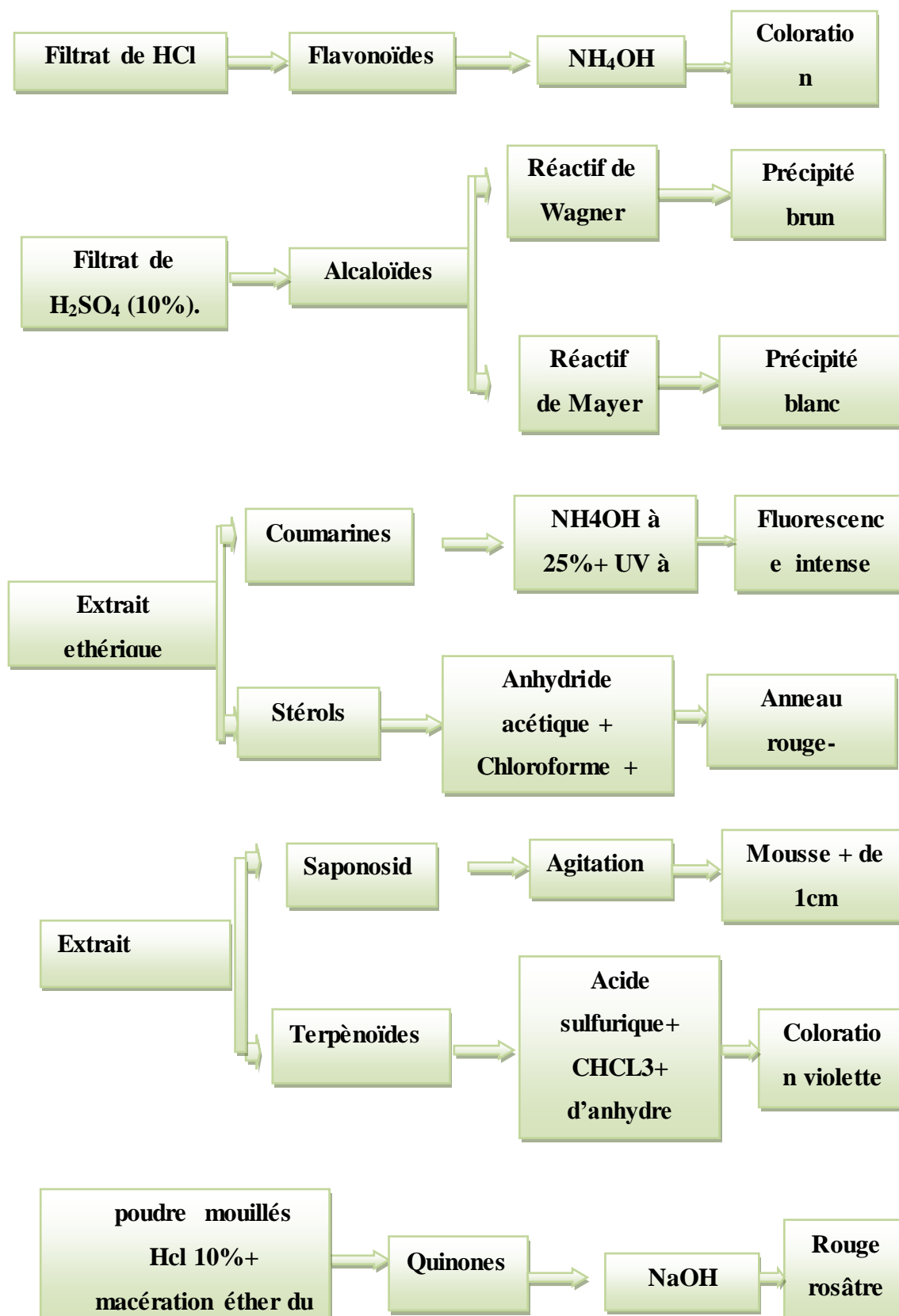


Fig.13 Schéma des tests phytochimiques

2.4. Criblage phytochimiques par chromatographie sur couche mince (CCM)

Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, cette méthode a été utilisée pour l'identification des différents photocomposés des extraits bruts (MET,AQ1,AQ2) et des fractions: CH, ACE et n BUT de feuilles *Ziziphus lotus* L.

❖ Phase mobile

Constituée par un mélange de solvants organiques, cinq systèmes ont été essayés :

Système 1 : Butanol / acide acétique / eau (06 /1.5/ 2.5).

Système 2 : Acétate d'éthyle / méthanol / eau (100/135/10).

Système 3 : toluène / acétate d'éthyle /méthanol (06 /1.5/ 2.5)

Système 4 : chloroforme /méthanol /eau(6.5/3.5/0.5)

Système 5 : acétone/eau (96 / 4)

❖ Dépôt de l'échantillon

L'échantillon à séparer est solubilisé dans le méthanol (50 mg/ml), il est déposé sur la plaque à l'aide d'une micropipette (10 µl) d'une façon perpendiculaire et linéairement, on peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte en même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyte.

❖ Développement des plaques

Chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque.

❖ Révélation

Les plaques sont séchées à température ambiante. A l'aide d'un crayon les différents spots sont marqués et observées sous lumière UV à 254 et 366 nm dans une chambre noire. Ces plaques sont révélées par pulvérisation avec :

- Trichlorure de fer (FeCl₃) à 10% et trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 1% dans l'éthanol. Après pulvérisation, la plaque est séchée à température ambiante

❖ Expression des résultats

Après migration et révélation, chaque spot est caractérisé par sa fluorescence sous UV, sa coloration après la révélation et son facteur de rétention (Rf), ceci est calculé via l'équation

$$Rf = d/D$$

d: Distance parcourue par le constituant et D: Distance parcourue par le solvant.

2.5. Etude quantitative

2.5.1 Dosage des polyphénols totaux (Vermerris et Nicholson, 2006).

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode Folin-Ciocalteu. Le principe de la méthode est fondé sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif « Folin Ciocalteu », qui est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique de couleur jaune. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène–tungstène de couleur bleu qui absorbe à 750 nm

100 µL d'extrait végétal dilué est mélangé avec 500 µL de réactif de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois dans de l'eau distillée. Après 5 minutes, 1.5 ml de carbonate de sodium (Na₂CO₃ 2%) sont ajoutés.

Après une incubation du mélange réactionnel pendant 1 heures à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (50 - 100- 150 - 200 µg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg d'EAG/g). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

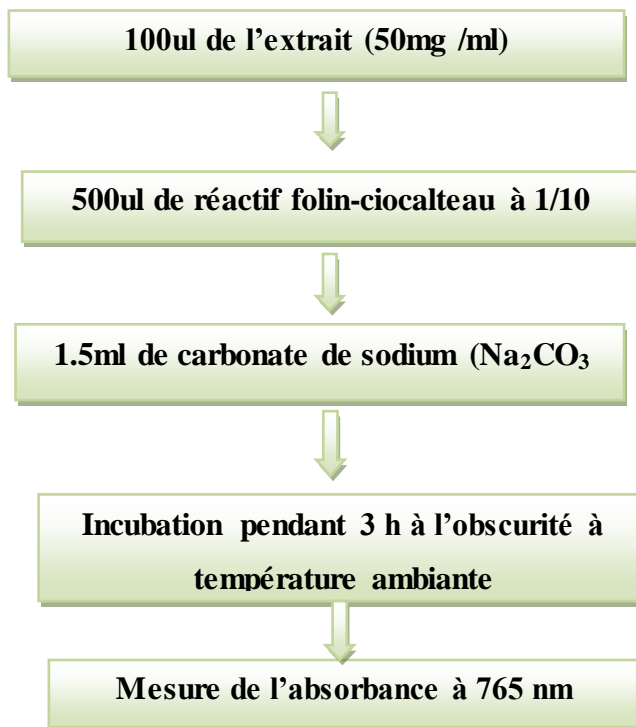


Fig.14 Schéma qui représente le protocole de dosage des polyphénols

Teneur en phénols totaux= $C \times VD/P_s$

C concentration des polyphénols en équivalent d'acide gallique déduit de la courbe

V : Volume de l'extrait D : facteur de dilution Ps : poids de la matière sèche.

2.5.2. Détermination des flavonoïdes totaux

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al ., 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits du *Ziziphus lotus*

D'abord, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la catéchine. Des solutions de l'ordre de 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L ont été préparées. Les réactifs utilisés sont : le nitrite de sodium, le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$, 2%)

1ml de l'extrait étudié (préparés dans le méthanol pour les extraits organiques et l'eau distillée pour l'extrait aqueux) et 1 ml. $AlCl_3$ (2% dans le méthanol) sont mélangés. 10 minutes l'absorbance de chaque mélange obtenu est directement mesurée au

spectrophotomètre UV visible à 430 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de la quercitrine par mg de matière sèche.

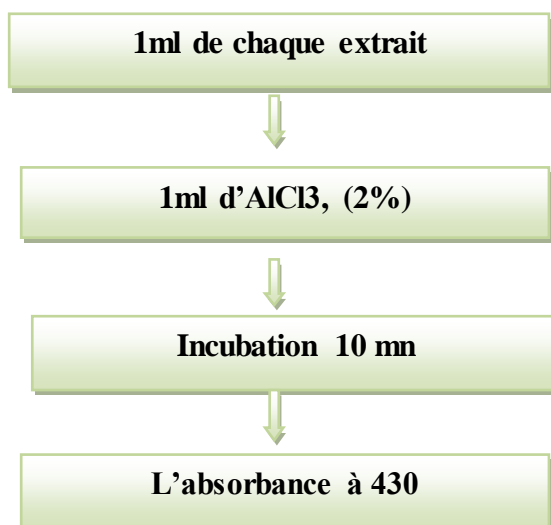


Fig.15 Schéma qui représente le protocole de dosage des flavonoïdes

2.5.3. Evaluation de l'activité antioxydant par la méthode au DPPH

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons utilisé la méthode basée sur le DPPH (diphényl picryl hydrayl) comme un radical relativement stable, selon le protocole décrit par (Prieto, 1999). DPPH à été solubilisé dans le méthanol absolu $6.10^{-5}M$.

Les extraits (2 mg/ml), ont été dilués à différents concentrations croissantes, 50 μL de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,024 g/l) fraîchement préparée, vortexer. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 μl du méthanol avec 1,950 μl d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Ainsi que le témoin positif acide ascorbique. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

$$I \% = ((Ac-At)/Ac) \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle négatif At : absorbance du test effectué

Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures \pm standard de déviation

❖ **Calcul des concentrations efficaces IC50 :**

sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de l'inhibition de l'oxydation de DPPH.

2.6. Analyse statistique :

Toutes les expériences ont été faites en triples, les résultats ont été exprimés en moyenne plus ou moins l'écart type.



Résultats et discussion

1. Résultats et discussion

Le présent travail porte sur l'étude phytochimiques et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de feuilles de la plante médicinale *Ziziphus lotus* L..

1.1. Détermination de la teneur en eau dans les feuilles du *Ziziphus lotus* L.

C'est la quantité d'eau qui s'évapore d'un échantillon lorsqu'on le met dans une étuve maintenue à 105°C pendant une durée déterminé

Afin de déterminer la teneur en eau dans les feuilles du *Ziziphus lotus* L., nous avons utilisé la méthode d'Audigie et al. (1978), dont le but est d'exprimer les résultats des constituants biochimiques par rapport à la matière sèche. L'appréciation de la teneur en matière sèche repose sur la détermination du taux d'humidité contenue dans l'échantillon à analyser.

Tab.2 La teneur en eau dans les feuilles du *Ziziphus lotus* L.

| Teneur en eau % | Teneur en matière sèche % |
|-----------------|---------------------------|
| 4.81± 0.84 | 95.18± 0.84 |

Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures ± SD

Comparativement aux valeurs trouvées chez d'autres variétés du même genre d'occurrence, le *Ziziphus mauritiana* (Grosskinsky, 1999), *Ziziphus spina christi* (Anthony, 2005) et *Ziziphus jujuba* (Catoire et al., 1994), dont la teneur en eau est comprise entre 46 à 85% et la valeur obtenue pour la même espèce (8,96 à 40.5%) (zoughlache, 2009 ; Halimi, 2016), la teneur en eau de nous échantillon est de l'ordre de 4.8%. Ce ci s'expliqué probablement par l'utilisation des feuilles sèches, l'analyse a été réalisée sur des échantillons achetés chez l'herboriste ce qui explique les faibles teneurs en humidité.

Les écarts de teneur en eau observés au sein d'une même espèce pourraient être expliqués par des stades de maturité différenciés liés à la phénologie des arbres et aux conditions climatiques

1.2. Rendement d'extraction

La préparation des feuilles de *Ziziphus lotus L.* a été effectuée selon la méthode proposée par Bekkara, (2006). Cette extraction est réalisée par l'utilisation d'une série de solvants à polarité croissante (Méthanol/ chloroforme / acétate d'éthyle / n-butanol) permettant ainsi la séparation des composés selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extracteurs.

Pour l'extrait aqueux -1-, c'est le résultat d'une simple infusion à 10%, suivant la méthode de Drissa *et al.* (2004) ; pour l'extrait aqueux -2-, c'est une décoction à 10%. Ces procédés d'extraction ont permis d'obtenir six extraits : AQ1, AQ2, MET, CH, ACE, n-BUT.

La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids des feuilles séchés pulvérisé sont représentés dans le tableau ci-dessous.

Tab.3 Rendements et caractéristiques des extraits des feuilles de *Ziziphus lotus L.*

| <i>Extraits</i> | Masse (g) | Aspect | couleurs | Le rendement (%) |
|---------------------|--------------|------------|-----------------|---------------------|
| <i>AQ1</i> | | Floconneux | marron | 8.6 |
| <i>AQ2</i> | | Floconneux | marron | 17 |
| <i>MET</i> | | poudre | Marron brunâtre | 19.26 |
| <i>CH</i> | | poudre | Vert foncé | 1.63 |
| <i>ACE</i> | | Pâteux | Vert | 0.82 |
| <i>n-BUT</i> | | Pâteux | Marron claire | 1.2 |

Les rendements représentés dans le tableau ci-dessus sont illustrés sous forme d'un histogramme permettant de faire une comparaison entre les rendements des différents extraits des feuilles:

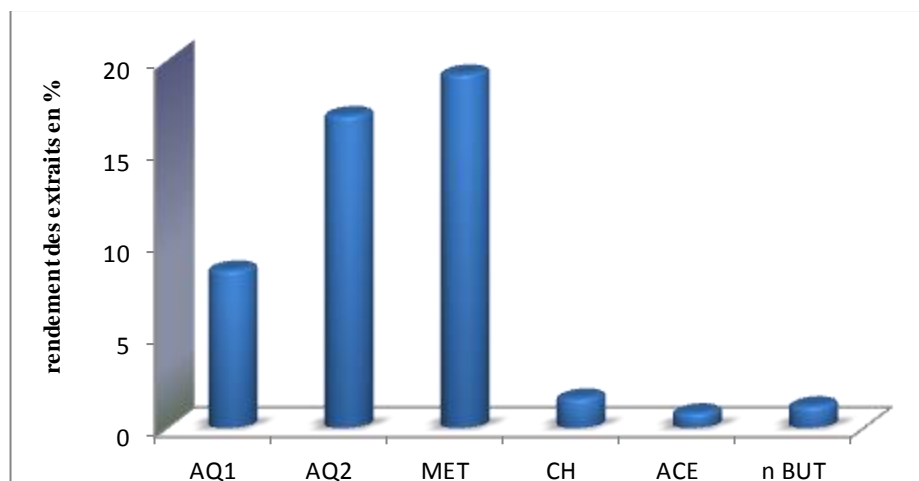


Fig.16 le pourcentage de rendement des extraits de *Ziziphus lotus L.*

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale a montré que l'extrait MET, AQ2 et AQ1 représente les rendements les plus élevés (19.265%, 19% et 8.6% respectivement), CH a un rendement de (1.63%), n-BUT (1.2%) et enfin ACE (0.82%) contrairement aux résultats de travail de Cheurfa et *al.*(2017) qui confirme que le rendement le plus élevé est celui de l'extrait aqueux (09,49 %).

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée affectent le rendement, et par conséquent affectent les activités biologiques. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante pour les extraits organiques, permet d'extraire le maximum des composants bioactifs et de prévenir leur dénaturation ou modification probable, dont la température élevée provoque l'inactivation des composés phénoliques, la diminution de leur extractibilité dans le solvant, aussi affecte leur quantification (Hagermann et *al.*, 2000).

1.3. Tests de mise en évidence de certains composés phytochimiques

1.3.1. Analyse qualitative

1.3.1.1 Tests phytochimiques préliminaires :

Les tests phytochimiques réalisés révèlent la présence de plusieurs familles de composés dont les résultats sont présentés dans le Tableau.

La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un examen sous la lumière ultraviolette, ou un changement de couleur spécifique.

Les résultats du screening phytochimique réalisé montrent la présence des flavonoïdes, mucilages, caroténoïdes, terpénoïdes, saponosides, oses et holosides ainsi que des tanins ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Borgi *et al.* (2007) et Diallo *et al.* (2004).

Les feuilles de *Ziziphus lotus* L. aussi contiennent des alcaloïdes ce qui s'oppose aux résultats de Cheurfa *et al.* (2017) probablement en raison de la partie examinée de la plante (racine). Cependant, Jossang *et al.* (1996) ont trouvé des alcaloïdes de type cyclopeptide dans *Z. mauritiana*.

L'amidon a été totalement absent dans les feuilles alors qu'est notée une forte présence des composés réducteurs dans les feuilles de ceci a été confirmé par Ghanam, 2014 qui a étudié d'autre partie de la plante (racine et fruits).

La richesse chimique de cette plante par les composés bioactifs pourrait expliquer son utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies telles que les diarrhées et les douleurs du rhumatisme les irritations de gorge et de broncho-pulmonaire et aussi, il agit en faveur de ses propriétés anti-inflammatoires, anti-hypertensives, antidiabétiques.

Tab.4 Résultats des testes préliminaires sur les déférents extraits de *Ziziphus lotus* L.

| composés | Résultat | Observation |
|--------------------|----------|---|
| alcaloïdes | +++ | Précipité brun (réactif de Wagner) Précipité blanc jaunâtre (réactif de Mayer) |
| Coumarines | – | Pas de fluorescence |
| Anthocyanes | ± | Anneau Bleu violacé |
| Mucilages | +++ | Précipité |
| Caroténoïdes | – | Pas de coloration |
| Terpénoïdes | +++ | Coloration violette |
| Stérols | +++ | Anneau rouge-brunâtre |
| Tanins gallique | + | Teinte bleu-noire |
| Tanins Cathéchique | ++ | Précipité |
| Saponines | +++ | Formation d'une mousse persistante après 15 mn |
| quinones | – | Pas Rouge rosâtre |
| flavonoïdes | ++ | Coloration jaunâtre |
| Ose et holosides | ++ | Coloration rouge brique |
| Amidon | – | Pas de précipite |

Les résultats sont interprétés comme suit:

- Test fortement positif : (+++)
- Test moyennement positif : (++)
- Test faiblement positif : (+)
- Test négatif : (-)

1.3.1.2. Résultat du criblage par CCM

Pour une caractérisation partielle des différents extraits du *Ziziphus lotus* L., on a testé plusieurs systèmes de détection. Le système solvant utilisé (chloroforme /méthanol/eau (6.5/3.5/0.5) a permis d'obtenir une très bonne séparation chromatographique.

La révélation est réalisée par de $AlCl_3$ 2% après l'observation sous UV 365nm. Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits sont reportés dans le tableau n° et les chromatogrammes sont illustrés dans la figure n° 19.

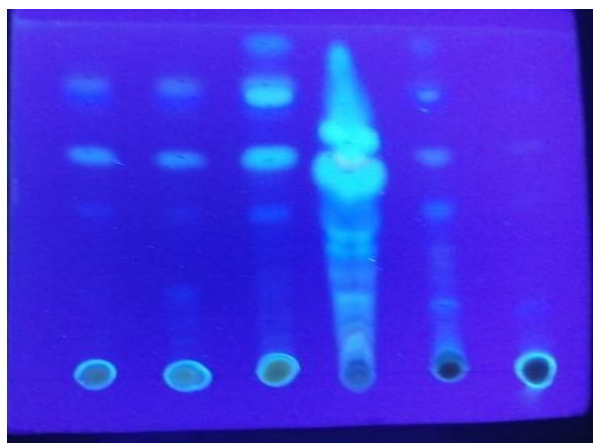


Fig.17 Plaque de la chromatographie sur couche mince des extraits des feuilles de *Ziziphus lotus* L. après révélation par $AlCl_3$ (sous UV à 365)

En se basant sur les résultats de chromatogrammes de S4, on a pu suspecter :

La présence des flavonones, Flavones, flavonols et flavonoïdes dans AQ, alors que le nombre des spots est élevés dans l'extraits AQ2 (5 spots) que le premier (3spots).

La présence des flavonoïdes, flavonols et aurones dans MET. Aussi on trouve flavones méthylés, des hydroxyflavonols et des flavonoïdes dans CH .

Dans ACE on trouve flavonones, flavonols et des hydroxyflavonols et en fin n-BUT relève aussi la présence des flavonones, aurones et flavonoïdes. Ce qui rassemble un peu aux résultats de (Ghedira, 2013 ; Djmai zoughlache, 2009 ;Benammar, 2011) probablement ce sont les parties de la plante qui se différent et aussi les solvants d'extraction .

Tab.5 Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits du feuilles de *Ziziphus lotus L.* dans S4, gel de silice.

| Extrait | spot | couleur | Rf | Suggestion des classes de flavonoïdes |
|--------------|------|--------------|------|--|
| AQ1 | 1 | Bleu | 0.43 | Flavonones, Aurones |
| | 2 | Violet | 0.71 | Flavones |
| | 3 | Jaune | 0.93 | Flavonols |
| AQ2 | 1 | Marron | 0.28 | Flavonoïdes |
| | 2 | Bleu | 0.43 | Flavonones, Aurones |
| | 3 | Violet | 0.65 | Flavones |
| | 4 | | 0.69 | |
| | 5 | Jaune | 0.93 | Flavonols |
| MET | 1 | Marron | 0.31 | Flavonoïdes |
| | 2 | Violet | 0.45 | Flavones |
| | 3 | Bleu | 0.67 | Flavonones, Aurones |
| | 4 | Jaune-marron | 0.89 | Flavonols, Flavonoïdes |
| CH | 1 | Rouge | 0.12 | Flavonoïdes |
| | 2 | Jaune | 0.21 | Flavonols |
| | 3 | Marron | 0.35 | Flavonoïdes |
| | 4 | Violet | 0.51 | Flavones |
| | 5 | Bleu-claire | 0.63 | Flavone méthylée ou hydroxy flavonols, |
| ACE | 1 | Jaune | 0.20 | Flavonols |
| | 2 | Violet | 0.37 | Flavones |
| | 3 | Bleu | 0.68 | Flavoneméthylée ou hydroxy flavonols |
| | 4 | Bleu-violet | 0.87 | Flavonones, Aurones, Flavones |
| | 5 | Marron | 0.89 | Flavonoïdes |
| n-BUT | 1 | Jaune | 0.16 | Flavonols |
| | 2 | Bleu | 0.39 | Flavonones, Aurones |
| | 3 | Marron | 0.89 | Flavonoïdes |

1.3.2. Analyse quantitative (Polyphénols et flavonoïdes)

Afin de caractériser les différents extraits préparés à partir des fruits du *Ziziphus lotus L.*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué.

Le choix du dosage de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués.

La méthode du dosage des polyphénols totaux est celle de Folin –Ciocalteu (Vermerris et Nicholson, 2006 avec quelque modifications). L'acide gallique a été utilisé comme standard. Tandis que celui des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (Bahorun et al ., 1996), en utilisant comme standard la quercétine. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents de chaque étalon par g de poids sec de la matière végétale.

Tab.6 Résultats de dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans les feuilles de *Ziziphus lotus L.*

| Extrait | Polyphénols (mg /ml) | Flavonoïdes (mg EQ/g) |
|---------|-------------------------|--------------------------|
| AQ1 | 28.73 ±0.59 | 0.51 ± 0.021 |
| AQ2 | 31.14 ±0.38 | 0.50 ±0.021 |
| MET | 18.79 ±0.45 | 0.26 ±0.035 |
| CH | 29.74 ±0.20 | 0.96 ±0.35 |
| ACE | 36.50 ±0.26 | 4.83 ±0.042 |
| n-BUT | 13.77 ±0.43 | 0.12 ±0.014 |

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que les extraits ACE, CH et AQ sont les plus riches en polyphénols mais les résultats sont nettement faibles par rapport aux résultats de Khouchlaa (2017), probablement ça rend compte à la partie de la plante et aussi les solvants extracteurs. Les extraits MET et n-BUT sont les plus pauvres.

Dans une étude faite sur cinq variétés du jujube chinois (*Ziziphus jujuba*),(Li et al. 2007) ont dosé les polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu dans des extraits polaires obtenus par extraction à base méthanol/eau (4 :1 v/v) ; le résultat obtenu pour l'un des cinq

variétés (*Ziziphus jujuba* Sanbianhong) ($5,18 \pm 0,29 \mu\text{g EAG/mg}$ d'extrait) est nettement très faibles à celui obtenu avec l'extrait aqueux du *Ziziphus lotus* (28.73 ± 0.59 et $31.14 \pm 0.38 \text{ mg/mg}$ d'extrait).

La variabilité des résultats est due à la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu qui est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. Le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tout les groupes hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines etc. (Vuorela, 2005 ; Gomez-Caravaca *et al.*, 2006). En effet, la teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, les pratiques culturelles, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Falleh *et al.*, 2008 ; Podsdek, 2007).

Le dosage de flavonoïdes totaux montre que la teneur la plus élevée est celle de l'extrait ACE, il renferme $4.83 \pm 0.042 \text{ mg .Eq catéchine/ g}$ d'extrait, les extraits MET et n-BUT contient une faible teneur en flavonoïde 0.26 ± 0.035 et $0.12 \pm 0.014 \text{ mg .Eq catéchine/ g}$ de l'extrait, ce qui s'oppose avec les résultats de Zoughlache (2009). Cette différence est probablement a raison de la partie étudié (fruits). Mais le résultat de l'extrait MET est très faible à celui de Khouchlaa (2017) ($26.79 \text{ mg .Eq catéchine/ mg}$ de l'extrait)

Aussi l'extrait aqueux obtenu par infusion possède une teneur un peu faible par rapport à l'extrait aqueux décocté, ce qui montre l'effet de la température sur les métabolites secondaire dans l'extrait de *Ziziphus lotus* L.

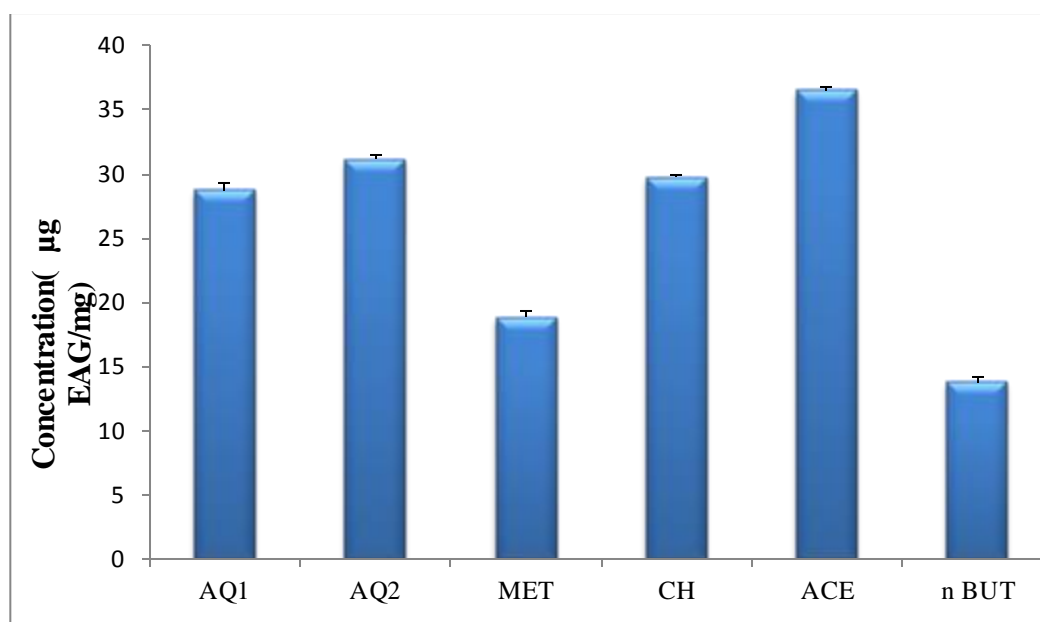


Fig.18 Teneur en polyphénols totaux pour les différents extraits des feuilles de *Ziziphus lotus L.*

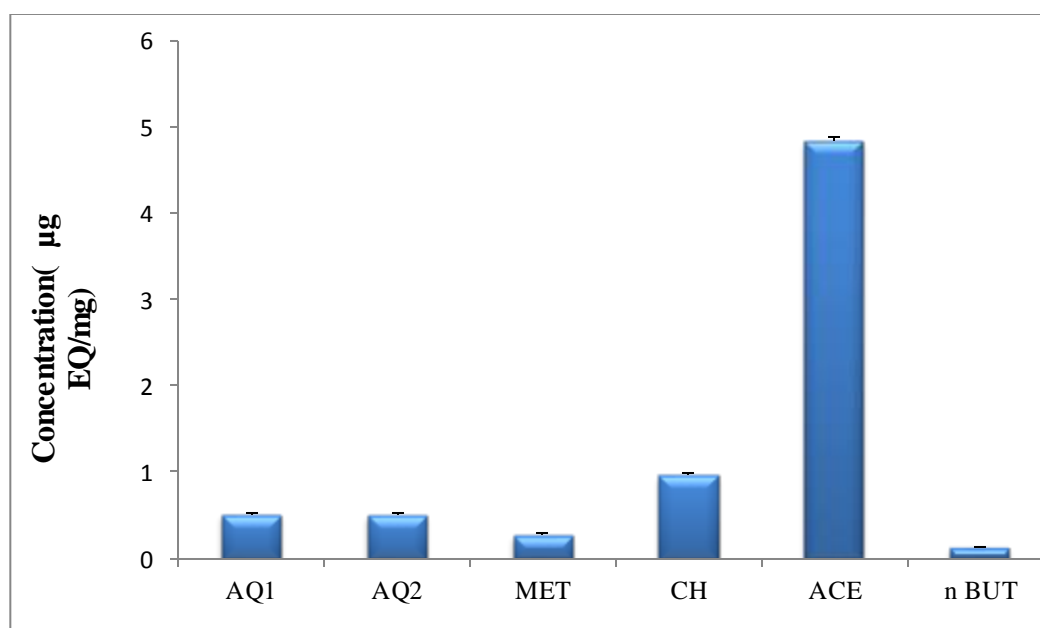


Fig.19 Teneur en flavonoïdes pour les différents extraits des feuilles de *Ziziphus Lotus L.*

1.4. Évaluation de l'activité antioxydante de DPPH :

L'activité antioxydante des différents extraits du *Ziziphus lotus L.* vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm

Le DPPH (diphénylpicrylhydrazyl) est un radical libre organique, toujours utilisé comme un réactif pour évaluer l'activité antiradicalaire des antioxydants (Oyaizu,1996).

Le DPPH est caractérisé par son adaptation à plusieurs échantillons dans une courte durée, aussi il est assez sensible pour détecter les ingrédients actifs à des basses concentrations, à cet effet, il a été employé pour le criblage des activités antiradicalaire des extraits végétaux (Yi et al ., 2008).

Les pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour le contrôle positif (Acide Ascorbique), sont représentés dans le graphe ci-après :

L'IC50 est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Plus la valeur de IC50 est petite, plus l'activité antioxydante de l'extrait testé est grande (Pokorny et al., 2001).

Tab.7 Valeurs des IC₅₀ trouvées pour les extraits des feuilles de la plante et standard

| Extraits et standard | IC%(µg /ml) |
|-------------------------|--------------|
| AQ1 | 3966 |
| AQ2 | 370 |
| MET | 4642 |
| CH | - |
| ACE | 203 |
| n-BUT | 4787 |
| Acide ascorbique | 2.4 |

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD

Nos résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (Figure.), révèlent que tous les extraits testés ainsi que l'acide ascorbique pris comme référence sont des anti-radicalaires seulement l'extrait CH ne présente aucune activité antiradicalaire.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus fig. révèlent que les extraits du *Ziziphus lotus* L. possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante.

A des fins comparative, un antioxydant standard est utilisé (acide ascorbique), il a montré une activité antiradicalaire puissante avec des IC_{50} de l'ordre de 2.43 $\mu\text{g/ml}$ supérieur à celle trouvée par (Djemai zoughlache ., 2009) $1,44\pm 0,07 \mu\text{g/ml}$.

L'extrait ACE du *Z lotus* a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée (avec IC_{50} d'ordre 203 $\mu\text{g/ml}$ suivie par l'extrait AQ2 (IC_{50} d'ordre 370 $\mu\text{g/ml}$) et en dernier l'extrait MET et n-BUT présente une IC_{50} supérieur à 4000 $\mu\text{g/ml}$

l'extrait AQ1 est parmi les extraits les moins actifs, avec une IC_{50} de l'ordre 3966 $\mu\text{g/ml}$, il y a une grande différence entre AQ1 et AQ2, par rapport au contrôle positif acide ascorbique (2.43 $\mu\text{g/m}$)

Ce qui s'oppose aux résultats de (Djemai zoughlache ., 2009), puisque ils ont étudiés les fruits de cette plante aussi ils ont fait l'extraction des principes actifs par des extracteurs différents .

L'activité antioxydante des extraits est donc relativement dépendante du taux des polyphénols et flavonoïdes dans les différents extraits.

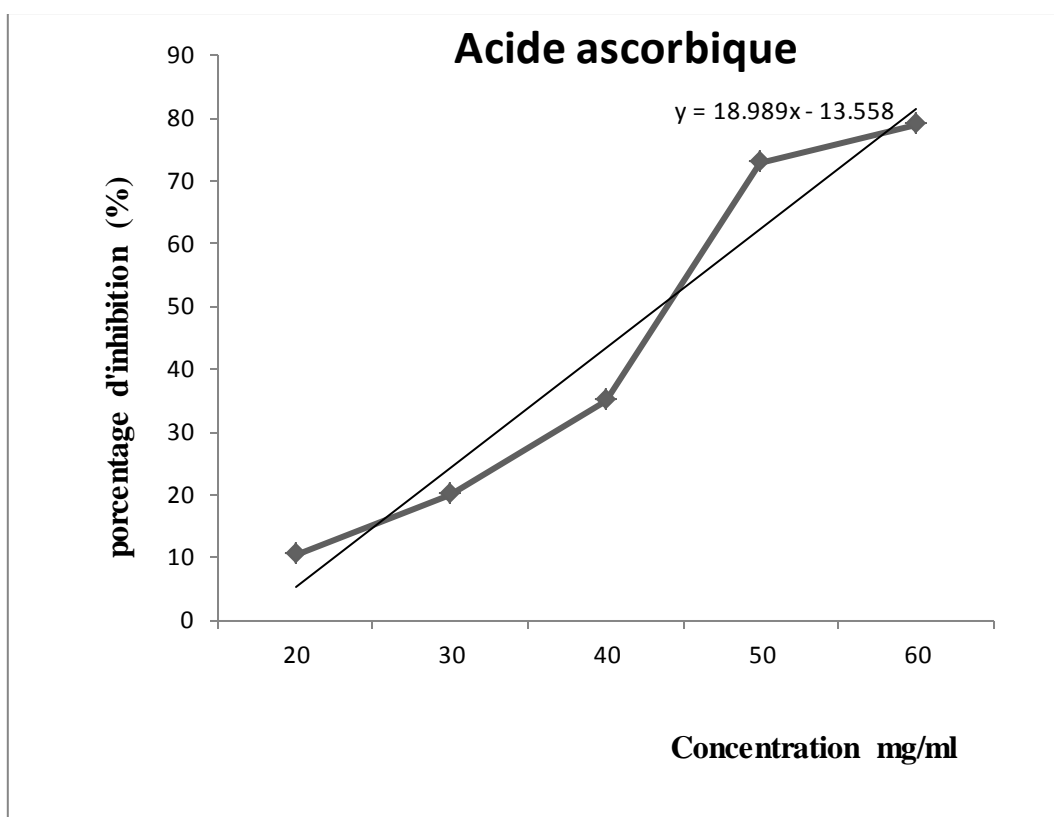


Fig.20 Pourcentages d'inhibition du DPPH• en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique

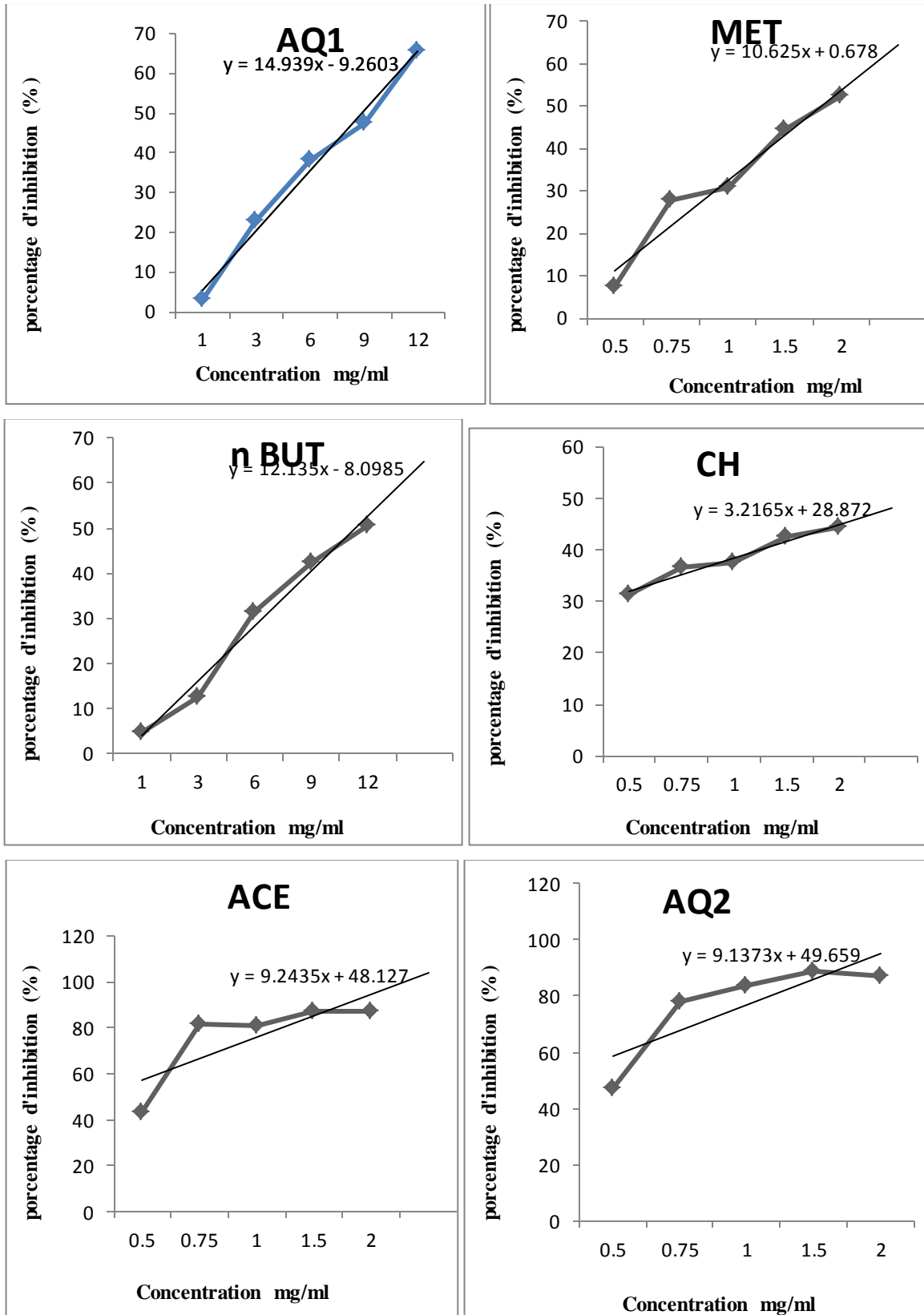


Fig.21 Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH \cdot en fonction des différentes concentrations utilisées pour les différents extraits des feuilles de *Ziziphus lotus* L..



Conclusion

Conclusion

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale; une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique. Ce travail avait pour objectifs d'évaluer l'activité anti-oxydante des extraits (AQ1, AQ2, MET, CH, ACE et n-BUT) du *Ziziphus Lotus L.*, relativement à leur teneur de polyphénoliques flavonoïdes.

Le screening phytochimiques réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols, des triterpènes, des coumarines, des alcaloïdes

Les rendements des extraits réalisés sur les feuilles de la plante sont relativement importants. Pour l'extrait MET, le rendement est le plus élevé avec plus de 19% suivi par celui des extraits AQ1 et AQ2 avec 17% et 8%. Les différentes fractions effectuées ont des rendements allant de 0.82 à 1.6 %.

L'analyse quantitative des extraits du *Ziziphus lotus L.* est représentée par le dosage spectral des deux substances biactives : les polyphénols, les flavonoïdes, nos résultats montrent que l'extrait ACE est le plus riche en polyphénols avec une teneur de 36.50 ± 0.26 mg EAG/mg d'extrait suivis par l'extrait CH avec une teneur de 29.74 ± 0.20 mg EAG/g d'extrait et AQ2 avec une teneur de 31.14 ± 0.38 . Cependant, nous avons remarqué une faible teneur en polyphénols dans l'extrait n BUT et MET. Pour les flavonoïdes on trouve 4.83 ± 0.042 EQ/mg dans ACE , 0.96 ± 0.35 EQ/mg dans CH et 0.50 ± 0.021 EQ/mg dans AQ2

Aussi AQ1 obtenu par infusion possède une teneur un peu faible par rapport à l'extrait AQ2 décocté, ce qui montre l'effet de la température sur les métabolites secondaire dans l'extrait de *Ziziphus lotus L.*

La technique utilisée pour étudier l'activité antioxydante des différents extraits est le test au DPPH révèle que ces extraits (ACE et CH) sont les plus actifs comme piègeur du radical DPPH dont l'extrait ACE qui a l'effet antiradicalaire le plus puissant, suivi par l'extrait CH alors que les extraits MET et n BUT ont montré une activité antiradicalaire faible par rapport à IC50 de l'acide ascorbique 2.43 mg/ml.

En fin, Nous pensons montrer à travers ce travail que les plantes constituent un réservoir très intéressant pour la recherche dans le futur, l'ensemble de ces résultats obtenus in-vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abdel-Zaher A.O., Salim S.Y., Assaf M.H., Abdel-Hady R.H., (2005). Antidiabetic activity and toxicity of *Ziziphus spina-christi* leaves. *J. Ethnopharmacol*, 101:129-138.

Abu-Zarga M., Sabri S., Al-Boudi A., Ajaz S., Sultana N., Rahman A-U., (1995). New cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus lotus*. *Journal of Natural Products*, 58: 504-511.

Adachi Y., Oyaizu N., Than S., Mccloskey T.W., Pahwa, S., (1996). IL-2 rescues in vitro lymphocyte apoptosis in patients with HIV infection: correlation with its ability to block culture-induced down-modulation of Bcl-2. *The Journal of Immunology*, 157(9): 4184-4193.

Amara N., Melouk F.Z., (2016). Activité Antimicrobienne des Extraits des Feuilles de la Vigne Sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*). *Algerian journal of Natural Products*, 4(3): 358-366.

Antwerpen P.V., (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myelo peroxydase/ peroxyde d'hydrogène/chlorure. Doctorat en Science Pharmaceutiques. Bruxelles, Belgique.

Aref M., Heded M., (2015). Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une Plante médicinale *Cleome arabica* L. (Région d'Oued Souf). mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master académique filière en biochimie appliquée . Université Echahid Hamma Lakhdar d'El Oued

Audigie C., Figarella J., Zonszaain F. (1978). Manipulation d'analyse biochimique. Doin (Ed). p 274, Paris.

Badouard C., (2006). Les lésions des acides nucléiques: détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation. Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Pinkas M., (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11): 1086 1089.

Bahorun T.,(1998). Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. In Second Annual Meeting of Agricultural Scientists p 83.

Belkheiri N., (2010). Dérivés phénoliques à activités Antiathérogènes. Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

Benammar C.E., (2011). Effets antioxydants et immunomodulateurs d'une plantemedicinale nord africaine, *ziziphus lotus* L. (sedra): étude des différents extraits (doctoral dissertation).

Benjabeur S., (2012). Evaluation du pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits végétaux (cas de la grenade punica-granat) en vue de leur utilisation alimentaire. Mémoire en vue de l'obtention de diplôme de magister en science agronomique. École nationale supérieure agronomique harrach. Alger.

Bérubé-Gagnon J., (2006). Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Université du Québec à Chicoutimi.

Bidri M., Choay P., (2017). Regain d'intérêt pour la grenade, un fruit majestueux aux multiples propriétés. *Phytothérapie*, 15(2): 91-103.

Bonnet P., Gehrke J., Seshadri P., (2001). Towards sensor database systems. In International conference on mobile data management. Springer Berlin Heidelberg, p 3-14.

Borgi W., Chouchane N., (2006). Activité anti-inflammatoire des saponosides et des flavonoïdes des écorces des racines de *Ziziphus lotus* L. *Revue des Régions Arides*, p 289-286.

Borgi W., Ghedira K., Chouchane N., (2007). Antiinflammatory and analgesic activities of *Ziziphus lotus* L root barks. *Fitoterapia*, 78(1): 16-19.

Borgi W., Recio M.C., Rios J.L., Chouchane N., (2008). Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Ziziphus lotus* L. *Lam. South African journal of botany*, 74: 320-324

Boudjouref M., (2011). Étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*artemisia campestris* L. mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en biochimie appliquée. Université Ferhat Abbas, Sétif

Bouhadjra K., (2011). Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge (Doctoral dissertation, UMMTO).

Bruneteau G., Demeret S., Meininger V., (2004). Physiopathologie de la Sclérose Latérale Amyotrophique : approches thérapeutiques. *Rev Neurol*, 160 (2): 235-241.

Bruneton J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème éd, p 1120, Paris.

Carange J., (2010). Rôle antioxydant et anti-apoptotique des brassinostéroïdes, une nouvelle stratégie de neuroprotection. Mémoire présenté à l'université du Québec à trois-rivières comme exigence partielle de la maîtrise en biophysique et biologie cellulaires.

Cheurfà M., Allem R., Zabel K., Aichouni W., Medjkane M.,(2017) Étude des effets des extraits des racines de *Glycyrrhiza glabra* L. et *Ziziphus lotus* L. sur quelques bactéries pathogènes de l'Homme. *Phytothérapie*, p 1-7.

Cheurfà M., Allem R.,(2016). Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla*. *Phytothérapie*, 14(3): 181-187.

De la pradilla., (1979) Plantes médicinales contre douze parasitoses fréquentes. Ouagadougou.

Debray M., Jacquemin H., Razafindrambo R., (1971). Phytochemical Screening of *Pentadesma butyracea* Sabine (*Clusiaceae*) Acclimated in Benin by GC/MS. Travaux et documents de l'Orstom, Paris. France.(2013): 8.

Djemai Zoughlache S., (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Ziziphus lotus* L. (Doctoral dissertation, Université de Batna 2).

Dohou R., Yamni K., Tahrouch S., Hassani L. I., Badoc A., Gmira N., (2003). Screening phytochimique d'une endémique iberomarocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin-Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142(1/4): 61-78.

Drissa D., (2004). Influence des pratiques culturelles et du type de sols sur les stocks et pertes de carbone par érosion en zones soudanienne du Mali. Gestion de la biomasse, érosion et séquestration du carbone, IRD. *Bulletin du Réseau Erosion*, 22: 193-206.

El aloui-kefi M., (2013). Suivi de la phénologie et caractérisation morpho-chimique comparés de quatre écotypes de *ziziphus jujuba* (miller) dans la station expérimentale de

rouhia (tunisie) (semi-aride supérieur). Thèse de doctorat En sciences agronomiques. Université de cartage.

El Hachimi F., El Antari A., Boujnah M., Bendrisse A., Alfaiz C., (2015). Comparaison des huiles des graines et de la teneur en acides gras de différentes populations marocaines de jujubier, de grenadier et de figuier de barbarie. *J Mater Environ Sci*, 6: 1488-502.

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5): 372-379.

Favier, A., (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, p 108.

Fendri C., Mechri A., Khiari G., Othman A., Kerkeni A., Gaha L., (2006). Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la schizophrénie: revue de la littérature. *L'Encéphale*, 32(2): 244-252

Fiorucci S., (2006). Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Doctoral dissertation, École doctorale Sciences fondamentales et appliquées, Nice.

Gazengel Y., (2004). Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. *Polyphénols*, p 33, Paris.

Ghedira K., (2013). *Ziziphus lotus* (L.) Desf. (Rhamnaceae): jujubier sauvage. *Phytothérapie*, 11(3): 149-153.

Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M., (2001). Le préparateur en pharmacie, dossier 2, Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie. Homéopathie. Ed. TEC et DOC.

Goudable J., Favier A., (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2): 115-120.

Guignard J.L., (1996). *Abrégés de Botanique*. 10^{ème} édition Masson, Paris.

Haddouchi F., Chaouche T.M., Halla N., (2001). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, p1-9.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., Chapelle J.P., (2007). Le stress oxydant. *Revue Medicale de Liege*, 62(10): 628-38.

Hanson J.R., (2003). Natural products: the secondary metabolites . Royal Society of Chemistry, 17.

Hart K. J., Yanez-Ruiz D.R., Duval S.M., Mcewan N. R., Newbold C.J., (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1): 8-35.

Heimler D., Vignolini P., Dini M. G., Vincieri F. F., Romani A., (2006). Antiradical activity and polyphénols composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food chemistry*, 99(3): 464-469.

Hellal Z., (2011). Des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus Application sur la sardine (*Sardina Pilchardus*). Mémoire de magistère, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. p1-8-45-78.

Humblet M. F., Godeau J. M., (2005). L'haptoglobine, marqueur protéique de l'inflammation aiguë, dans l'espèce bovine. In *Annales de Médecine Vétérinaire. Annales Medecine Veterinaire* , 149(1): 20-33.

Kanoun K., (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de *Myrtus communis* L.(Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine).

Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogugbuaja V.O., (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3): 179-182.

Kebbab R., (2014). Etude de pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olive de la variété Chemlal : évaluation de l'activité avant et apes déglucosélation. Mémoire de magister en biochimie appliquée aux bio-industries. Université mouloud mammri de tizi – ouzou.

Kehili N., Saka S., Aouacheri O., (2017). L'effet phytoprotecteur de la nigelle (*Nigella sativa*) contre la toxicité induite par le cadmium chez les rats. *Phytothérapie*, p 1-10.

Khouchlaa A., Talbaoui A., El Idrissi A. E. Y., Bouyahya A., Lahsen S. A., Kahouadji A., Tijane M., (2017). Détermination des composés phénoliques et évaluation de l'activité

litholytique in vitro sur la lithiase urinaire d'extrait de *Ziziphus lotus* L. d'origine marocaine. *Phytothérapie*, p 1-6.

Kotelle K., Ree T.R., (2001). Tannins: classification and definition. *Journal of royal society of chemistry*, 18: 641-649.

Krief S., (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN, Paris.

Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y., (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25): 7292-7295.

Li J. W., Ding S.D., Ding X.L., (2007). Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Ziziphus jujuba*. *Jinsixiaozao. Journal of food engineering*, 80(1): 176-183.

Makkar H.P.S., (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small ruminant research*, 49(3): 241-256.

Marfak A., (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides (doctoral dissertation, cea saclay).

Mccalley D.V., (2002). Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *Journal of chromatography A*, 967(1): 1-19.

Menkovic N., Savikin K., Tasic S., Zdunic G., Stešević D., Milosavljevic S., Vincek D., (2011). Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 97-107.

Paris R., Dilleman G., (1960) Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue pharmacologique. In: *Plantes médicinales des régions arides*. Unesco, Paris.

Peromy S., (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (Lemur catta). Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS.

Perret C., (2001). Analyse de tannins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers: Fr (Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel).

Podsędek, A., (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1): 1-11.

Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S., (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complementary and alternative medicine*, 6(1): 39.

Prieto P., Pineda M., Aguilar M., (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 269: 337-41

Provost M., (1991). Des plantes qui guérissent. BQ.

Qnais EY., Elokda AS., Abu Ghalyun Y., Abdulla F.A., (2007). Antidiarrheal activity of the aqueous extract of *Punica granatum* (Pomegranate) Peels. *Pharm Biol* 45:715-20.

Quezel P., Santa S., (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et régions désertiques méridionales. Tome 2. Centre national de la recherche, p 565, Paris.

Ren Z.A., Che G.C., Dong X.L., Yang J., Lu W., Yi W., Zhao Z.X., (2008). Superconductivity and phase diagram in iron-based arsenic-oxides $\text{ReFeAsO}_{1-\delta}$ (Re= rare-earth metal) without fluorine doping. *EPL (Europhysics Letters)*, 83(1): 17002.

Rizk A. M., (1982). Constituents of plants growing in Qatar: A chemical survey of sixty plants. *Fitoterapia*, 53(1-2): 35-44.

Rsaissi N., Bouhache M., (2002). La lutte chimique contre le jujubier. Transfert de technologie en agriculture, 94: 1-4.

Rsaissi N., Bouhache M., Bencharki B., (2013). Potentiel allélopathique du figuier de barbarie «*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill» sur la germination et la croissance du jujubier «*Ziziphus lotus* L. Desf.».

Sharma G., (2013). Role of phytochemicals and nucleic acids in solving taxonomic problems. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B, p 1-5.

Souley B., (2005). Political communication on presidential websites: A comparative analysis and policy implications of discourse between the 2000 and 2004 campaigns.

Suksamrarn S., Suwannapoch N., Aunchai N., Kuno M., Ratananukul P., Haritakum R., Jansakul C., Ruchirawat S., (2005). Ziziphine N. O. P. New antiplasmodial cyclopeptides alkaloids from *Ziziphus oenoplia* var. *brunoniana*. Tetrahedron, 61: 1175-1180.

Tessier F., Marconnet, P., (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. Science et sports, 10(1): 1-13.

Trease G.E., et Evans W.C., (1987). Tratado de farmacognosia 160: 7418-1987.

Vermerris W. Nicholson R., (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht, 101-4020-5163-8

Wallace R. J., (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proceedings of the Nutrition Society, 63(04): 621-629.

Wilfred V., Nicholson R., (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer.

Ziegler J., Facchini, P. J., (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. Annu. Rev. Plant Biol., 59: 735-769.



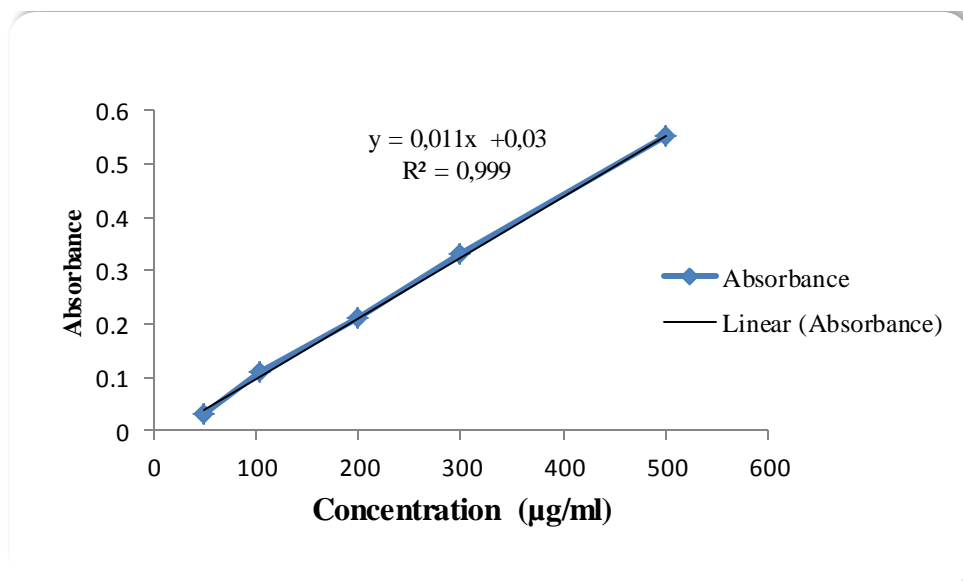
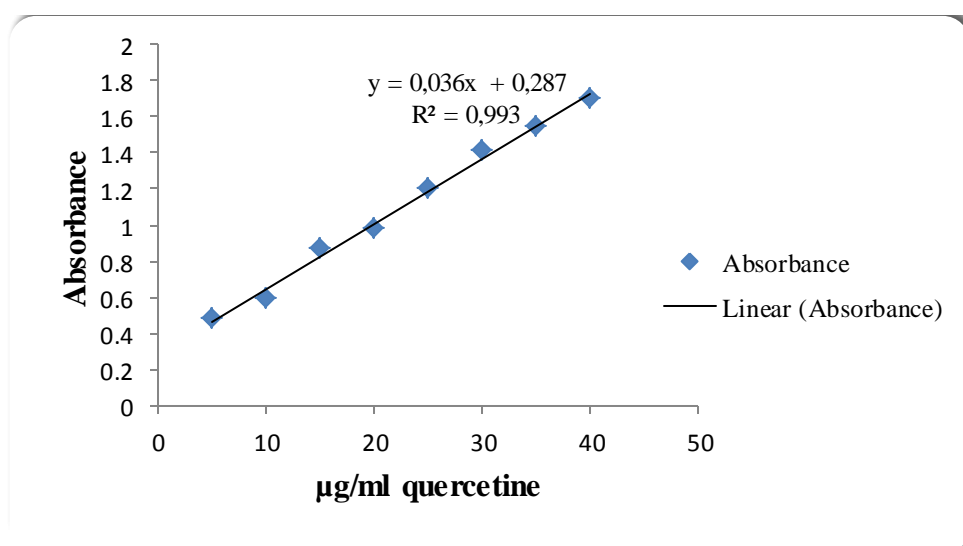
Annexes

Annexe 01 : Préparation des réactifs :

Réactif de MAYER Iodure de potassium 25 g Chlorure mercurique: 6,77 g Eau distillée qsp 500ml

Réactif de DPPH 1-1 diphényle 2 picril hydrazyle 2 .4 mg par 100 ml de méthanol

Reactif de Stiasny : a 10 ml de formol à 40%, ajouter 5ml d' Hcl concentré.

**Annexe 02 : Droite d'étalonnages de l'acide gallique (moyenne ± SD).****annexe 03 : Droite d'étalonnages de la quercetine (moyenne ± SD)**



Annexe 04 : évaporateur rotatif

Présenté par : Assia KEFALI
Khaoula HARRATH

Date de soutenance :04 /06/2017

Thème :

Investigation phytochimique et étude –in vitro- de l'activité antioxydante des extraits de feuilles Zizyphus lotus L. de la wilaya de Khenchela

Résumé :

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits préparés à partir du feuilles du *Zizyphus lotus*, L'analyse qualitative de ces extraits par CCM a révélé la présence des flavonoïdes dans différents extraits , ce ci est confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage, des composés phénoliques, des flavonoïdes dont les extraits ACE, CH et AQ2 sont les plus riches en ces molécules , où la teneur en composés phénoliques est 36.50 ± 0.26 EAG/mg d'extrait pour l'extrait ACE et 29.74 ± 0.20 EAG/mg d'extrait pour l'extrait CH et 31.14 ± 0.38 et EAG/mg d'extrait pour l'extrait AQ2. Pour les flavonoïdes on trouve 4.83 ± 0.042 EQ/mg dans ACE , 0.96 ± 0.35 EQ/mg dans CH et 0.50 ± 0.021 EQ/mg dans AQ2.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de test du DPPH a montrer que le pouvoir antioxydant des extraits ACE, CH et AQ2 est le plus élevé dont l'extrait ACE représente l'extrait le plus actif, avec une activité antioxydante IC50 de l'ordre de $203 \mu\text{g/ml}$. A partir de ces résultats, on peut dire que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits à pouvoir antioxydant puissant.

Mots clés : *Zizyphus lotus*, activité antioxydante, composés phénoliques, flavonoïdes .