

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE -EL HADJ LAKHDER -BATNA  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

En Biologie

Option : Biochimie Appliquée

Présenté par

DJEMAI ZOUGHLACHE SOUMIA

THEME

Etude de l'activité biologique des extraits  
du fruit de *Zizyphus lotus* L.

Devant le jury :

- |                              |   |              |
|------------------------------|---|--------------|
| * M <sup>me</sup> HAMBABA L. | Maître de conférences, université de Batna            | Présidente   |
| * M <sup>r</sup> YAHIA M.    | Maître de conférences, université de Batna            | Rapporteur   |
| * M <sup>r</sup> LAROUI S.   | Maître de conférences, université de Batna            | Examineur    |
| * M <sup>me</sup> ZAAMA D.   | Maître de conférences, université de Constantine      | Examinatrice |
| * M <sup>r</sup> YAHIA A.    | Maître de conférences, université d'Oum<br>El Bouagui | Examineur    |

Année Universitaire : 2008/2009

## **Remerciement**

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

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à M<sup>r</sup> YAHIA M, Maître de conférences à la faculté des sciences Université de Batna pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.*

*J'exprime mes vifs remerciements à M<sup>me</sup> HAMBABA L, Maître de conférences à l'Université de Batna pour sa précieuse aide et ses conseils, et pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire*

*Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance au M<sup>r</sup> ABDEDDAIM M, Maître assistant- chargé de cours de l'Université de Batna tout d'abord pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir inspiré le sujet ensuite pour ses orientations judicieuses.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à M<sup>me</sup> ZAAMA D, Maître de conférences Université de Constantine pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de faire partie de jury.*

*Mes remerciements à M<sup>r</sup> YAHIA A, Maître de conférences Université de Oum ElBougui d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.*

*Mes remerciements vont également à M<sup>r</sup> LAROUI S, Maître de conférences Université de Batna d'avoir accepter de faire partie du jury.*

*J'exprime mes vifs remerciements aux M<sup>r</sup> ABERKANE M-CH et M<sup>r</sup> AYACHI qui nous permet de réaliser une grande partie de mon travail au sein de leurs laboratoires.*

*En guise de reconnaissance, je dédie ce travail*

*à mes chers parents, à ma famille*

*ainsi qu'à toutes mes amies.*

# Sommaire

Liste des tableaux  
Liste des Figures  
Introduction générale

## Partie I

### Etude bibliographique

#### Chapitre I. Généralités sur le *Zizyphus lotus*

I-1-Description botanique du <i>Zizyphus lotus</i> .....	1
I-2-Classification botanique.....	1
I-3-Répartition géographique.....	2
I-4-Composition biochimique du <i>Zizyphus lotus</i> .....	3
I-5-Activités biologiques et thérapeutiques du <i>Zizyphus lotus</i> .....	4
I.5.1. Activités anti-inflammatoires et analgésiques.....	4
I.5.2. Activités anti-fongiques et anti-mollusques .....	4
I.5.3. Activités anti-ulcérogéniques.....	4
I.5.4. Autres activités .....	5

#### Chapitre II. Les composés phénoliques

II.1. les flavonoïdes.....	7
II.1.1.Localisation et distribution.....	7
II.1.2.Structure chimique et classification.....	7
II.1.3.Activités biologiques des flavonoïdes.....	8
II.2. Les tanins.....	12
II.2.1. Localisation et distribution.....	12
II.2.2.structure chimique et classification.....	12
II.2.3.Activités biologiques et thérapeutiques des tanins.....	14

#### Chapitre III : Les espèces réactives oxygénées et stress oxydant

III.1.les espèces réactives oxygénées.....	19
III.2. Sources des espèces réactives oxygénées.....	20
III.2.1.sources exogènes.....	20
III.2.2. Sources endogènes.....	21
III. 3. Stress oxydant.....	23

III.4. Les antioxydants.....	23
III.4.1. Les antioxydants enzymatiques.....	23
III.4.2. les antioxydants non enzymatiques.....	24

## Partie II

### Etude Expérimental

#### Chapitre I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel.....	25
I.1. 1. Matériel végétal.....	25
I.2. Méthodes.....	25
I.2.1. Détermination de la teneur en eau.....	25
I.2.2. Détermination de la teneur en cendre.....	26
I.2.3. Préparation des extraits à partir des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	26
I.2.3.1. Extractions avec des solvants à polarité croissante.....	26
I.2.3.2. Extrait aqueux .....	26
I.2.4. Analyse des extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	27
I.2.4.1. Analyse qualitative des extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	27
I.2.4.1.1. Tests préliminaires.....	27
I.2.4.1. 2. Chromatographie sur couche mince.....	28
I.2.4.1. 3. Chromatographie liquide à haute performance HPLC –RP-C18....	28
I.2.4.2. Analyse quantitative des extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	29
I.2.4.2.1. Dosage des polyphénols.....	29
I.2.4.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	29
I.2.4.2.3. Dosage des tanins condensés.....	30
I.2.5. Tests des activités biologiques.....	30
I.2.5.1. Activité antimicrobienne.....	30
I.2.5.2. Tests d'activité antioxydante.....	31
I.2.5.2.1. Test du blanchissement du $\beta$ carotène.....	31
I.2.5.2.2. Effet scavenger du radical DPPH.....	32
I.2.5.2.3. Analyses statistiques.....	32

## **Chapitre II. Résultats et discussion**

II.1. Détermination de la teneur en eau dans les fruits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	33
II.2. Détermination de la teneur en cendre dans les fruits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	33
II.3. Préparation des extraits à partir des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	34
II.4. Analyse des extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	35
II.4.1. Analyse qualitative des extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	35
II.4.1.1. Test préliminaire.....	35
II.4.1.2. Analyses chromatographiques.....	36
II.4.1.2.1. Chromatographie sur couche mince.....	36
II.4.1.2.2. Chromatographie liquide à haute performance HPLC –RP-C18.....	39
II.4.2. Analyse quantitative des extraits des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	44
II.5. Activités biologiques.....	49
II.5.1. Activité antimicrobienne des extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	49
II.5.2. Activité antioxydante.....	52
II.5.2.1. Test du blanchissement du $\beta$ -carotène.....	52
II.5.2.2. Effet scavenger du radical DPPH.....	56

### **Conclusion générale**

### **Références bibliographiques**

## Liste des abréviations

**AAR** : Activité antioxydante relative

**ANOVA** : Analyse de variance

**APR** : Pouvoir antiradicalaire

**AQ**: Extrait aqueux

**ATTC** : Collection du type Américain de culture

**BHT**: Butylated hydroxytoluen

**BAW**: n-Butanol/Acide acétique/eau

**CCM**: Chromatographie sur couche mince

**DMSO**: Diméthylsulfoxyde

**DPPH**: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

**EC<sub>50</sub>**: Concentration effective à 50%

**EDCM**: Extrait dichlorométhanique

**ET**: extrait éthérique

**HPLC**: Chromatographie liquide à haute performance

**IC<sub>50</sub>**: Concentration inhibitrice à 50%

**MET**: Extrait méthanolique

**Mg EAG/g d'extrait**: milligramme d'équivalent acide gallique par gramme d'extrait

**Mg ECT/g d'extrait** : milligramme d'équivalent catéchine par gramme d'extrait

**Mg EQ/g d'extrait** : milligramme d'équivalent quercétine par gramme d'extrait

**MO** : Matière organique

**RF** : Rapport frontal

**SD** : Standard déviation

**TR** : Temps de rétention

**UV** : Ultraviolet

## Liste des tableaux

N <sup>o</sup> du tableau	Titre du Tableau	Page
<b>Tableau 1.</b>	Teneur de la pulpe du jujubier frais en métabolite primaire.....	<b>3</b>
<b>Tableau 2.</b>	Composition en métabolites secondaires des différents organes de <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>3</b>
<b>Tableau 3.</b>	Principales espèces réactives oxygénées .....	<b>19</b>
<b>Tableau 4.</b>	La teneur en eau et de matière sèche des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>33</b>
<b>Tableau 5.</b>	La teneur en cendre et de matière organique des fruits du <i>Zizyphus lotus</i>	<b>33</b>
<b>Tableau 6.</b>	Aspects, couleurs et rendement des divers extraits du fruit du <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>34</b>
<b>Tableau 7.</b>	Résultats des testes préliminaires des flavonoides et des tanins sur les différents extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>35</b>
<b>Tableau 8.</b>	Rapports frontaux et couleurs après révélation des standards.....	<b>38</b>
<b>Tableau 9.</b>	Temps de rétention des standards testés .....	<b>41</b>
<b>Tableau 10.</b>	Les standards détectés dans les différents extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>41</b>
<b>Tableau 11.</b>	Dosage des polyphénols totaux, des flavonoides et des tanins condensés dans les différents extraits du fruit du <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>45</b>
<b>Tableau 12.</b>	Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus par différents extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>49</b>
<b>Tableau 13.</b>	Activité antiradicalaire des extraits du fruit du <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>57</b>

## Listes des figures

N <sup>o</sup> de figure	Titres des figures	Page
<b>Figure 1.</b>	Les différentes parties du <i>Zizyphus lotus</i> .....	1
<b>Figure 2.</b>	Aire de répartition du <i>Zizyphus lotus</i> L en Algérie.....	2
<b>Figure 3.</b>	Quelques structures des composés phénoliques.....	6
<b>Figure 4.</b>	Squelette de base des flavonoides.....	7
<b>Figure 5.</b>	Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoides.....	10
<b>Figure 6.</b>	Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoides.....	10
<b>Figure 7.</b>	Structure des tanins condensés et leur monomère.....	13
<b>Figure 8.</b>	Structure des tanins hydrolysables et les acides associés.....	14
<b>Figure 9.</b>	Les différentes espèces réactives oxygénées.....	20
<b>Figure10.</b>	Origine et réponse cellulaire aux ROS.....	24
<b>Figure 11.</b>	Différentes parties du fruit du <i>Zizyphus lotus</i> .....	25
<b>Figure 12.</b>	Différentes étapes d'extraction par épuisement successive du matériel végétal.....	27
<b>Figure 13.</b>	La réaction entre la vanilline est les tanins condensés.....	30
<b>Figure 14.</b>	Chromatographie sur couche mince des extraits polaires des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> après révélation par la vanilline sulfurique.....	36
<b>Figure 15.</b>	Chromatographie sur couche mince des extraits des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> (Observation sous la lampe UV (254nm)).....	37
<b>Figure16.</b>	Chromatographie sur couche mince des extraits apolaires des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> (Révélation par la vanilline sulfurique).....	37
<b>Figure 17.</b>	Chromatographie sur couche mince des extraits des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> (Révélation par une solution de DPPH).....	38
<b>Figure 18.</b>	Chromatogrammes des différents standards testés dans l'HPLC	40
<b>Figure 19.</b>	Chromatogrammes obtenus pour l'extrait éthérique du <i>Zizyphus lotus</i> .....	42
<b>Figure 20.</b>	Chromatogrammes obtenus pour l'extrait du dichlorométhane du <i>Zizyphus lotus</i> .....	43
<b>Figure 21.</b>	Chromatogrammes obtenus pour l'extrait méthanolique du <i>Zizyphus lotus</i> .....	43
<b>Figure 22.</b>	Chromatogrammes obtenus pour l'extrait aqueux du <i>Zizyphus lotus</i> ...	44
<b>Figure 23.</b>	Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	46
<b>Figure 24.</b>	Droite d'étalonnage de la quercétine.....	47
<b>Figure 25.</b>	Droite d'étalonnage de la catéchine.....	47
<b>Figure 26.</b>	Corrélation linéaire entre la quantité en polyphénols totaux et la quantité des flavonoides des différents extraits du fruit <i>Zizyphus lotus</i> (p<0,05).....	48

<b>Figure 27.</b>	Corrélation linéaire entre la quantité en polyphénols totaux et la quantité des tanins condensés des différents extraits du fruit <i>Zizyphus lotus</i> ( $p \leq 0,05$ ).....	<b>48</b>
<b>Figure 28.</b>	Structure de la paroi bactérienne.....	<b>50</b>
<b>Figure 29.</b>	Zones d'inhibitions obtenues par différents extraits.....	<b>51</b>
<b>Figure 30.</b>	Structure chimique de $\beta$ -carotène.....	<b>52</b>
<b>Figure 31.</b>	Cinétique de blanchissement du $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits du <i>Zizyphus lotus</i> , du BHT.....	<b>54</b>
<b>Figure 32.</b>	Activité antioxydante relative des extraits du fruit du <i>Zizyphus lotus</i> , du BHT dans le système carotène /acide linoléique.....	<b>54</b>
<b>Figure 33.</b>	Corrélation linéaire entre la teneur en polyphénols et le pourcentage de l'activité antioxydante relative.....	<b>55</b>
<b>Figure 34.</b>	Corrélation linéaire entre la teneur en tanins et le pourcentage de l'activité antioxydante relative.....	<b>55</b>
<b>Figure 35.</b>	Réaction d'un antioxydant avec le DPPH.....	<b>56</b>
<b>Figure 36.</b>	Activité antiradicalaire des extraits polaires (MET, AQ) des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>59</b>
<b>Figure 37.</b>	Activité antiradicalaire des extraits apolaires (DCM, ET) des fruits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	<b>59</b>
<b>Figure 38.</b>	Activité antiradicalaire des standards la quercétine , le BHT, la rutine et la vitamine C.....	<b>60</b>
<b>Figure 39.</b>	Corrélation linéaire entre la teneur en flavonoïdes et le pouvoir antiradicalaire ( $p \leq 0,01$ ).....	<b>60</b>

## Introduction générale

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques.

Récemment le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, et la toxicité des antioxydants synthétiques, a conduit de chercher des substances naturelles dotées d'activité antimicrobienne et antioxydante.

Les radicaux libres (RL) en général et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en particulier sont impliqués dans plusieurs pathologies humaines allant de l'inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardio-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde, le diabète et le processus d'apoptose ; en plus de leur action directe en réagissant avec la plupart des macromolécules.

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail de recherche, dont le but principal est d'étudier les activités antimicrobiennes et antioxydantes des différents extraits du fruit du *Zizyphus lotus* (Sedra), plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle comme adoucissant dans le traitement de la gorge et les irritations broncho-pulmonaires, un émollient dans le traitement des furoncles. D'ailleurs, elle possède plusieurs activités thérapeutiques : anti-inflammatoire, analgésique, anti-ulcérogénique, antifongique et antidiabétique

Dans ce présent travail, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Analyse qualitative des différents extraits aqueux et organiques du fruit du *Zizyphus lotus* en utilisant la CCM et l'HPLC
- Analyse quantitative du contenu en polyphénols, et en flavonoïdes et tanins des différents extraits du fruit du *Zizyphus lotus*.
- Etude de l'activité antimicrobienne des différents extraits du fruit du *Zizyphus lotus*
- Etude de l'activité antioxydante des différents extraits du fruit du *Zizyphus lotus*, en utilisant deux méthodes (Test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et test au DPPH).

# Partie bibliographique

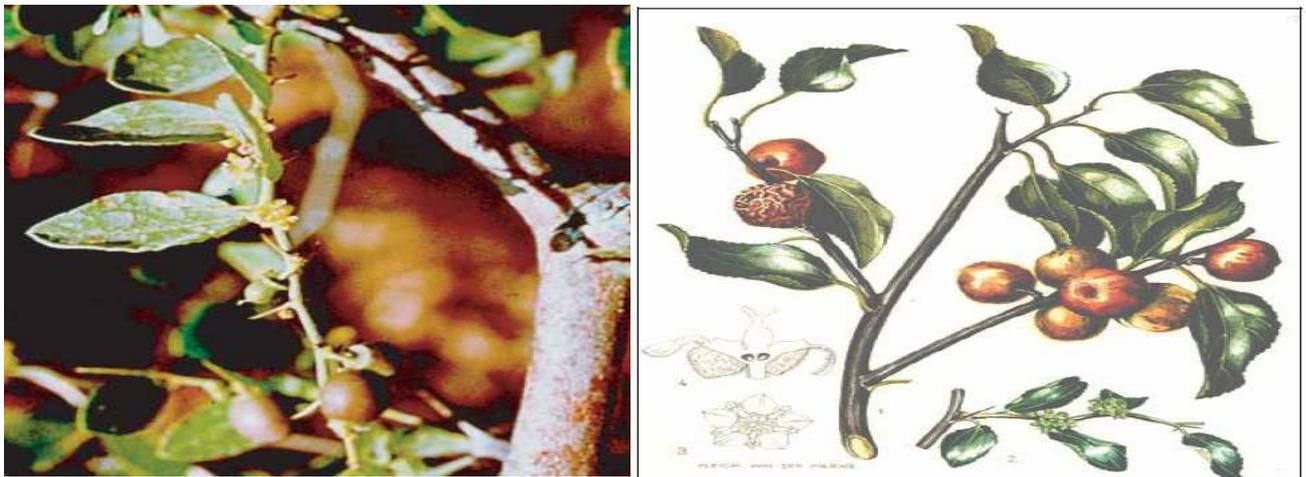
# **Chapitre I**

## **Généralités sur le *Zizyphus lotus***

### I.1. Description botanique du *Zizyphus lotus*

Le *Zizyphus lotus* (**jujubier**) est un arbuste fruitier, épineux appartenant à la famille des Rhamnacées (Rsaissi et Bouchache, 2002). Communément appelé en Afrique du Nord "Sedra" (Borgi et al ., 2007(a)). 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" (**Figure 1**) (Rsaissi et Bouchache, 2002).



**Figure 1.** Les différentes parties du *Zizyphus lotus* (Rsaissi et Bouchache, 2002)

### I.2. Classification botanique

**Embranchement :** *Spermatophytes.*

**Sous embranchement :** *Angiospermes.*

**Sous classe :** *Dicotylédone.*

**Ordre :** *Celastrales*

**Famille :** *Rhamnacées.*

**Genre :** *Zizyphus.*

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

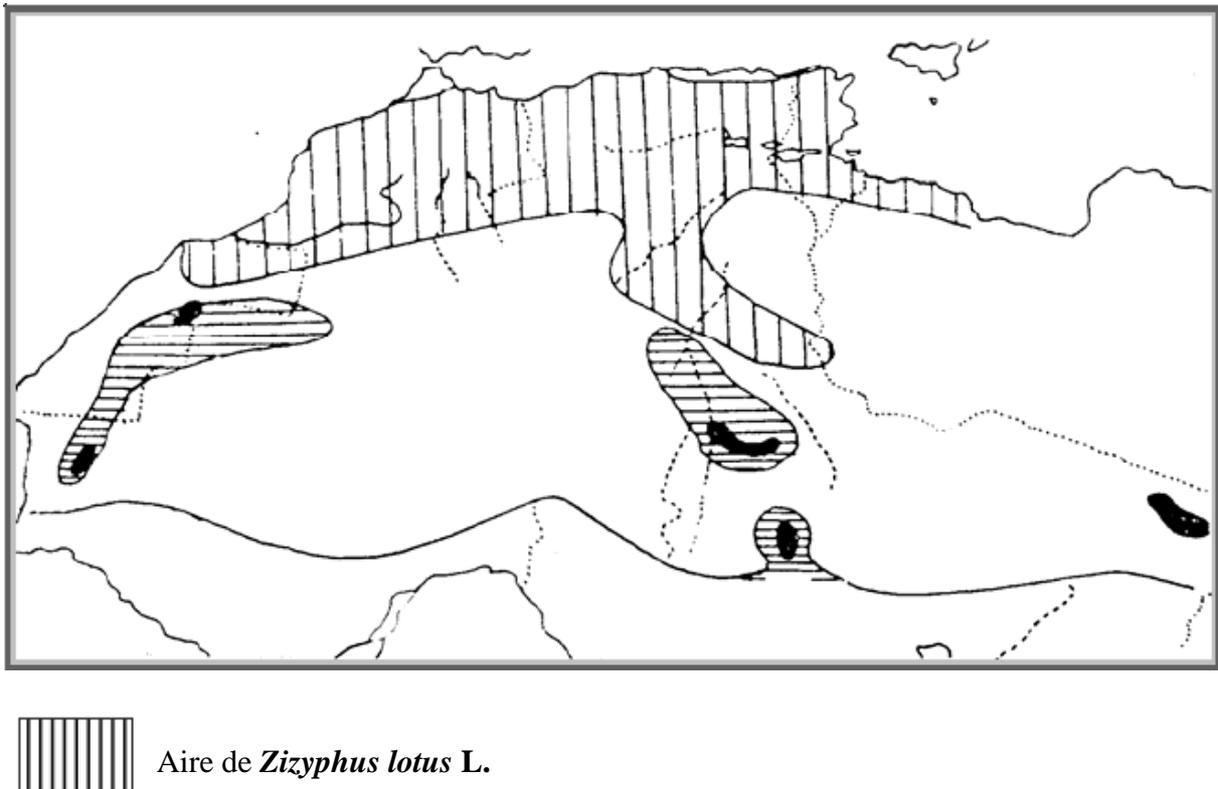
### I.3. Répartition géographique

#### Dans le monde

Le genre *Zizyphus* renferme environ 50 espèces des régions tropicales et subtropicales des deux hémisphères. L'une entre elles, *Zizyphus lotus*, est spontanée dans le sud d'Espagne et du Portugal, en Sicile, en Grèce (Bross, 2000). On le rencontre aussi dans les steppes désertiques d'Afrique du Nord et Asie Mineure (Paris et Dillemann, 1960).

#### En Algérie

Le *Zizyphus lotus* est répandu dans toute l'Algérie sauf le Tell Algéro-constantinois (Quezel et Santa, 1962).



**Figure 2.** Aire de répartition du *Zizyphus lotus* L en Algérie (Quezel et Santa, 1962).

#### I.4. Composition biochimique du *Zizyphus lotus*

Les études phytochimiques menées sur le *Zizyphus lotus* montrent la présence de métabolites primaires et secondaires.

##### a) métabolite primaire

**Tableau 1.** Teneur de la pulpe du jujubier frais en métabolite primaire (Catoire et al., 1999).

La fraction de la pulpe du fruit	Le pourcentage
sucres	20% à 32%
lipides	0,1% à 0,3%
protides	0,8% à 2,1%

##### b) métabolites secondaires

Le *Zizyphus lotus* est connu par son contenu en molécules biologiquement actives tels que les polyphénols (flavonoïdes, tanins), les triterpènes, les anthraquinones, les alcaloïdes (cyclopeptides et isoquinolides), les saponosides (Borgi et Chouchane, 2006 ; Catoire et al., 1994).

**Tableau 2.** Composition en métabolites secondaires des différents organes du *Zizyphus lotus* :

Organe végétal	Composition chimique	Références
<b>Fruits</b>	-flavonoïdes, tanins saponines, alcaloïdes	(Borgi et al., 2007 (b))
<b>Feuilles</b>	-flavonoïdes, tanins, alcaloïdes. -saponines de type dammarane : -jujuboside B -jujubogenin glycoside -dérivé sulfaté de jujubasaponine IV	(Borgi et al., 2007 (b))  (Macuek et al., 2004)
<b>Ecorce des racines</b>	-flavonoïdes, saponines de type dammarane. -tanins. -alcaloïde cyclopeptidiques lotusines A-G	(Borgi et al., 2007(a))  (Borgi et al., 2007(b))  (Le crouéour, 2002)

**I.5. Activités biologiques et thérapeutiques du *Zizyphus lotus***

Les différentes espèces du *Zizyphus* sont 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). Les recherches actuelles sur les différentes activités pharmacologiques de *Zizyphus lotus* ont ressorti plusieurs effets de grande importance pour la médecine moderne. Parmi ces effets on souligne les plus importants :

**I.5.1. Activités anti-inflammatoires et analgésiques**

Les flavonoïdes et les saponines de l'écorce des racines du *Zizyphus lotus* ont montré une activité anti-inflammatoire significative (Borgi et Chouchane, 2006).

Le *Zizyphus lotus* inhibe la production de monoxyde d'azote (NO), cette activité apparaît potentiellement avec l'extrait méthanolique de l'écorce des racines qui est la source possible de l'agent anti-inflammatoire dans la réaction de l'hypersensibilité retardée induite par oxazolone (Borgi et al ., 2008).

Les feuilles du *Zizyphus lotus* possèdent des effets analgésiques attribués à leur contenu en principes actifs ; les flavonoides et les saponines (Borgi et al ., 2007 (a). Borgi et al ., 2008).

Toutes ces activités confirment l'usage traditionnel de cette plante dans certaines maladies inflammatoires et douloureuses (Borgi et al ., 2007(a)).

**I.5.2. Activités anti-fongiques et anti-mollusques**

Les différents extraits (éthéré, chloroformique, extrait d'acétate d'éthyle et méthanolique) de *Zizyphus lotus* se sont avérés très actifs *in vitro* vis-à-vis de neufs souches des champignons pathogènes et des mollusques *Balinus truncatus* (hôtes intermédiaires et vecteurs de la transmission de la bilharziose) (Lahlou et al ., 2002).

**I.5.3. Activités anti-ulcérogéniques**

Le *Zizyphus lotus* (les feuilles, l'écorce des racines) possède une importante activité anti-ulcérogénique attribuée à la présence des tanins et des flavonoïdes connus par leur effets gastroprotecteur (Borgi et al ., 2007(b)).

**I.5.4. Autres activités**

Les fruits de *Zizyphus lotus* sont décrits comme adoucissant, et entrent dans le traitement de la gorge et les irritations broncho-pulmonaires. De même, la poudre des feuilles sèches et des fruits est appliquée dans le traitement des furoncles (Borgi et al ., 2007(a)). D'ailleurs l'écorce des racines du *Zizyphus lotus* est utilisée dans la médecine traditionnelle dans le traitement du diabète (Ghedira et al .,1995).

# **Chapitre II**

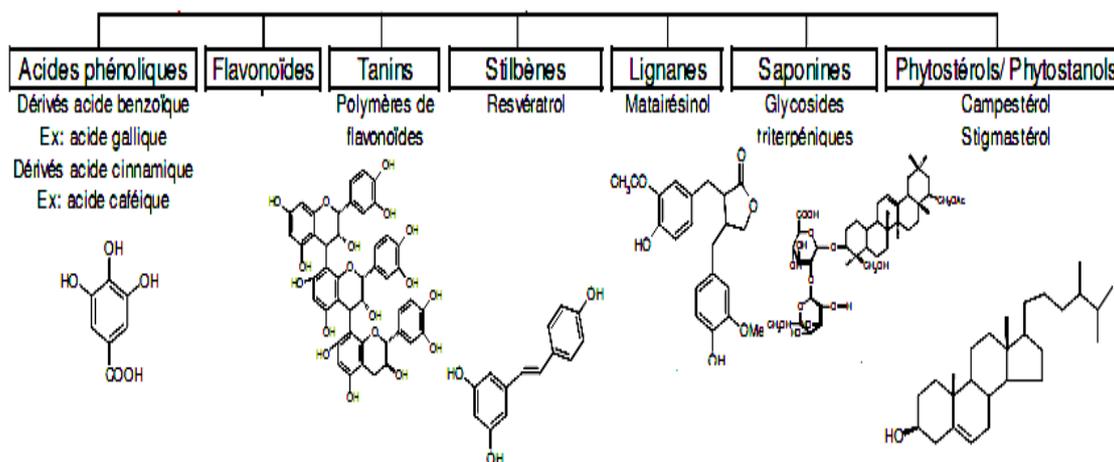
## **Les composés phénoliques**

Les composants phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides.

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

Les principales classes des composants phénoliques sont les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide ferulique, acide chlorogénique...), les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines (King et Young, 1999 ; Tapiero et al., 2002).

Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives (King et Young, 1999), ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires, antimicrobiens, (Bahorun, 1997 ; Cetkovic et al., 2008) (**Figure 3**).



**Figure 3.** Quelques structures des composants phénoliques (Gervaise, 2004).

## II.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Marfak, 2003).

Ces molécules sont considérées comme des pigments quasiment universels des végétaux ; ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Bruneton, 1999). Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides (Ghestem et al ., 2001)

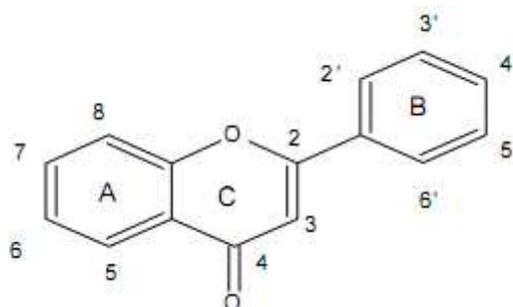
### II.1.2. Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont amplement répandus dans le règne végétal (graines, fleurs, fruits, feuilles) (Dacosta, 2003). On les trouve aussi chez les Psylotales, les Fougères, Angiospermes, Asteraceae ...etc.

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes hydrosolubles s'accumulent dans les vacuoles, et selon les espèces se concentrent dans l'épiderme des feuilles, ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophile. Dans le cas des fleurs, ils sont concentrés dans les cellules épidermiques (Bruneton, 1999).

### II.1.3. Structure chimique et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- $\gamma$ -pyran (Skerget et al ., 2004). Leur structure de base est celle d'un diphénylpropane à 15 atomes de carbone ( $C_6-C_3-C_6$ ), constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycles oxygénés, qui désigne la lettre C (**figure 4**) (Dacosta, 2003).



**Figure 4** : Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu, 2006).

La classe des flavonoïdes comporte à elle seule plus de 4000 substances qui ont été isolées et identifiées à partir des milliers des plante (Forkmann et Martens, 2001), qu'en divise en plusieurs catégories : Les flavones, les flavonols et les dihydroflavonols, les

isoflavonoïdes, les biflavonoïdes, les flavanones, les flavanols, les flavanediols (leucocyanidines), les anthocyanidines, les chalcones et les dihydrochalcones, les aurones (Dacosta, 2003).

#### **II.1.4. Activités biologiques des flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des composants naturels hautement actifs. Plusieurs études ont démontré une large gamme des effets biochimiques et pharmacologiques de ces molécules.

##### **a) Activité anti-inflammatoire des flavonoïdes**

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Milane, 2004). Sous l'action de la cyclooxygénase (CO) et la lipooxygénase (LO), l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines, et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires (Marfak, 2003 ; Formica et Regelson, 1995). Les flavonoïdes inhibent la synthèse des eicosanoïdes par inhibition de l'activité de LO et CO, aussi ils provoquent l'inhibition de la peroxydation non enzymatique des acides gras poly insaturés nécessaires pour l'activation de ces oxygénases ce qui provoque un effet anti-inflammatoire (Formica et Regelson ,1995).

Par ailleurs, les flavonoïdes ont un effet polliatif sur l'inflammation dû à ses effets inhibiteurs sur la synthèse des leucotriènes et la libération de l'histamine, et ses activités comme piègeurs de superoxyde (Formica et Regelson ,1995)

##### **b) Flavonoïdes comme inhibiteurs enzymatiques**

Les favonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques, ils inhibent plusieurs enzymes intervenant dans divers mécanismes biologiques.

Il inhibent l'histidine décarboxylase, l'élastase , la hyaluronidase ce qui permettrait de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire ; ils inhibent aussi d' une manière non spécifique la catéchol-O-méthyltransferase ,ce qui augmenterait la quantité de la catécholamine disponible et donc provoquerait une élévation de la résistance vasculaire.

En plus, les flavonoïdes inhibent la phosphodiesterase de l'AMP<sub>C</sub> ce qui pourrait expliquer leur activité anti-agrégante plaquettaire ; aussi, ils inhibent l'aldose réductase qu'est impliquée dans la pathogénie de la cataracte (Bruneton, 1999).

Par ailleurs, les flavonoïdes peuvent inhiber la promotion de tumeur à travers un effet inhibiteur sur la phosphoxylase C et la protéine kinase (Formica et Regelson, 1995).

### **c) Flavonoïdes et les maladies cardiovasculaires**

Les flavonoïdes sont des composés veinoactifs, ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renfoncer leur résistance. Cette action est appelée « vitaminique P » (Bruneton, 1999).

D'ailleurs, ils ont un effet protecteur des maladies cardiovasculaires. Ils induisent la vasodilatation et provoquent la relaxation des muscles lisses cardiovasculaires ce qui engendre une activité anti-hypertensive et des effets antiarrhythmiques. En plus les flavonoïdes protègent LDL de l'oxydation et par conséquent empêchent la formation des plaques athérosclerotiques, aussi, ils ont des effets antithrombotiques à travers l'empêchement de l'agrégation plaquettaire (Formica et Regelson, 1995).

### **d) Activité antioxydante des flavonoides**

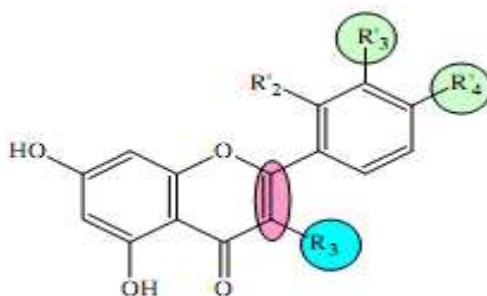
Les flavonoides possèdent une forte activité antioxydante qu'est le principe de plusieurs activités biologiques douées par ces molécules (Saija et al., 1995).

L'activité du piégeage des radicaux libres est l'un des mécanismes importants de l'activité antioxydante, pour les flavonoides, ce mécanisme est lié à leur structure et de l'arrangement des groupements hydroxyles (Sokol-Letowska A et al., 2007).

Des études faites sur la capacité des flavonoides à piéger les radicaux libres ont montré que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> en conjugaison avec la fonction 4-oxo
- La présence du groupe 3OH en combinaison avec la double liaison C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoides (**figure 5**) (Marfak, 2003).



**Figure 5.** Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoides

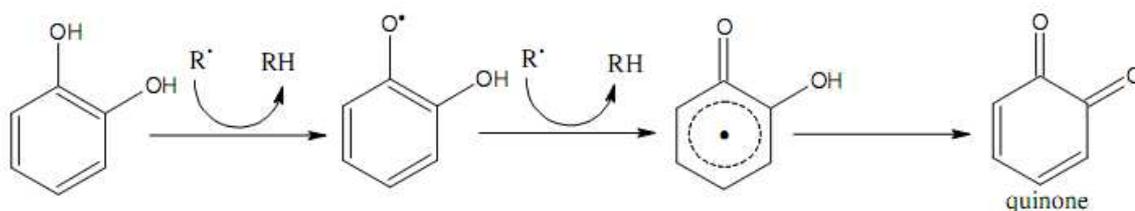
(Marfak, 2003)

La propriété antiradicalaire des flavonoides est dirigée principalement vers HO<sup>•</sup> et O<sub>2</sub><sup>-•</sup> aussi les radicaux peroxy et alkoxy.

En plus, comme ces composants présentent une forte affinité pour les ions du fer (catalysent plusieurs processus conduisant à l'apparition des radicaux libres), leur activité antiperoxydative peut être aussi attribuée à une capacité concomitante de chélation du fer (Saija et al., 1995).

Par ailleurs, l'inhibition des enzymes présente un autre mécanisme de l'activité antioxydante, les flavonoides peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celle du radical superoxyde dans les tissus humains.

Une étude faite a montré que les flavonoides sont aussi des bons inhibiteurs d'autres enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la cyclooxygénase et la lipoxygénase (**figure 6**) (Marfak, 2003).



**Figure 6.** Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoides (Marfak, 2003)

### e) Effet anticancéreux des flavonoïdes

Certains flavonoides possèdent une activité antitumorale et anticancérogénique significative. Par blocage de la production de la tumeur de la peau, la quercétine peut être considérée efficace dans la prévention du cancer de la peau.

L'inhibition de la glyoxylase I par la quercétine peut être expliquée son activité anticancérogène, comme le système glyoxylase joue un rôle dans la production de D lactate et la régénération du glutathion ,des facteurs importants dans l'induction du tumeur et la croissance (Formica et Regelson,1995).

D'ailleurs, la quercétine inhibe la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones (Marfak, 2003).

#### **f) Activité antimicrobienne des flavonoïdes**

Les flavonoides possèdent des propriétés antimicrobiennes (Petit et al ., 2007). Ils sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales. Mucsi et Pragai en 1985 ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoides sur divers virus d'herpès et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en AMP<sub>C</sub> dans les cellules infectées .Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoides sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), aussi les flavonoides se sont avérés de bons inhibiteurs de transcriptase reverse.

Autre étude a montré que, les flavonoides pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte .Enfin, les flavonoides seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV-1.Cette enzyme permet l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte.

Théoriquement, les flavonoides pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs in vitro de l'ADN gyrase. D'autre part, une étude a montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *Staphylococcus aureus*.

Une étude récente a montré l'effet antibactérien de certains flavonoides isolés de *Dorstenia barteri* (Mbaveng et al ., 2008).

L'activité antifongique des flavonoides est aussi établie, une étude faite sur *Dianthus caryophyllus* a montré l'efficacité de ses flavonoides sur des souches fongiques (Galeotti et al ., 2008).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe .parmi les hypothèses avancées, il faut citer :

- L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes.
- Séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer.
- L'inhibition du métabolisme microbien (Milane, 2004).

**g) Autres activités des flavonoïdes**

A côté des activités citées précédemment, les flavonoïdes possèdent d'autres activités :

Activité anti-allergique, antihépatotoxique, anti-ostéoporotique (Ielpo et al., 2000), activité hypocholestérolémiant (Formica et Regelson, 1995), activité antidiabétique (Marfak, 2003), activité antimutagène, antiprotazoaires et activité anxiolytique (Cabrera et al., 2007).

**II.2. Les tanins**

Les tanins sont des métabolites secondaires polyphénoliques (Khanbabaee et Ree, 2001), hydrosolubles de masse molaire entre 500-2000D. 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 (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Bruneton, 1999). Parmi les caractéristiques des tanins le goût astringent 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 (Khanbabaee et Ree, 2001), en plus de la protection contre les attaques fongiques et bactériennes (Peronny, 2005).

**II.2.1. Localisation et distribution**

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, ils sont particulièrement abondants chez les Conifères, les Fagacées, les Rosacées (Ghestem et al., 2001).

Tous les organes végétaux peuvent en renfermer (l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits, les racines, les graines) (Khanbabaee et Ree, 2001). Les tanins sont présents dans une variété de plantes utilisées dans l'alimentation notamment les céréales et les légumineuses (sorgho, millet, orge, haricots secs, petits pois, caroube et les fruits comme (pomme, mûre, canneberge, datte, raisin, aubépine, pêche, poire, kaki, prune, framboise et fraise (Peronny, 2005).

**II.2.2. structure chimique et classification**

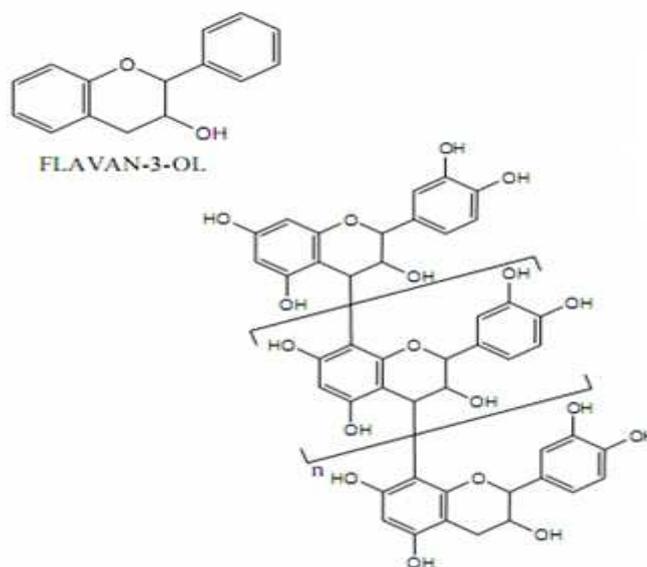
A la base de leur caractéristique structurale, il est possible de diviser les tanins en 2 groupes :

- Tanins condensés (proanthocyanidines).

- Tanins hydrolysables.

### a) Tanins condensés (proanthocyanidines)

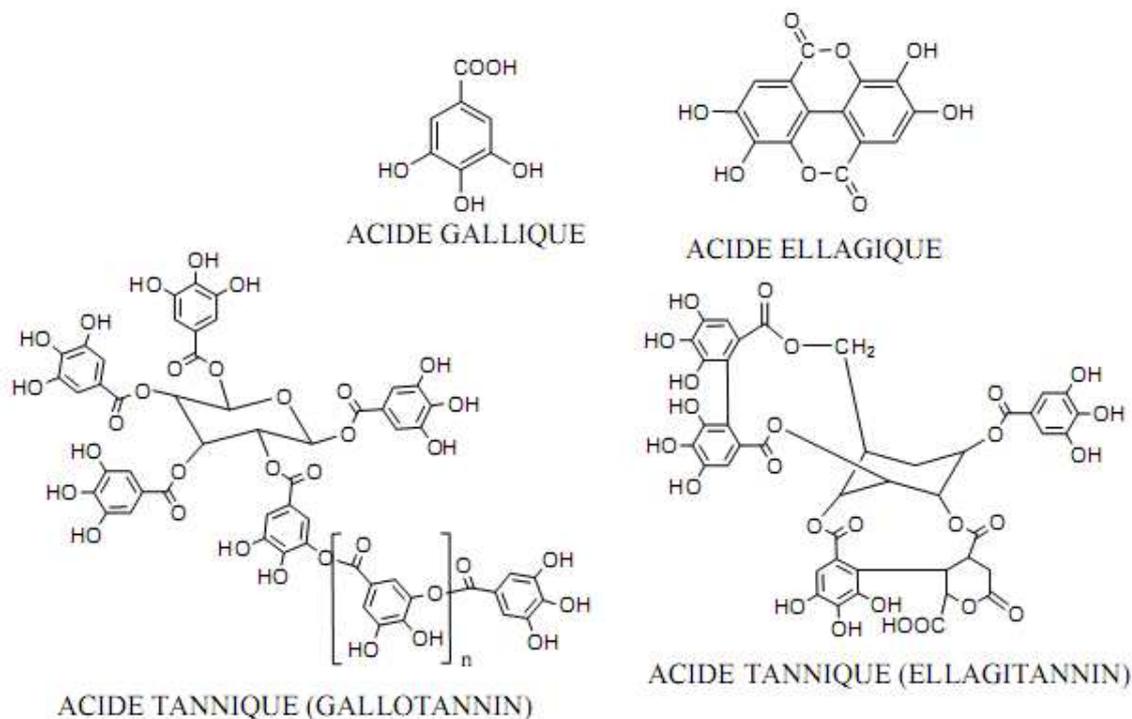
Ce sont des polymères ou oligomères flavanique, constitués d'unités flavan-3-ols, le plus souvent épicatechine et catéchine, avec un degré de polymérisation entre deux et plus de 50 unités (Khanbabaee et Ree ,2001) .Ces unités liées entre elles par une seule liaison carbone-carbone C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> dans le type B des proanthocyanidines ;ou par une liaison interflavanique double (C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> ou C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>) et (C<sub>2</sub>-O-C<sub>7</sub>) dans le type A (**figure7**) (Bruneton,1999 ; Xie et Dixon,2005 ;Vivas et al ., 2006).



**Figure 7.** Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

### b) Tanins hydrolysables

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable d'acide phénolique. Le sucre est très généralement le glucose .L'acide phénolique est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) et ses dérivés dans le cas des tanins éllagiques (**Figure 8**) (Bruneton, 1999)



**Figure 8.** Structure des tanins hydrolysables et les acides associés (Peronny, 2005).

### II.2.3. Activités biologiques et thérapeutiques des tanins

Les tanins sont des molécules biologiquement actives, douées d'activités pharmacologiques remarquables et des effets significatifs sur la santé humaine (Chavan et al., 2001 ; Okuda, 2005).

#### a) Activités antimicrobiennes des tanins

L'activité antimicrobienne des tanins est importante. La croissance de plusieurs bactéries, virus, champignons et levures est inhibée par les tanins (Chung et Wei, 2001).

##### -Activité antibactérienne

De nombreuses études ont montré l'activité antibactérienne des tanins. Ces molécules ont été rapportées comme bactériostatique ou bactéricide sur plusieurs souches bactériennes : *Aeromonas sobria*, *Bacillus anthracis*, *Bolulinum*, *Desuomaculum nigrificans*, *Klebsiella pneumonia*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseud maltophila*, *solanacearum*, *Staphilococcus aureus*, *Staph epidermis*, *Streptococcus lactis*, *Strept mutans*, *Strept pneumonia*, *Strept sobrinus* ...etc.

Chung et ses collaborateurs ont trouvé que l'acide tannique a inhibé la croissance des bactéries des aliments comme : *Alealigenes faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *K pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Pseud fluorescens*, *Salmonella enteritidis*, *S paratyphi*, *Staph aureus*, *Strept faecalis*, *Strept pyogenes* et *Yersinia enterocolitica*.

Les bactéries intestinales humaines comme : *Bacteroides fragilis*, *Clostridium clostridiiforme*, *C perfringens*, *C paraputrificum*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* sont inhibées par l'acide tannique (Chung et Wei, 2001).

### **-Activité antivirale**

L'activité antivirale des tanins est due à la fixation des molécules des tanins à l'enveloppe protéique du virus ou la membrane de la cellule hôte et par conséquent l'inhibition de l'adsorption et la pénétration virale ; cependant, dans certains cas la fixation cause seulement des changements mineurs à la surface virale, la pénétration reste mais l'enlèvement de l'enveloppe virale est inhibé. Plusieurs types de virus sont inactivés par les tanins, le virus Herpes simplex (HSV-1, HSV-2) est inhibé par les tanins hydrolysables et les tanins condensés galloylés de plusieurs extraits des plantes (De Bruyne et al., 1999).

Les tanins ont aussi rapportés d'inactiver le virus *tobacco mosaïque*, et poliovirus. L'acide tannique est capable d'inhiber la réplication du virus d'influenza, *Coxsackievirus*, *echovirus*, *reovirus*, virus d'herpes (Chung et Wei, 2001).

Les oligomères proanthocyanidins présentent une activité antivirale contre le virus respiratoire syncytial (RSV), virus d'influenza A (FLU-A) et le virus para influenza (PIV), en outre l'hépatite A et B.

Les tanins ont un autre effet inhibiteur de la réplication virale, c'est l'inhibition de la transcriptase inverse des rétrovirus comme virus (HIV) ; cette inhibition est influencée par la galloylation, l'étendue de l'oligomérisation, la différence de la liaison inter-flavan, la stéréochimie de la fonction 3 hydroxyle (De Bruyne et al., 1999).

### **Activité antifongique et anti-levure**

Plusieurs types de champignons sont inhibés par les tanins. Les champignons filamenteux comme *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Chaetomium cupreum*, *Collectotrichum graminicola*, *Coniphora olivacea*, *Coriolus versicolor*, *Crinepellis perniciososa*, *Fomes annosus*, *Gloeophyllum trabeum*, *Merulius lacrymans*, *Penicillium*,

*Poria monticola*, *Trametes hirsuta* et *Trichoderma viride* sont inhibés par les tanins de différentes préparations .

De même, différentes levures incluant *Saccharomyces crevisiae* sont aussi sensibles aux tanins (Chung et Wei, 2001).

### **b) Activité thérapeutique due à l'astringence**

Par voie externe, les tanins imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels.

En limitant les pertes en fluides et en empêchant les agressions extérieures, les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlure (Bruneton, 1999). Sur les blessures, les tanins induisent la cicatrisation par différents mécanismes cellulaires, en favorisant la contraction de blessure, l'augmentation de la formation des vaisseaux capillaires et des fibroblastes ; et induisant la prolifération des kératinocytes (Lopes et al., 2005).

Par voie interne, ils exercent un effet antidiarrhéque (Bruneton, 1999), qui est dû à l'inhibition de la motilité intestinale (De Bruyne et al. 1999).

### **c) Inhibition enzymatique**

La fixation des tanins avec les protéines peut être engendrée l'inhibition de plusieurs enzymes (De Bruyne et al., 1999). Le blocage de la 5-lipoxygénase par géraniine, corilagine, inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, de l'activation de la hyaluronidase, des glucosyltransférases des microorganismes impliqués dans la cariogénèse ; inhibition des topoisomérases par la sanguinine H6 ou l'acide chébulagique ; inhibition de la protéine kinase C par les tanins éllagiques et les tanins complexes (Bruneton, 1999) ; inhibition de  $\alpha$ -amylase salivaire humaine qui joue un rôle dans la formation des caries dentaires (Kandra et al., 2004).

D'ailleurs, les dimères procyanidoliques ont une activité inhibitrice sur l'histidine décarboxylase et l'élastase (Bruneton, 1999).

**d) Activité antioxydante des tanins**

Les tanins ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénols (Peronny, 2005). Elles ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation (Perret, 2001).

Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficace que les phénols simples (Peronny, 2005). De même, il a été démontré in vitro que les tanins sont plus actives que les vitamines. Des études faites montrèrent que les procyanidines B<sub>1</sub> et B<sub>3</sub> sont des antioxydants pour l'acide linoléique, et ils ont une activité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol.

Dans une autre étude faite sur la propriété du piégeage radicalaire, il a été remarqué que les procyanidines dimériques peuvent emprisonner 8 radicaux pyroxyles alors que l'acide ascorbique emprisonne un seul radical, et l' $\alpha$  tocophérol emprisonne deux radicaux.

Uchida et ses collaborateurs suggèrent que les tanins condensés galloylés ont une action de piégeage radicalaire sur le radical 1-1 diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) aussi sur l'anion superoxyde et OH $\cdot$ ,  $\cdot$ OOH.

Plusieurs propriétés structurales des tanins augmentent leur activité antioxydante :

La galloylation, préféablement en position 3' augmente la capacité du piégeage pour les deux O<sub>2</sub> $\cdot$  et OH $\cdot$ , aussi le piégeage de O<sub>2</sub> $\cdot$  est plus important pour les dimères procyanidines couplés par une liaison (4 $\rightarrow$ 8) que les dimères liés par (4 $\rightarrow$ 6) (De Bruyne et al., 1999).

**e) Activité anti cancérogénique des tanins**

Le potentiel anticarcinogénique des tanins peut être lié à leur propriété antioxydante qui apparaît importante dans la protection cellulaire des dommages oxydatifs.

Plusieurs études montrèrent l'activité anticancérogéniques des tanins, Migamoto et ses collaborateurs montrèrent l'activité anti tumorale de plusieurs oligomères des tanins hydrolysables incluant : agrimoniin, oenothéin B et coiiariin A contre la sarcoma (Chung et Wei, 2001). Une étude faite sur la plante *Eugenia jambos* a été suggérée que les tanins hydrolysables de cette plante induisent l'apoptose sur les cellules humaines leucémiques ce qui présente un autre mécanisme d'activité antioxydante des tanins (Yang et al., 2000).

Autre étude faite sur les tanins de sorghum suggère l'activité anticancérogénique des tanins de sorghum sur les cellules humaines de mélanome (Awika et Rooney, 2004).

**f) Autres activités biologiques des tanins**

Les tanins ont une activité anti inflammatoire .Tits et ses collaborateurs montrèrent une importante activité anti inflammatoire des prodelphinidines isolés de *Ribes nigrum*.

Les effets cardiaques et vasculaires des tanins sont aussi démontrés, Calixto et ses collaborateurs dénotèrent que l'acide tannique affecte la disponibilité du calcium pour la contraction des muscles lisses et cardiaques .En effet par fixation de l'acide tannique avec le  $Ca^{++}$ , l'acide tannique présente un effet hypotensif.

D'ailleurs des études faites montrèrent l'effet d'inhibition d'agrégation plaquettaire dans le plasma humain et le plasma du rat par deux procyanidines trimériques et un dimère thioether.

Outre ces activités, les tanins présentent une activité antiulcéreuse et antiparasitaire, en effet, la consommation des plantes à tanins peut affecter la biologie de certaines espèces de parasites intestinaux (Peronny, 2005).

## **Chapitre III**

# **Les espèces réactives oxygénées et stress oxydant**

### III.1. Les espèces réactives oxygénées

La vie en aérobie se traduit au niveau cellulaire par l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale (Curtay et Robin ,2000) ; au niveau de laquelle l'oxygène est normalement transformé en eau .Cette réaction de réduction implique quatre électrons, et est rendue grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes). Elle permet d'apporter à la cellule toute l'énergie nécessaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses fonctions vitales. Ce processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait, car 2 à 5% de l'oxygène est transformé en espèces réactives oxygénées (ERO) ou reactive oxygen species (ROS) (Gueye, 2007) ; qui sont des formes variées de l'oxygène active, elles incluent les radicaux libres comme l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) et le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ), et les espèces non radicalaires qui sont des oxydants et/ou facilement transformées en radicaux comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Halliwell et Whiteman, 2004) (**tableau 3**).

**Tableau 3.** Principales espèces réactives oxygénées (Antwerpen, 2006).

Espèces réactives oxygénées (ROS)	
Radicalaires	Non radicalaires
$\cdot OH$ Radical hydroxyle	$H_2O_2$ Peroxyde d'hydrogène
$RO\cdot$ Radical alkoxy	$ROOH$ Peroxyde organique
$ROO\cdot$ Radical peroxy	$HOCl$ Acide hypichloreux
$O_2^{\cdot -}$ Anion superoxyde	$^1O_2$ Oxygène singulet
$NO\cdot$ Radical oxynitrique	$ONOO^{\cdot -}$ Peroxynitrite

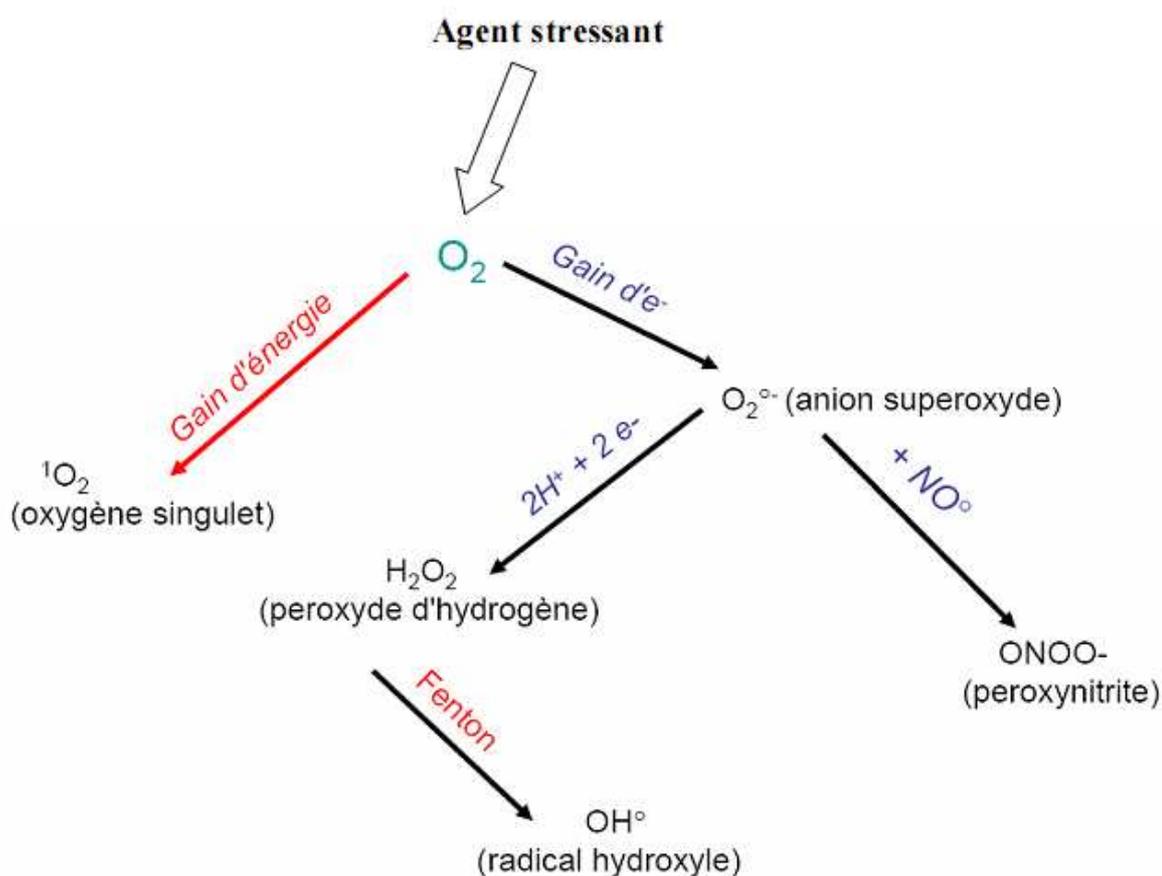
Les radicaux libres oxygénés sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe (Gueye, 2007). Cela leur confère une grande réactivité chimique (Dacosta, 2003).

Leur hyperréactivité les engage dans des réactions de dénaturation des constituants cellulaires de type peroxydation avec les glucides, les lipides, les protéines et l'ADN, formants des produits très instables .Ceux ci donnent lieu à des réactions en chaîne générant de nouveaux radicaux libres (Curtay et Robin, 2000).

L'espèce réactive primaire de l'oxygène est l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) qui résulte de la réduction univalente de l'oxygène moléculaire. Une grande partie de l'anion superoxyde est

transformée en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sous l'effet d'une enzyme, le superoxyde dismutase (Milane, 2004).

A son tour, le peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton peut se décomposer en présence de cuivre cuivreux ou fer ferreux pour donner une espèce hautement réactive et a durée de vie très courte, le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) (**figure 9**) (Nzengue,2008).



**Figure 9.** Les différentes espèces réactives oxygénées (Nzengue, 2008).

### III.2. Sources des espèces réactives oxygénées

Les ROS sont produits dans l'organisme par de nombreux mécanismes tant exogènes ou endogènes (**Figure 10**).

#### III.2.1. Sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des espèces réactives oxygénées.

Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ) et des molécules génératrices de radicaux libres ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants.

Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation des radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d' $O_2^{\cdot -}$ .

L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase, et du cytochrome P450. D'autre part, Schisler et Singh (1989) ont montré que l'alcool pouvait diminuer l'activité des enzymes de protection (SOD-GSH-Px). De même, les concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère.

Des toxiques tels que monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels) participent à la genèse de radicaux libres, ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires. NO, NO<sub>2</sub> peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux  $\cdot OH$ .

La fumée de cigarette joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires, elle contient NO, NO<sub>2</sub> et des fortes concentrations en composés insaturés, et stimule par son action irritante les macrophages des alvéoles pulmonaires (Milane, 2004).

D'autres facteurs peuvent conduire à la formation des ROS : les xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides) et médicaments, en plus des aliments qui peuvent contenir des oxydants (Curtay et Robin, 2000 ; Diallo, 2005).

### III.2.2. Sources endogènes

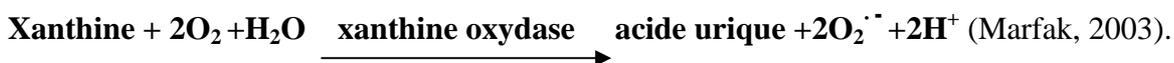
L'une des sources majeurs des ROS est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial.



Autres chaînes du transport d'électrons (ex : peroxydes et microsomes) contribuent également à la production du  $O_2^{\cdot -}$  dans la cellule aérobie. Les cytochromes P<sub>450</sub> et b<sub>5</sub> de la chaîne du transport d'électron des microsomes peuvent produire des ROS quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers l' $O_2$  (Sevanian et al., 1990).

D'autre part les ROS peuvent se produire au cours des processus pathologiques ou la production du radical réponde à une stimulation et intervient dans le processus inflammatoire (NADPH oxydase et xanthine oxydase) (Antwerpen, 2006).

Les cellules phagocytaires activées sont le siège d'un phénomène appelé "explosion oxydative", consistant en l'activation du complexe NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme lorsqu'il est contrôlé est capital dans la lutte infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers (Favier, 2003). D'ailleurs le système xanthine/xanthine oxydase permet aussi la production de l'anion superoxyde :



Une autre espèce réactive oxygénée produite au cours de l'inflammation est le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ; en vue de réagir directement ou de produire l'acide hypochloreux par l'intervention de myéloperoxydase. Cette espèce ( $\text{HClO}$ ) est caractérisée par un pouvoir oxydant nettement plus élevé que le  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Le monoxyde d'azote est produit aussi par un système enzymatique NO synthétase (NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (Favier, 2003).

D'autres systèmes sont capables de produire les ROS, citon par exemple : les réactions catalysées par les lipooxygénases et cyclooxygénases dans la voie de synthèse des leucotriènes, thromboxanes et prostaglandines (Babior et al ., 2002) ; les aldéhydes oxydases ou les protéines hémiques qui peuvent oxyder leur fer (I) en fer (III) avec production du radical  $\text{O}_2^{\cdot -}$  (Antwerpen, 2006).

C'est ainsi l'autooxydation des monoamines (dopamine, épinéphrine, et norépinéphrine) ; et l'hémoglobine en présence de traces de métaux peut également être à l'origine de la production des ROS (Gueye, 2007).

### III.3. Stress oxydant

Dans les circonstances normales, les ROS sont produites en faible quantité comme médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents.

Dans ce cas, la balance antioxydant/prooxydant est en équilibre. Si tel n'est pas le cas que ce soit par déficit en antioxydants ou par la suite d'une surproduction énormes de radicaux, l'excès de ces radicaux conduit au **stress oxydant** (Favier,2003 ; Haliwell et Whiteman ,2004).La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines , des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérées notamment lors de l'oxydation des lipides.

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, maladies cardiovasculaires...etc. (Favier, 2003).

### III. 4. Les antioxydants

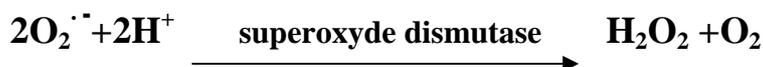
Les antioxydants sont l'ensemble de molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former des composés stables, en séquestrant le fer libre, ou en générant du glutathion (Favier, 2003 ; Dan, 2008).

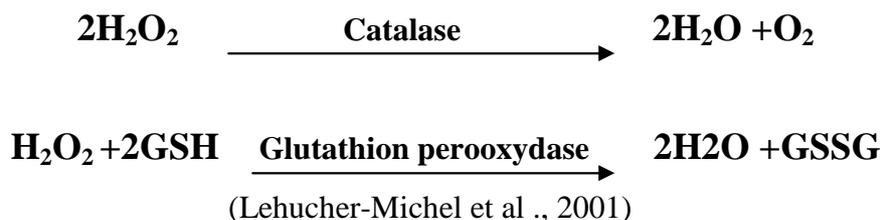
De nombreux antioxydants interviennent, il s'agit principalement des systèmes enzymatiques et non enzymatiques (**Figure10**) (Souley Amadou, 2004 ; Yoo et al ., 2008)

#### III.4.1. Les antioxydants enzymatiques

Cette ligne de défense est constituée principalement de trois enzymes.Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de glutathion peroxydase (GP<sub>X</sub>).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.





### III.4.2. Les antioxydants non enzymatiques

Ce groupe des antioxydants renferme les protéines de séquestration des métaux, qui agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro oxydants, comme  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  (ex : la transferrine, la ferritine, l'albumine, caeruloplasmine...etc.).

D'autre part, il y a des molécules à faible poids moléculaire qui agissent soit comme cofacteurs des enzymes citées soit comme antioxydant propre (Antwerpen, 2006).

Les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, l'empêcher ainsi d'attaquer les structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs capables de passer leurs électrons aux ROS et les éliminer (Kohen et Nyska, 2002). Ces molécules proviennent soit de sources endogènes (glutathion, mélatonine, acide urique, la mélanine...), soit de sources exogènes apportés par l'alimentation (ex : les caroténoïdes, la vitamine E, la vitamine C (Curtay et Robin, 2000), les composés phénoliques (Yoo et al., 2008) et surtout les acides phénoliques, les flavonoides, les tanins, les coumarine (Siddhuraju,2007).

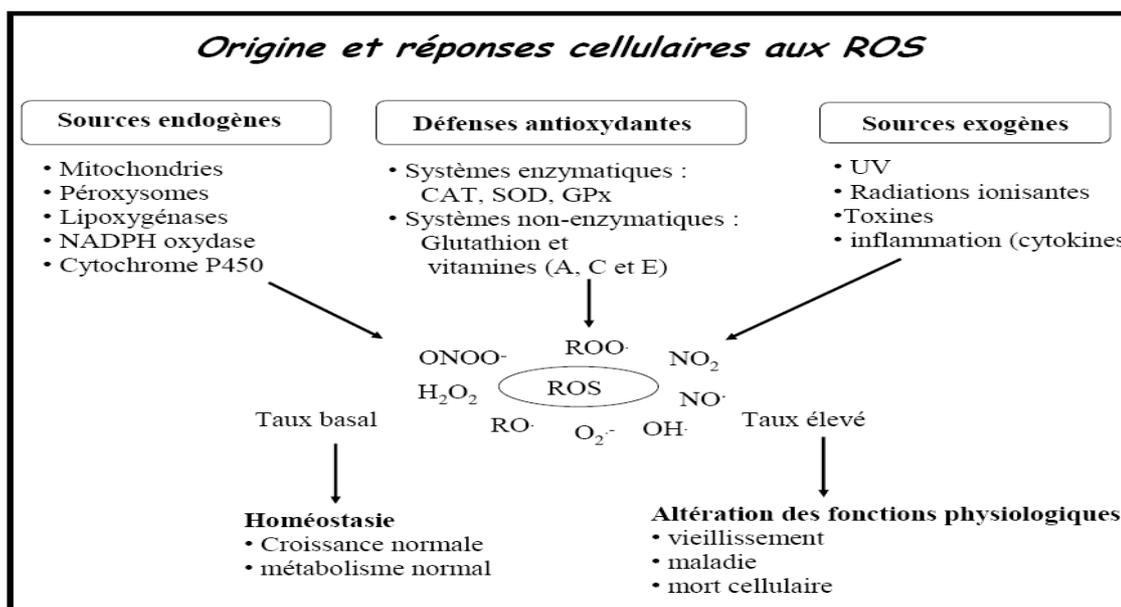


Figure 10. Origine et réponse cellulaire aux ROS (Petropoulos, 2003)

# Partie expérimentale

# **Chapitre I**

## **Matériel et méthodes**

## Matériel et méthodes

### I.1. Matériel

#### I.1. 1. Matériel végétal

Il est constitué des fruits du *Zizyphus lotus* (Figure11), récoltés des régions de Batna en Septembre Octobre 2007, 2008.

Les fruits ont été d'abord dénoyautés, ensuite la partie comestible a été séchée à l'ombre à l'abri de la lumière, à température ambiante.

Après séchage, la partie comestible a été broyée pour obtenir une poudre fine, qui a servi pour la préparation des différents extraits.

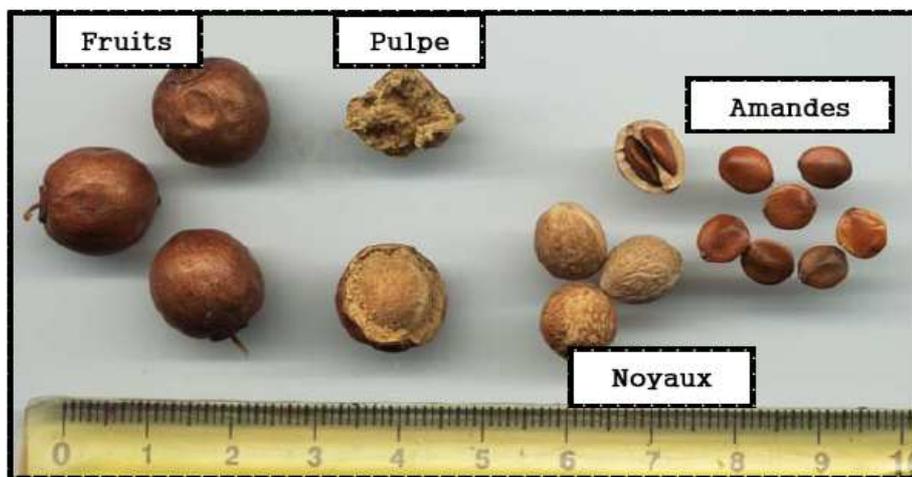


Figure11. Différentes parties du fruit du *Zizyphus lotus*

### I.2. Méthodes

#### I.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  $103 \pm 2C^0$  dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à une mesure pratiquement constante (Audigie et al .,1987).

La teneur en eau est la différence entre le poids de l'échantillon avant et après la dessiccation lorsque leur poids soit constant.

$$H\% = \frac{M_1 - M_2}{P} \times 100$$

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

**M<sub>1</sub>** : masse en g de la capsule avec l'échantillon avant la déshydratation.

**M<sub>2</sub>** : masse en g de la capsule avec l'échantillon après la déshydratation.

**P** : masse en g de la prise d'essai.

### **I.2.2. Détermination de la teneur en cendre :**

La teneur en matière minérale est conventionnellement le résidu de la substance après minéralisation de la matière sèche des échantillons .Elle est obtenue par incinération à 500-600C<sup>0</sup> (Pinta, 1980 ; AOAC, 1984).

$$\text{MO}\% = \frac{\text{M}_1 - \text{M}_2}{\text{P}} \times 100$$

**MO%** : matière organique.

**M<sub>1</sub>** : masse en g de la capsule et la matière sèche avant l'incinération.

**M<sub>2</sub>** : masse en g de la capsule avec les cendres.

**P** : masse en g de la prise d'essai.

La teneur en cendre est déterminée comme suit : **cendre%=100-MO%**

### **I.2.3. Préparation des extraits à partir des fruits du *Zizyphus lotus* :**

Selon la méthode de Diallo et al (2004), différents types d'extraits ont été préparés à partir des fruits pulvérisés (**Figure 12**).

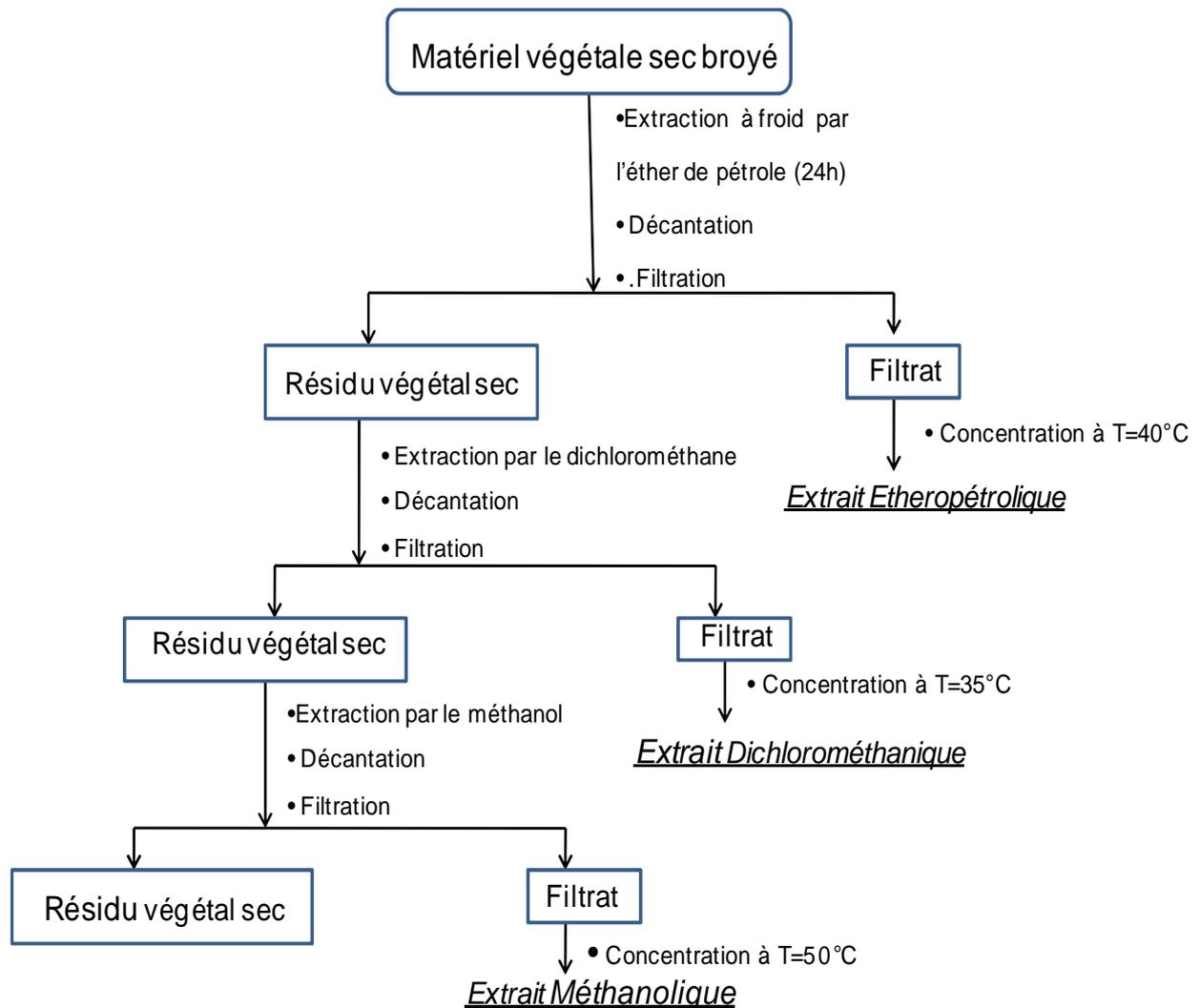
#### **I.2.3.1. Extractions avec des solvants à polarité croissante :**

250 g de poudre ont été extraits avec 2000ml d'éther de pétrole et placés sous agitation pendant 24h. Après filtration sur papier Whatmann, le marc est ensuite mis en agitation avec 2000 ml de dichlorométhane pendant 24 h, puis 2000 ml de méthanol pendant aussi 24h.

Les 3 types extraits ont été concentrés sous vide au Rotavapor.

#### **I.2.3.2. Extrait aqueux :**

Une macération aqueuse a également été effectuée sur 50 g de poudre avec 500 ml d'eau distillée et placés sous agitation pendant 24 h. Après filtration, l'extrait a été lyophilisé.



**Figure 12.** Différentes étapes d'extraction par épuisement successive du matériel végétal.

## I.2.4. Analyse des extraits du *Zizyphus lotus*

### I.2.4.1. Analyse qualitative des extraits du *Zizyphus lotus*

#### I.2.4.1.1. Tests préliminaires

##### Mise en évidence des flavonoïdes

A 3 ml de chaque extrait, on ajoute 5 ml d' HCl (acide chlorhydrique), puis quelques morceaux du magnésium. En présence des flavonoides (flavone aglycone), une couleur rouge est apparue (Ciulci, 1982).

##### Mise en évidence des tanins :

L'ajout de trichlorure du fer ( $\text{FeCl}_3$ ) 1%, permet de détecter la présence ou non des tanins. La couleur vire au bleu noir en présence des tanins galliques, et au bleu verdâtre en présence des tanins catéchiques (tanins condensés) (Dohou et al., 2003).

### I.2.4.1. 2.Chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation partielle des extraits du *Zizyphus lotus*, on utilise la chromatographie sur couche mince, cette technique de séparation basée sur l'utilisation d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice), dont la séparation dépend des phénomènes d'adsorption et de partage.

L'analyse des extraits du *Zizyphus lotus* a été réalisée sur des plaques de gel de silice avec indicateur de fluorescent (20x20cm, 60 F254), selon la méthode de Diallo et al (2004) avec quelques modifications, les quatre extraits ont été dissous dans leur solvant d'origine.

L'analyse des extraits polaires (AQ, MET) est effectuée par un système de séparation BAW (butanol/acide acétique/eau) avec des proportions (60/15/35). Alors pour les extraits apolaires (DCM, ET) on utilise le système (éther de pétrole/acétate d'éthyle) avec les proportions (8/2).

5 µl de chaque extrait (10mg/ml) et de standard (2mg/ml), sont déposés et les plaques sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par la vapeur de la phase mobile. Après migration, les plaques sont séchées, puis visualisées par 3 systèmes de révélation :

- Révélation physique sous UV à 254nm.
- Révélation physique sous UV à 366nm.
- Révélation chimique par une solution de vanilline sulfurique.
- Révélation chimique par une solution éthanolique du DPPH à 2,4% pour la détection des extraits ayant une activité antioxydante (Juma et Majinda, 2004).

Les rapports frontaux (RF) des spots issus de la séparation sont calculés (le rapport frontal est le rapport entre la distance parcourue par la tache et celle du solvant) et comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification de différents extraits.

### I.2.4.1. 3.Chromatographie liquide à haute performance HPLC –RP-C18

Pour analyser les différents extraits du *Zizyphus lotus* l'HPLC -RP-C18 a été utilisé. La chromatographie liquide à haute performance à **phase inverse** est une technique de séparation, dans laquelle la phase mobile est un liquide polaire (solvant), et la phase stationnaire est une colonne (125 x 4,6mm) étroitement emballée par des particules **C18** (apolaire), ces particules ayant un diamètre moins de 10µm, ce qui nécessite de pomper la phase mobile à travers la colonne à haute pression. La pompe garde un débit précis de sorte que le temps de rétention de chaque pic peut être employé pour identifier des pics de l'échantillon à tester.

Ceci est fait par comparaison des chromatogrammes des standards avec celui de l'échantillon.

Dans notre analyse, nous avons utilisé une élution isocratique dans laquelle une seule source du solvant utilisée pour éluer les composés à travers la colonne. La phase mobile utilisée est un mélange méthanol /eau (60/40), le débit de la phase mobile est 0,5 ml/min. La température est réglée à 40 C<sup>0</sup>. Le détecteur utilisé est un détecteur UV à une longueur d'onde 254nm (Kuntie et al ., 2007).

#### **I.2.4.2. Analyse quantitative des extraits du *Zizyphus lotus* :**

##### **I.2.4.2.1. Dosage des polyphénols**

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin Ciocalteu (Wong et al ., 2006). Ce dosage repose sur le réactif de Folin Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit, ce réactif en un mélange d'oxyde bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés ( Boizot et Charpentier,2006).

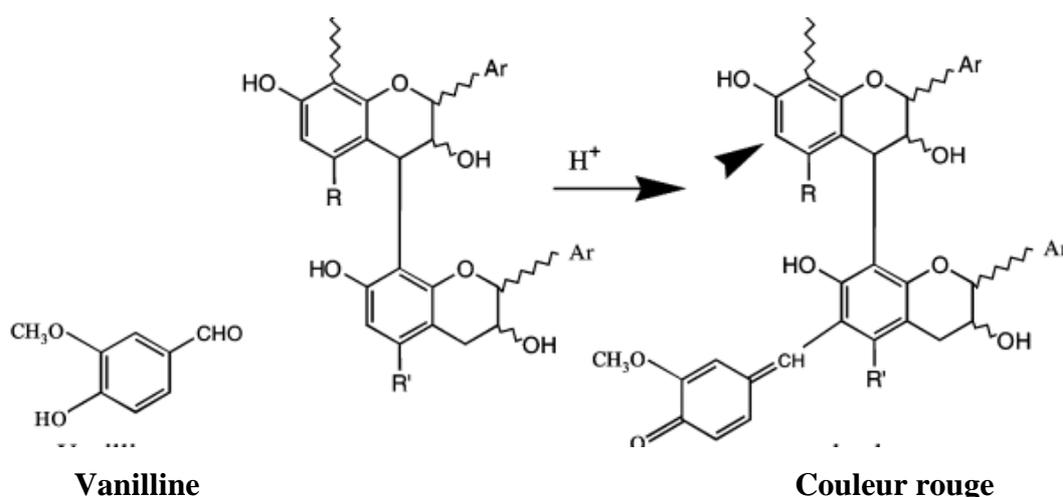
200 µl de chaque extrait (dissous dans le méthanol pour les extraits organiques, et l'eau distillée pour l'extrait aqueux) sont ajoutés à 1 ml du réactif de Folin Ciocalteu dilué 10 fois, après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate du sodium (75g/l) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 2h d'incubation. Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec l'acide gallique (0-200µg/ml) et sont exprimées en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg).

##### **I.2.4.2.2. Dosage des flavonoïdes**

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al .,1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits du *Zizyphus lotus*. 1 ml de chaque échantillon et du standard ( préparés dans le méthanol pour les extraits organiques et l'eau distillée pour l'extrait aqueux )avec dilutions convenables sont ajoutés à 1 ml d'AlCl<sub>3</sub> (2 % dans le méthanol). Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine (0-35µg/ml), et sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).

### I.2.4.2.3. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés dans les extraits du *Zizyphus lotus* est effectué selon la méthode de Broadhurst et Jones (1978), modifiée par Heimler et al. (2006). Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm (Schofield et al., 2001) (**Figure 13**).



**Figure13.** La réaction entre la vanilline est les tanins condensés (Schofield et al., 2001).-

Pour 400µl de chaque échantillon ou standard, on ajoute 3ml d'une solution de vanilline (4% dans le méthanol), et 1,5 ml d'acide hydrochlorique concentré. Le mélange est incubé durant 15 min et l'absorbance est lue à 500nm.

Les concentrations des tanins condensés sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la catéchine (0-300µg/ml), et sont exprimées en microgramme d'équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg E CT/mg).

## I.2.5. Tests des activités biologiques

### I.2.5.1. Activité antimicrobienne

#### Souches microbiennes testées

Les souches microbiennes utilisées sont : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia ATB* (1476), *Candida albicans*.

## Test antimicrobien

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des extraits des fruits obtenus, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de papier Whatmann de 6mm de diamètre. Les disques ont été imprégnés dans différentes solutions (1g/ml) des extraits dissous dans le DMSO (dimethylsulfoxyde) pour les extraits organiques, et dans l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux (Un disque imbibé par le DMSO a été employé en tant que contrôle négative). Puis déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension microbienne d'une densité optique de 0,5McFarland. Nous avons utilisé pour les souches bactériennes le milieu Muller Hinton, et le milieu Saboroud pour la levure. A la fin de la durée d'incubation (18-24h pour les souches bactériennes et 48h pour la levure à 37°C), les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés (Choi et al., 2006).

### I.2.5.2. Tests d'activité antioxydante :

#### I.2.5.2.1. Test du blanchissement du $\beta$ carotène

L'activité antioxydante des extraits du *Zizyphus lotus* est mesurée selon la méthode de Khartal et al (2007). Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de  $\beta$  carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

L'émulsion de  $\beta$ - carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 3 mg de  $\beta$  carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 $\mu$ l de l'acide linoléique et 200mg de tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur, par la suite 100ml d'eau oxygénée est ajouté, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement.

350 $\mu$ l de solution d'extrait ou antioxydant de référence (BHT) (solubilisé dans le méthanol sauf l'extrait aqueux dans l'eau distillée (2mg/ml)) sont additionnés à 25 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacée par 350 $\mu$ l de méthanol) est suivie à 490nm à des intervalles de temps régulières pendant 48heures. L'activité antioxydante relative des extraits (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{AAR} = \frac{\text{Abs}_{t=48h}(\text{échantillon})}{\text{Abs}_{t=48h}(\text{BHT})} \times 100$$

### I.2.5.2.2. Effet scavenger du radical DPPH :

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons utilisé la méthode basée sur le DPPH (diphényl picryl hydrazyl) comme un radical relativement stable, selon le protocole décrit par Mansouri et al (2005). Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu a donné des protons (Sanchez-Moreno, 2002).

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100ml de méthanol. 50µl des solutions d'extraits ou standard (quercétine) sont ajoutés à 1,95ml de DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30min, et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'activité antiradicalaire} = \frac{(\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon})}{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle}} \times 100$$

Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0-12,5mg/ml, 0-4mg/ml, 0-2,5mg/ml, 0-1mg/ml pour les extraits : ET, DCM, MET, AQ respectivement. Alors que pour les antioxydants standard (Rutine, Quercétine, BHT) sont comprises entre 0 à 50µg/ml et entre 0 à 25µg/ml pour la vitamine C.

### I.2.5.2.3. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$ SD. Les sigmoïdes de l'activité antiradicalaire des différents standards et extraits sont effectués par le logiciel (Graph Pad Prism V 5,00).

La différence entre les extraits et les contrôles et la détermination des taux de signification sont effectués par test ANOVA suivi du test Tukey.

# **Chapitre II**

## **Résultats et discussion**

### II.1. Détermination de la teneur en eau dans les fruits du *Zizyphus lotus*

Afin de déterminer la teneur en eau dans les fruits du *Zizyphus lotus*, nous avons utilisé la méthode d'Audigie et al (1987), dont le but est d'exprimer les résultats des constituants biochimiques par rapport à la matière sèche.

**Tableau 4.** La teneur en eau et de matière sèche des fruits du *Zizyphus lotus*

Teneur en eau (g/100g)	Teneur en matière sèche (g/100g)
8,96±0,73	91,03±0,73

Les valeurs représentent la moyenne de 30 essais ±SD

Comparativement aux valeurs trouvées chez d'autres variétés du même genre d'occurrence, le *Zizyphus mauritiana* (Grosskinsky, 1999), *Zizyphus spina christi* (Anthony, 2005) et *Zizyphus jujuba* (Catoire et al ., 1994), dont la teneur en eau est comprise entre 46 à 85%, la valeur que nous avons obtenue pour *Zizyphus lotus* est nettement faible (8,96±0,73%).

Ce ci s'explique probablement par sa conservation pendant de longues durées, et même la différence des conditions climatiques et la répartition géographique.

### II.2. Détermination de la teneur en cendre dans les fruits du *Zizyphus lotus*

La teneur en cendre du *Zizyphus lotus* a été déterminée après incinération, la cendre grisâtre obtenue représente les diverses substances minérales.

**Tableau 5.** La teneur en cendre et de matière organique des fruits du *Zizyphus lotus*

Teneur en cendre (g/100g)	Teneur en matière organique (g/100g)
3,5±0,31	96,5±0,31

Les valeurs représentent la moyenne de 30 essais ±SD

Selon Murdock (2002), la teneur en éléments minéraux de ce fruit est (0,82% de matière sèche), qui est une valeur inférieure à celle de notre échantillon (3,5%).

### II.3. Préparation des extraits à partir des fruits du *Zizyphus lotus*

La préparation des extraits à partir des fruits du *Zizyphus lotus* a été effectuée selon la méthode de Diallo et *al.* (2004) modifiée. Cette méthode est basée sur l'utilisation des solvants à polarité croissante (Ether de pétrole →Dichlorométhane→Méthanol), avec la préparation d'une macération aqueuse à 10%. De ce fait, quatre différents extraits ont été obtenus.

- **L'extrait éthérique (ET)**, qui représente l'extrait le plus apolaire, et le plus riche en matière grasse.
- **L'extrait dichlorométhanique (DCM)**, représente l'extrait moyennement apolaire
- **L'extrait méthanolique (MET)** représente l'extrait polaire
- **L'extrait (AQ)**, représente l'extrait le plus polaire.

La couleur, l'aspect ainsi que le rendement de chaque extrait par rapport au poids du fruit sec sont représentés dans **le tableau 6** ci-dessous.

**Tableau 6.** Aspects, couleurs et rendement des divers extraits du fruit *Zizyphus lotus*

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement
<b>ET</b>	Huileux	Vert	0,36%
<b>DCM</b>	Huileux	Vert noir	0,28%
<b>MET</b>	Pâteux	Marron foncé	6,4%
<b>AQ</b>	poudre	Marron clair	40,4%

Les résultats obtenus montrent que parmi les quatre extraits, l'extrait (AQ) représente le rendement le plus élevé (40,4%), suivi par l'extrait méthanolique 6,4%, alors les extraits apolaires possèdent les rendements bas, dont l'extrait éthérique (0,36%) suivi par l'extrait dichlorométhanique(0,28%).

L'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante et sous agitation contenue, 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).

#### II.4. Analyse des extraits du *Zizyphus lotus* :

##### II.4.1. Analyse qualitative des extraits du *Zizyphus lotus*

##### II.4.1.1. Tests préliminaires

**Tableau 7.** Résultats des tests préliminaires des flavonoïdes et des tanins sur les différents extraits du *Zizyphus lotus*

Extraits	Métabolite testé	Couleur résulte	Résultats
ET		-	-
DCM	<b>Flavonoïde</b>	-	-
MET		Couleur rouge	+
AQ		Couleur rouge	+
ET		-	-
DCM	<b>Tanins</b>	-	-
MET		Bleu verdâtre	+
AQ		Bleu verdâtre	+

A l'égard des résultats obtenus, la présence des flavonoïdes et des tanins dans les fruits du *Zizyphus lotus* est évidente, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Borgi et al. (2007(b)).

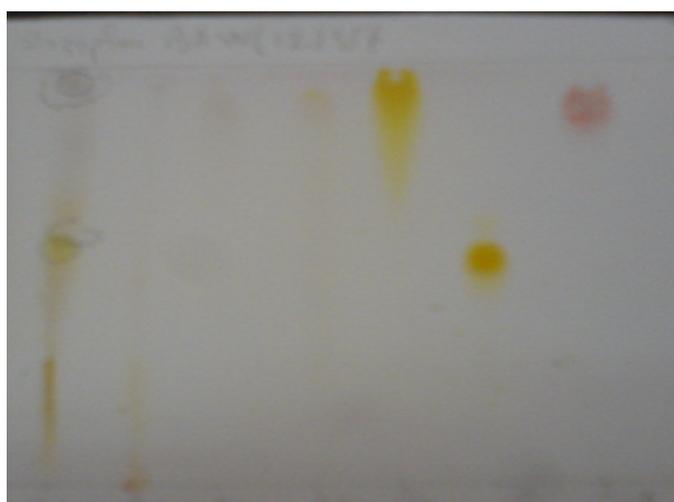
Les extraits polaires montrent une présence des flavonoïdes plus importante que les extraits apolaires, ce qui peut être attribué à la différence du degré de polarité des flavonoïdes, dont les flavonoïdes polaires représentent la fraction la plus élevée.

L'apparition de la couleur bleu verdâtre reflète la présence des tanins catéchiques (condensés) dans les extraits polaires, alors son absence totale dans les extraits apolaires. Les mêmes résultats sont trouvés par Borgi et *al.* (2007(b)), qui ont effectué le test préliminaire des tanins sur différents extraits obtenus à partir des différents organes du *Zizyphus lotus*, dont ses résultats ont révélé la présence des tanins dans les extraits polaires (aqueux et méthanolique), et leur absence dans l'extrait chloroformique (solvant équivalent du point de vue polarité au dichlorométhane utilisé dans le présent travail).

#### II.4.1.2. Analyses chromatographiques

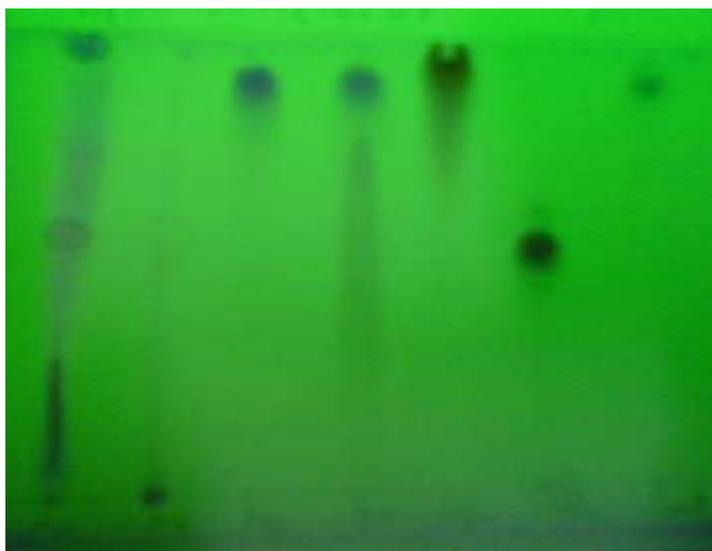
##### II.4.1.2.1. Chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation partielle des différents extraits du *Zizyphus lotus*, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée. Les standards utilisés sont des composés phénoliques. La rutine (Rut), quercétine (Que), catéchine (Cat) sont des flavonoïdes, l'acide tannique (At) et l'acide gallique (Ag) sont des acides phénoliques. Le système de migration utilisé (BAW) butanol-acide acétique-eau (60/15/35) permet seulement de séparer l'extrait MET. Alors pour les extraits DCM et ET, le système de migration (Ether de pétrole/acétate d'éthyle) (8/2) a été employé



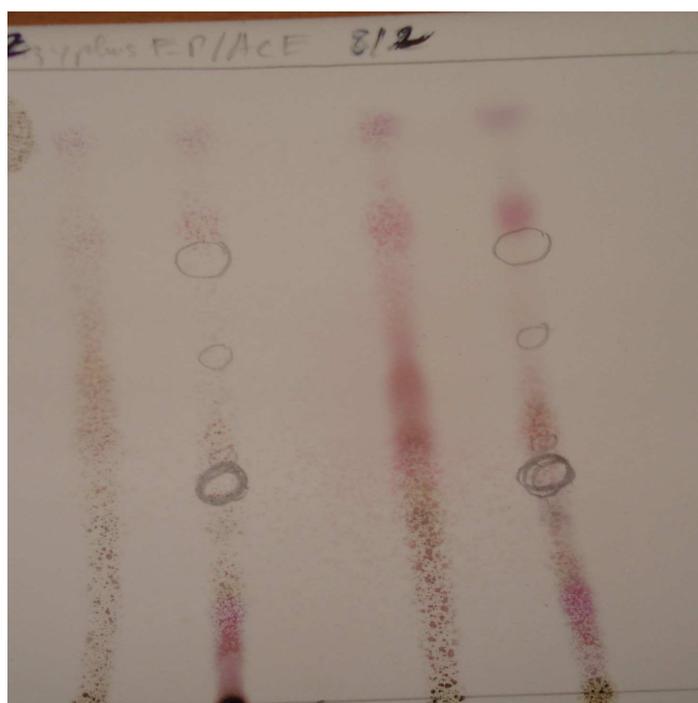
MET AQ Ag At Que Rut Cat

**Figure 14.** Chromatographie sur couche mince des extraits polaires des fruits du *Zizyphus lotus* après révélation par la vanilline sulfurique



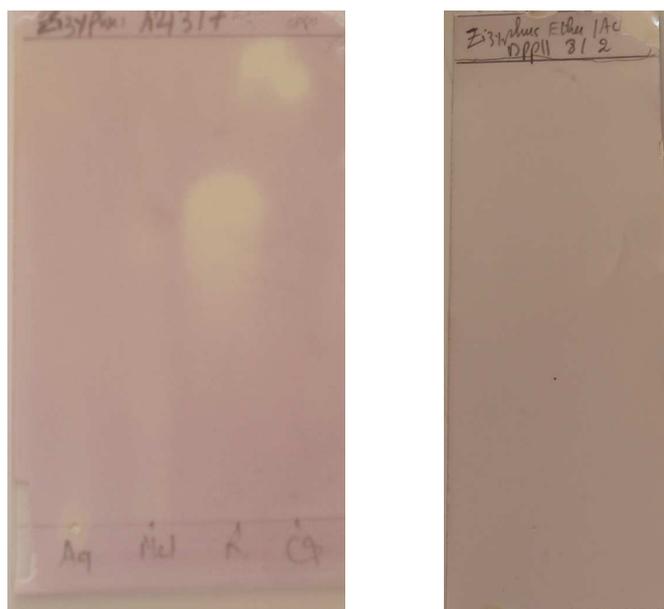
MET AQ Ag At Que Rut Cat

**Figure 15.** Chromatographie sur couche mince des extraits des fruits du *Zizyphus lotus* (Observation sous la lampe UV (254nm))



ET DCM ET DCM

**Figure 16.** Chromatographie sur couche mince des extraits apolaires des fruits du *Zizyphus lotus* (Révélation par la vanilline sulfurique)



AQ MET Rut Que

ET DCM

**Figure 17.** Chromatographie sur couche mince des extraits des fruits du *Zizyphus lotus* (Révélation par une solution de DPPH)

**Tableau 8.** Rapports frontaux et couleurs après révélation des standards

Standards	Couleur après révélation (vanilline sulfurique)	RF
Catechine	Rouge	0,87
Quercétine	Jaune orange	0,93
Rutine	orange	0,52
Acide gallique	Mauve	0,86
Acide tannique	Mauve	0,83

Après révélation, deux taches apparaissent pour l'extrait MET, elles sont visibles sous les révélateurs (vanilline sulfurique, UV 254nm et UV366nm) (**Figure 14,15**).

La mesure des rapports frontaux de chacune des taches révèle que l'une des tache correspond à la quercétine (RF=0,93) et l'autre à la rutine (RF=0,52), ceci est en

accord avec les résultats obtenus par Kriventsov et Krakhanova (1970) qui ont montré la présence des polyphénols et de la rutine dans les fruits du *Zizyphus lotus*.

Alors pour le système (Ether de pétrole/acétate d'éthyle) (8/2), plusieurs taches apparaissent pour les extraits apolaires (ET, DCM) avec des couleurs mauves, et roses, témoignant probablement la présence des stérols et terpènes (**Figure 16**).

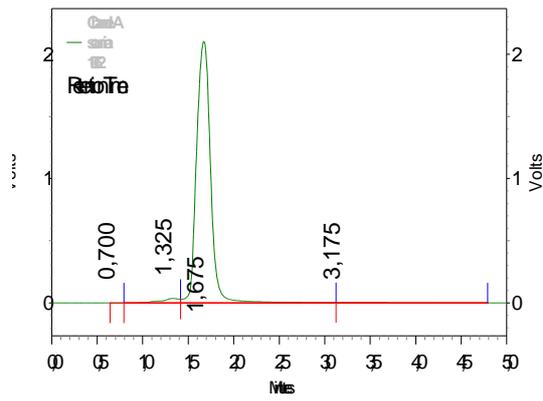
La révélation de la plaque par la solution éthanolique de DPPH est une CCM de criblage qui permet l'obtention d'une vue préliminaire sur l'activité antioxydante des différents extraits testés. Les substances actives sont visualisées comme des taches jaunes sur un fond violet (**Figure 17**).

Globalement, l'intensité des taches jaunes est plus dense dans les extraits polaires (AQ, MET) par rapport aux extraits apolaires (ET, DCM) qui ne présentent aucune tache jaune. Notant toutefois qu'un résultat négatif obtenu pour un extrait testé ne doit pas exclure la présence de substances actives dans cet extrait.

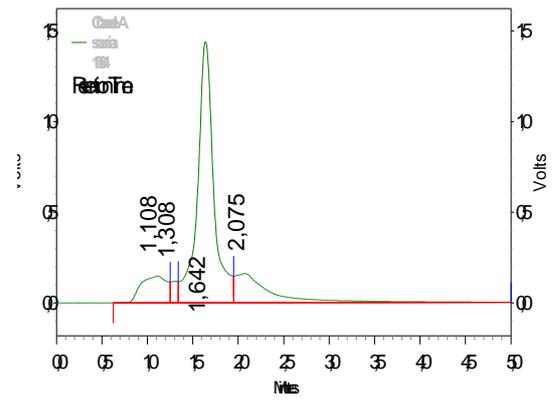
L'une des taches apparaissent pour l'extrait MET, une tache jaune correspondante à la rutine (RF=0,52), ce qui confirme le résultat obtenu sous la révélation par la vanilline sulfurique, alors nous avons remarqué l'absence de la tache qui est normalement correspondante à la quercétine, ceci peut être attribué à la faible concentration de la quercétine présent dans l'échantillon testé. Alors pour l'extrait AQ une tache jaune apparue, ayant un (RF=0,93) correspondant à la quercétine qui n'apparaît pas sous les autres révélateurs.

#### **II.4.2.2. Chromatographie liquide à haute performance HPLC –RP-C18**

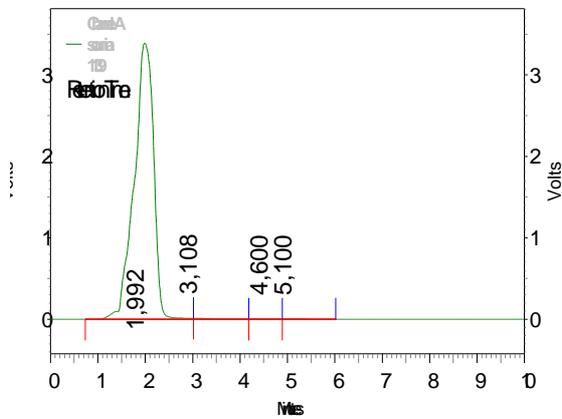
L'HPLC-RP C18 permet d'identifier la présence de quelques substances dans chacun des quatre extraits étudiés, par comparaison entre le temps de rétention des standards (**Figure18**) et les chromatogrammes des extraits.



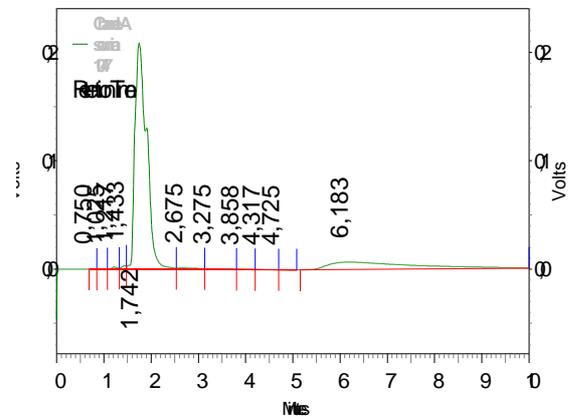
Acide gallique



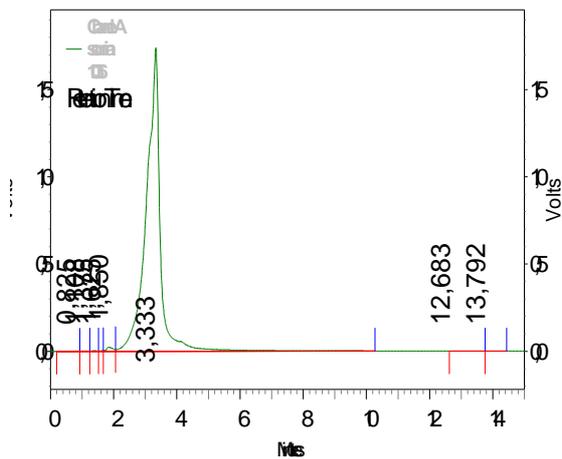
Acide tannique



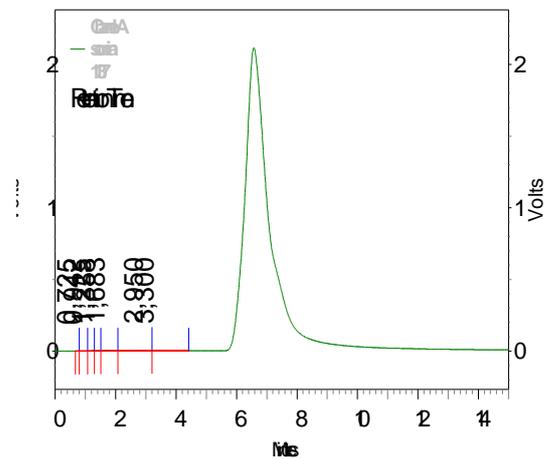
Acide caféique



Catéchine



Rutine



Quercétine

Figure 18. Chromatogrammes des différents standards testés par l'HPLC

**Tableau 9.** Temps de rétention des standards testés

Standards	(TR) min
Quercétine	6,5
Rutine	3,3
Catechine	1,7
Acide cafféique	1,9
Acide tannique	1,64
Acide gallique	1,67

Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau suivant :

**Tableau 10.** Les standards détectés dans les différents extraits du *Zizyphus lotus*

	Quercétine	Rutine	Catechine	A.cafféique	A.gallique	Atannique
<b>ET</b>	-	-	+	+	-	-
<b>DCM</b>	-	-	+	+	-	-
<b>MET</b>	-	-	-	+	-	-
<b>AQ</b>	+	-	+	-	-	-

L'analyse des différents extraits par l'HPLC permet d'identifier la présence de la catéchine et l'acide caféique dans les extraits apolaires (ET, DCM) (**Figure 19,20**)

Alors pour l'extrait MET (**figure 21**), l'acide caféique est le seul composant détecté, ceci est correspondant au résultat obtenu par Capanoglu et *al.* (2006) qui a réalisé l'HPLC sur le *Zizyphus vulgaris*

Pour l'extrait aqueux (**Figure 22**), deux composants sont détectés, la catéchine et la quercétine qui est apparu précédemment après révélation par la solution du DPPH.

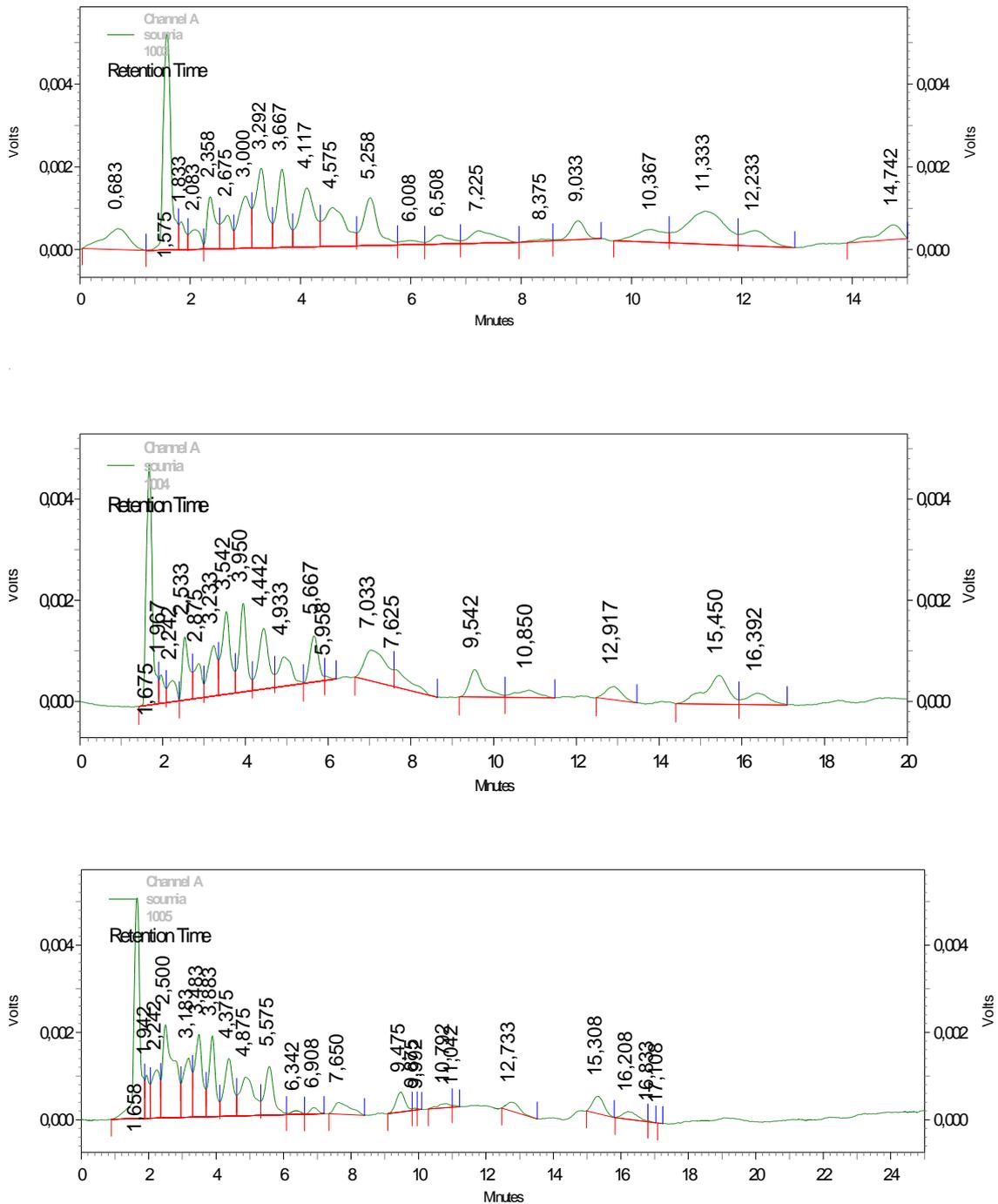


Figure 19. Chromatogrammes obtenus pour l'extrait éthéré du *Zizyphus lotus*

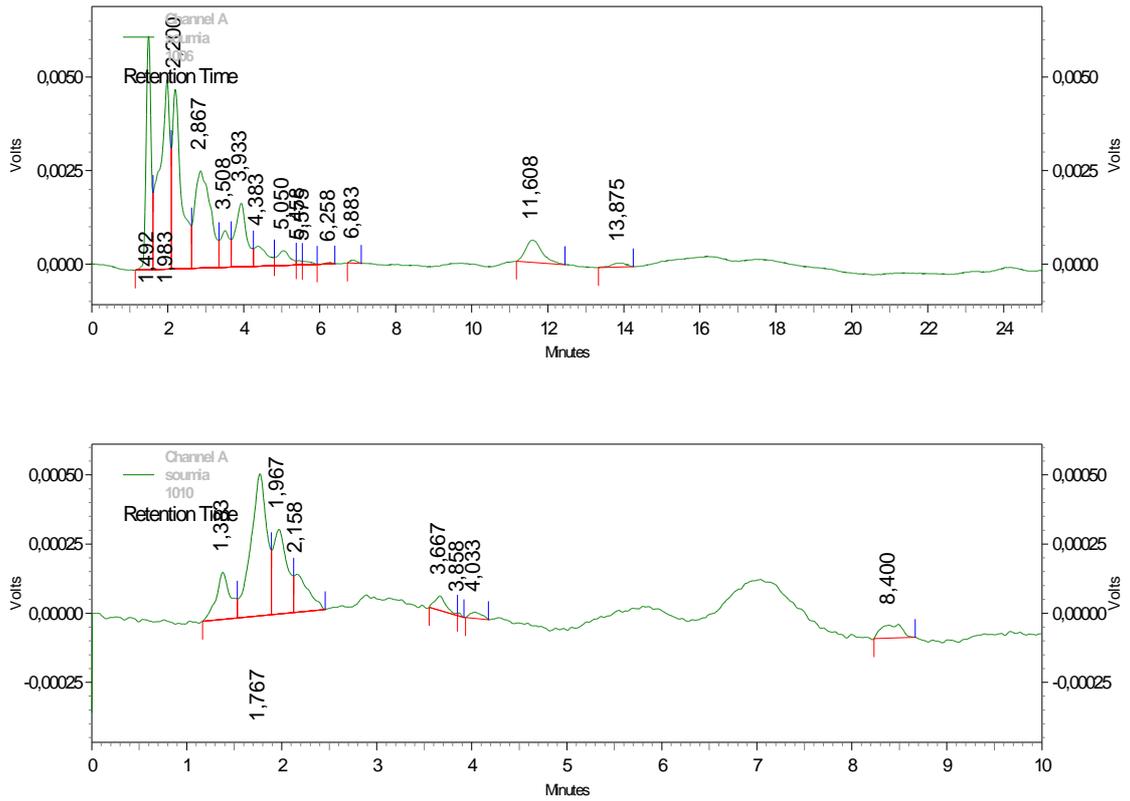


Figure 20. Chromatogrammes obtenus pour l'extrait du dichlorométhane du *Zizyphus lotus*

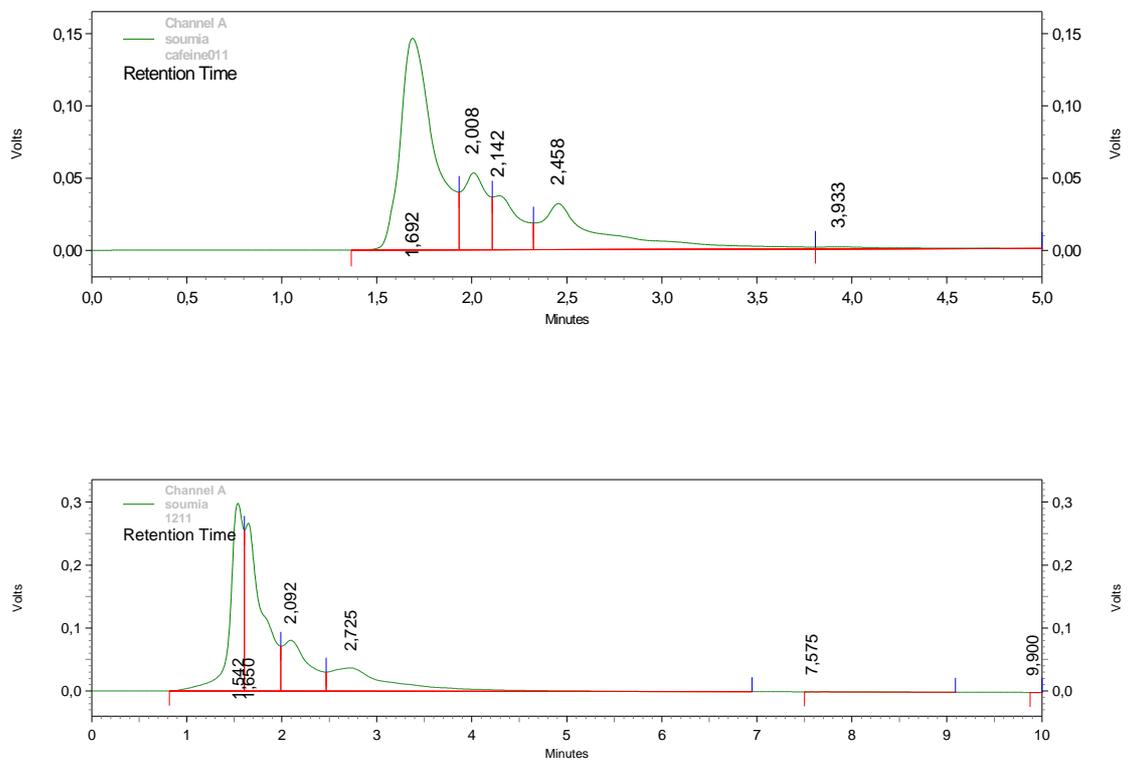
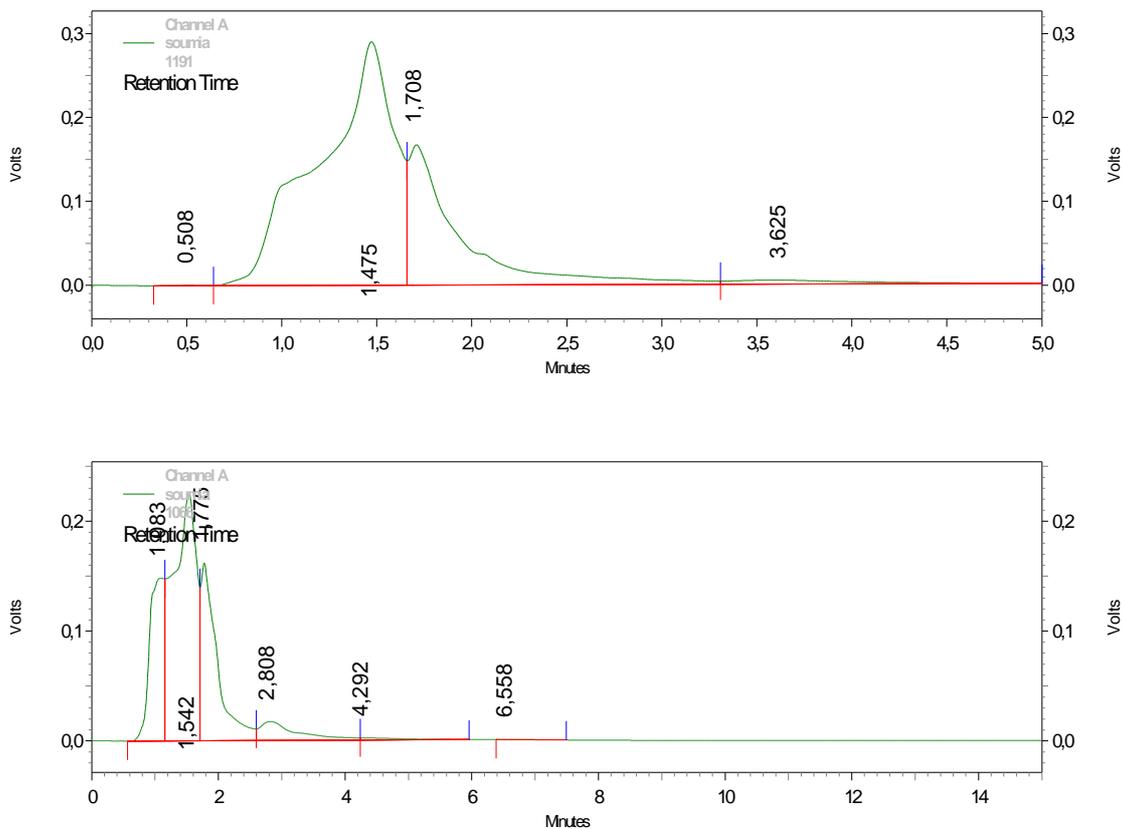


Figure 21. Chromatogrammes obtenus pour l'extrait méthanolique du *Zizyphus lotus*



**Figure 22.** Chromatogrammes obtenus pour l'extrait aqueux du *Zizyphus lotus*

#### II.4.2. Analyse quantitative des extraits des fruits du *Zizyphus lotus*

Afin de caractériser les différents extraits préparés à partir des fruits du *Zizyphus lotus*, un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins 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 (Li et al., 2007). L'acide gallique a été utilisé comme standard. Tandis que celui des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (Baharun et al., 1996), en utilisant comme standard la quercétine, enfin celui des tanins condensés a été effectué selon la méthode de vanilline (Broadhurst et Jones 1978), modifiée par Heimler et al. (2006), en utilisant la catechine comme standard. Les résultats sont représentés dans le **tableau 11** et les gammes d'étalonnage dans les **figures 23, 24, 25**

**Tableau 11.** Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés dans les différents extraits du fruit du *Zizyphus lotus*

Extrait	Polyphénols <sup>(a)</sup>	Flavonoïdes <sup>(b)</sup>	Tanins <sup>(c)</sup>
ET	2,34±0,54	0,64±0,4	-
DCM	1,99±0,12	0,71±0,5	-
MET	5±0,00	0,83±0,17	4,57±0,94
AQ	5,8±1,24	1,82±0,26	6,77±1,95

<sup>(a)</sup> µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

<sup>(b)</sup> µg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

<sup>(c)</sup> µg d'équivalent de catéchine par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 à 4 mesures ± SD.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux montrent que les extraits polaires (méthanolique et aqueux) sont les extraits les plus riches en polyphénols, dont les valeurs sont très proches (5±0,00 versus 5,8±1,24). D'autre part les extraits apolaires (éthérique et du dichlorométhane) ont montré des valeurs voisines (2,34±0,54 versus 1,99±0,12).

Dans une étude faite sur cinq variétés du jujube chinois (*Zizyphus 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 (*Zizyphus jujuba* Sanbianhong) (5,18±0,29 µg EAG/mg d'extrait) est presque similaire à celui obtenu avec l'extrait aqueux du *Zizyphus lotus* (5,18±1,24 µg/mg d'extrait).

La détermination quantitative des flavonoïdes totaux par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait aqueux est l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de (1,82±0,26µg EQ/mg d'extrait), suivi par l'extrait méthanolique (0,83±0,17 µg EQ/mg d'extrait). Par la suite vient les extraits apolaires (ET, DCM), dont l'extrait dichlorométhane avec une teneur de (0,71±0,5µg EQ/mg d'extrait), suivi par l'extrait éthérique (0,64±0,4 µg EQ/mg d'extrait).

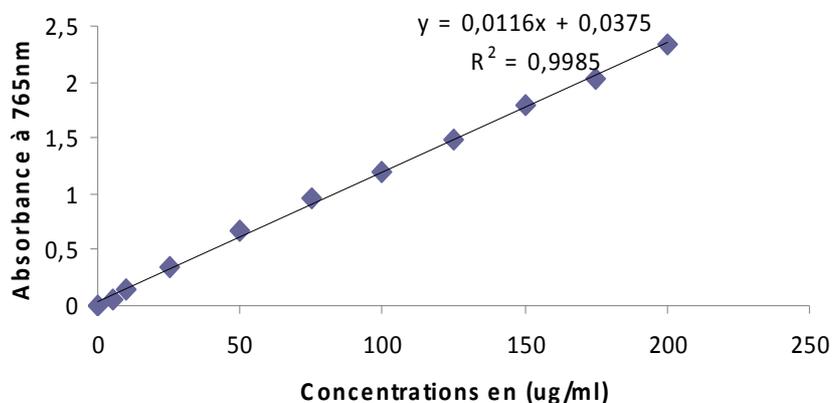
Capanoglu et al. (2006) ont dosé les flavonoides dans l'extrait méthanolique du *Zizyphus vulgaris*, où ils ont trouvé une valeur supérieure ( $5,93\mu\text{g/ml}$ ) à celle trouvée dans l'extrait méthanolique du *Zizyphus lotus* ( $0,83\mu\text{g/ml}$ ).

En tenant compte de la polarité des extraits, il apparaît que la teneur en flavonoides dans le *Zizyphus lotus* augmente avec la polarité de l'extrait (AQ>MET>DCM>ET). Pawliska et al. (2009) a fait une étude sur deux espèces *Zizyphus jujuba* et *Zizyphus spina-christi*, dont ils ont attribué la différence de teneur en flavonoides entre les fruits, non seulement à l'espèce, mais aussi aux conditions de croissance, comme le sol, les conditions environnementales et géographiques durant le développement du fruit, le degré de maturation et la différence génétique.

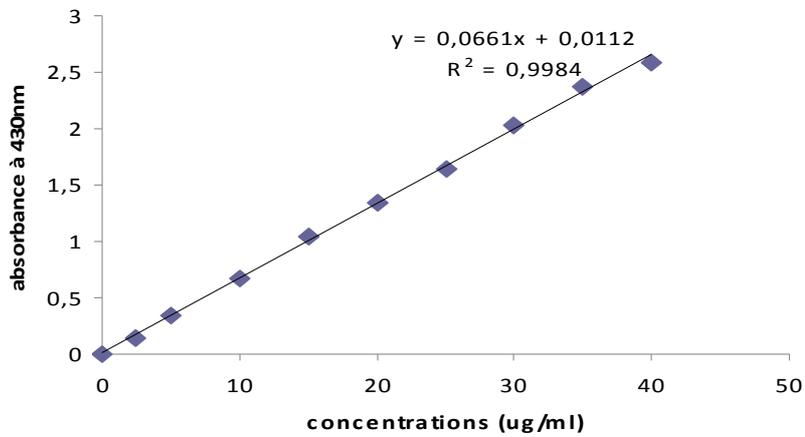
Le dosage des tanins condensés montrent la haute teneur de ces molécules dans les extraits polaires (méthanolique et aqueux), dont l'extrait aqueux représente l'extrait le plus riche ( $6,77\pm 1,95\mu\text{g ECT/mg}$  d'extrait), suivi par l'extrait méthanolique ( $4,57\pm 0,94\mu\text{g ECT/mg}$  d'extrait)

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation linéaire significative ( $R^2=0,79$   $p\leq 0,05$ ) entre la teneur des extraits en flavonoïdes et en composés phénoliques (**Figure 26**). De même, une corrélation linéaire significative ( $R^2=0,98$ ,  $p\leq 0,05$ ) entre la teneur des extraits en tanins condensés et en composés phénoliques (**Figure 27**).

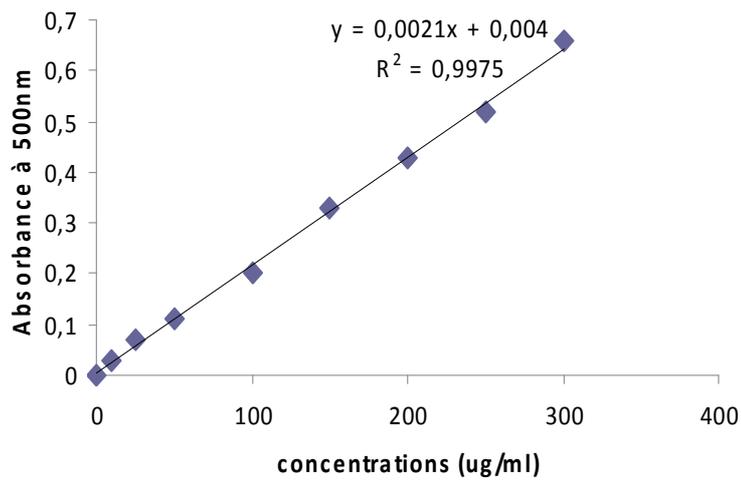
Ceci apparaît logique, où les flavonoides et les tanins représentent les composés prépondérants des polyphénols.



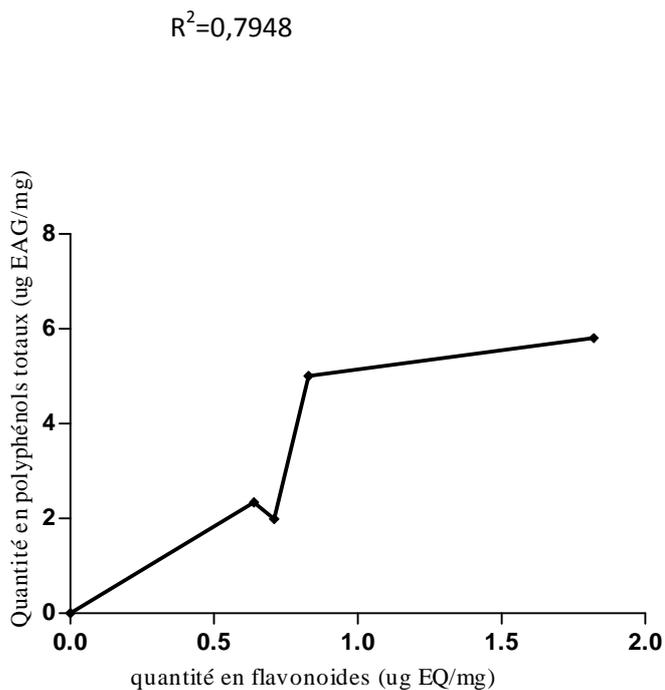
**Figure 23.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne  $\pm$  SD de deux essais)



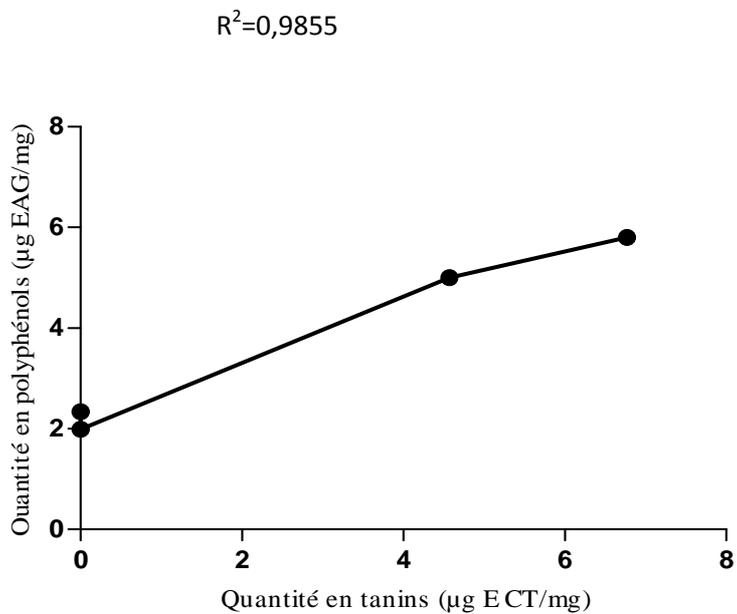
**Figure 24.** Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne  $\pm$  SD de deux essais)



**Figure 25.** Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne  $\pm$  SD de deux essais)



**Figure 26.** Corrélation linéaire entre la quantité en polyphénols totaux et la quantité des flavonoides des différents extraits du fruit *Zizyphus lotus* ( $p \leq 0,05$ )



**Figure 27.** Corrélation linéaire entre la quantité en polyphénols totaux et la quantité des tanins condensés des différents extraits du fruit *Zizyphus lotus* ( $p \leq 0,05$ )

## II.5. Activités biologiques

### II.5.1. Activité antimicrobienne des extraits du *Zizyphus lotus*

L'activité antimicrobienne des différents extraits des fruits du *Zizyphus lotus* a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (**Figure 29**).

**Tableau 12.** Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne obtenus par différents extraits du *Zizyphus lotus*

Extraits	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
ET	22,07±0,81	45,72±0	10,32±1,65	17,16±0	-	9±0
DCM	14,13±0,58	-	-	-	-	-
MT	16,45±0,49	6,29±0,05	9,76±1,81	-	-	-
AQ	17,41±1,71	-	-	-	7±0	12±0

Les valeurs sont une moyenne de 3 à 4 essais±SD (les zones sont mesurées en mm)

Tous les extraits du *Zizyphus lotus* se sont révélés actifs avec un degré différent, lié au contenu des extraits aux substances à activité antimicrobienne. Ghédira (1995) a montré qu'un alcaloïde de cette espèce présente une activité antibactérienne significative, sans négliger l'effet synergique des autres molécules à effet antimicrobien.

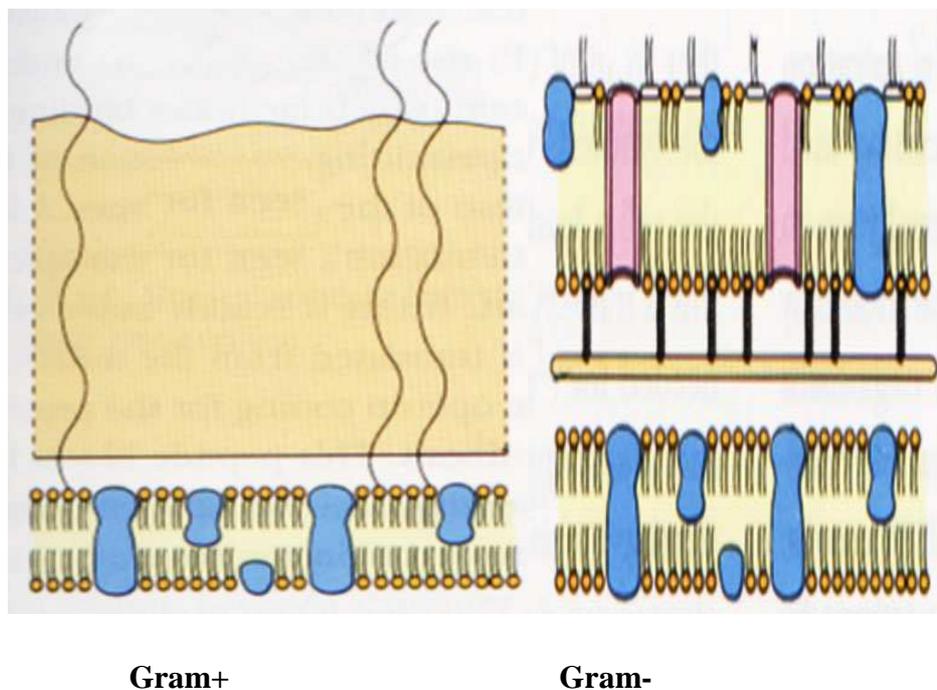
D'après les résultats obtenus, il apparaît que toutes les souches microbiennes testées sont inhibées au moins par l'un des extraits, ce qui confirme le spectre large de l'activité antimicrobienne de ce fruit.

L'extrait éthérique du *Zizyphus lotus* semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant, parmi les quatre extraits, en présentant des zones d'inhibition de croissance avec toutes les souches microbiennes sauf *Salmonella thyphimurium*, de même cet extrait montre la plus grande zone d'inhibition, qui est apparue avec *Escherichia coli* (une zone d'inhibition > 45mm), supérieure à toutes les zones obtenues après test des antibiotiques sur la même souche (Amoxilline 22mm, Cefoxitine 26mm).

Cette activité de l'extrait éthérique peut s'expliquer par l'effet antimicrobien puissant des composés apolaires de l'extrait éthérique. Une étude faite par Nasif (2002) sur les graines du *Zizyphus spina christi* a montré que les acides gras de la fraction lipidique présentent une forte activité contre *E coli*. L'extrait (DCM) a montré seulement une activité avec *Staphylococcus aureus*.

Les extraits polaires du *Zizyphus lotus* ont montré une activité antimicrobienne avec toutes les souches microbiennes sauf *Klebsiella pneumonia*, l'extrait méthanolique a montré des zones d'inhibition avec trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), alors l'extrait (AQ) a une activité avec *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium* et *Candida albicans*.

Il est appaît que le *Staphylococcus aureus* (gram positive) est la bactérie la plus susceptible par comparaison avec les autres souches (gram négative) ; ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries gram positives et les bactéries gram négatives. La paroi cellulaire des bactéries gram positives est constituée par une seule couche alors que la paroi cellulaire des gram négatives a une structure multicouche liée par une membrane cellulaire externe (Ali-Shtayeh et al ., 1998) (**Figure 28**)



**Figure28** .Structure de la paroi bactérienne (Ali-Shtayeh et al ., 1998)



Zones d'inhibitions de l'extrait MET sur *Staph a*

Zones d'inhibition de l'extrait ET sur *Staph a*



Zones d'inhibitions de l'extrait ET sur *Pseudo a*

Zones d'inhibition de l'extrait AQ sur *Staph a*



Zones d'inhibitions de l'extrait ET sur *E coli*

Zones d'inhibitions de l'extrait AQ sur *Candida a*



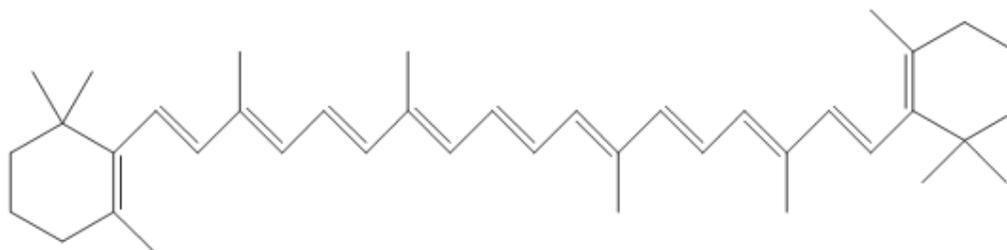
Zones d'inhibitions de l'extrait ET sur *Klebsiella p*

**Figure 29.** Zones d'inhibitions obtenues par différents extraits du *Zizyphus lotus*

## II.5.2. Activité antioxydant

### II.5.2.1. Test du blanchissement du $\beta$ -carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, et des hydroperoxydes diène conjugués (Kaur et Kapoor, 2002). Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé (**Figure 30**) qui perd ses doubles liaisons entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivi spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène (Yanishlieva et Marinova, 1995 ; Yang et al., 2008)



**Figure 30.** Structure chimique de  $\beta$ -carotène (Diallo, 2005)

La cinétique du blanchissement du  $\beta$ -carotène en absence et présence des extraits du *Zizyphus lotus*, du BHT et les activités antioxydantes relatives (AAR) sont représentés dans (**Figure 31,32**).

D'après ces résultats, il est évident que le BHT et les extraits testés inhibent d'une manière significative ( $p \leq 0,01$ ) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif qui représente (100%) de la peroxydation.

L'extrait aqueux (AQ) montre la plus grande activité inhibitrice, dont son activité antioxydante relative est 85,05%, mais cette activité reste significativement inférieure ( $p \leq 0,001$ ) à celle du BHT (100%) utilisé comme contrôle positif.

Une activité antioxydante intermédiaire a été obtenue qu'avec l'extrait méthanolique (MET) (69,24%) qui a une activité significativement supérieure ( $p \leq 0,001$ ) à celle de l'extrait éthérique (36,48%).

L'activité de ce dernier est statistiquement similaire à celle de l'extrait du dichlorométhane (33,9%) qui représente l'extrait le moins actif.

En comparaison avec BHT, l'extrait aqueux (AQ) est 1,7fois moins actif que le BHT, l'extrait du dichlorométhane (DCM) est 2 fois moins actif que l'extrait méthanolique, et 2,5 fois moins actif que l'extrait aqueux , et presque 3 fois moins actif que le BHT.

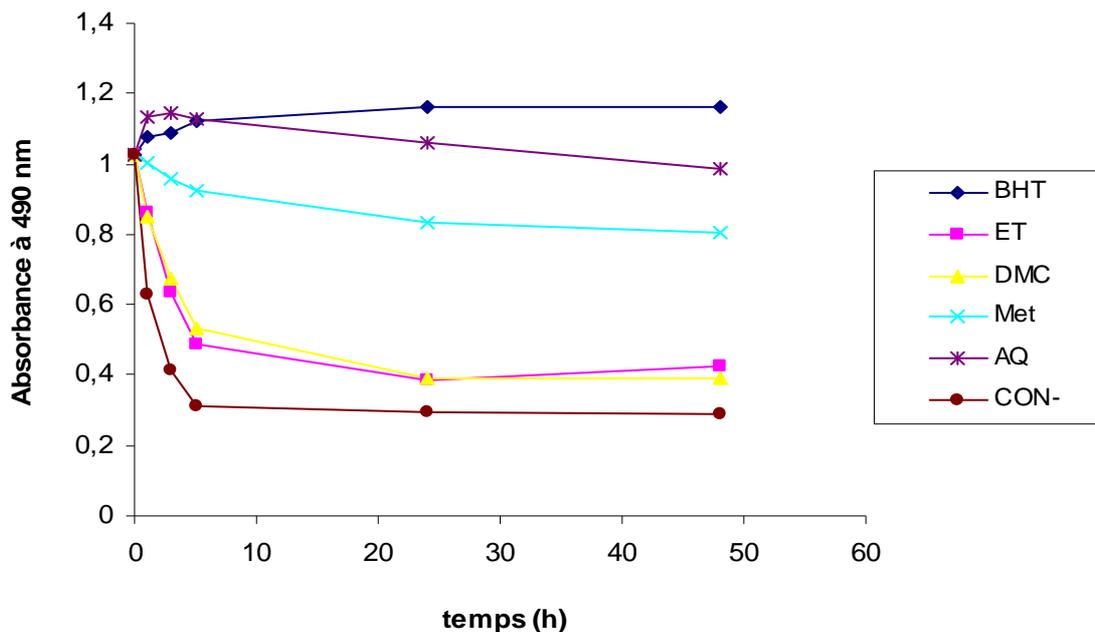
Le test de blanchissement de  $\beta$ -carotène a été réalisé par Kamiloglu et al. (2009) sur les extraits méthanoliques de 50 génotypes du *Zizyphus jujube* , où la moyenne de l'activité antioxydante obtenue est 73% qui est une valeur modérément supérieure à celle obtenue de l'extrait méthanolique du *Zizyphus lotus* (69,24%).

En effet, une corrélation linéaire remarquable et significative ( $R^2=0,99$ ,  $p\leq 0,05$ ) a été mise en évidence entre l'ARR (activité antioxydante relative) des extraits du *Zizyphus lotus* et leur teneurs en composés phénoliques (**Figure 33**). Ce ci est en accord avec les résultats obtenus par Yang et al. (2002) qui ont rapporté qu'il y a une corrélation entre le contenu en composants phénoliques et la capacité antioxydante.

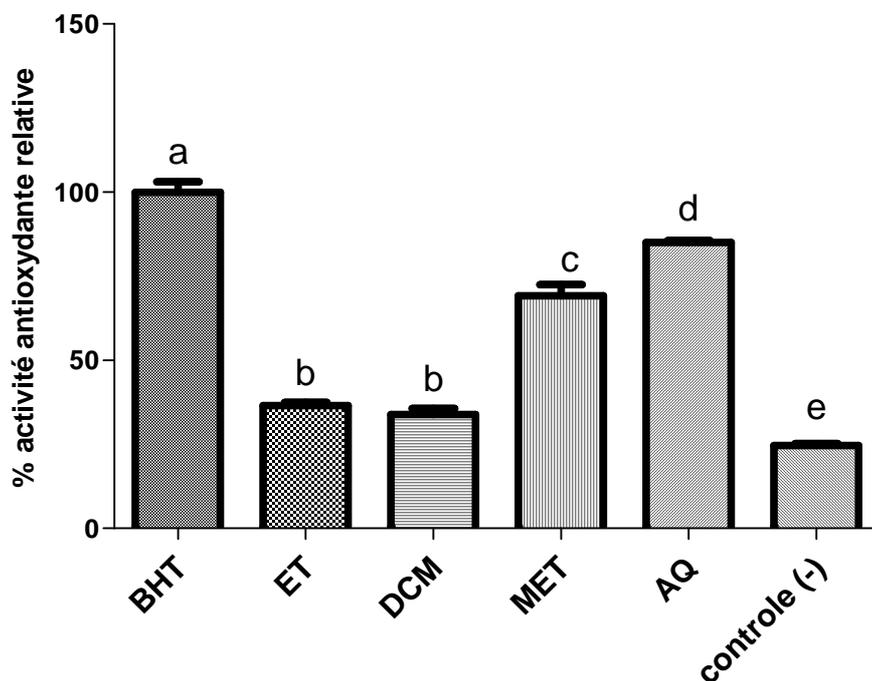
D'ailleurs, il y a une autre corrélation significative ( $R^2=0,99$ ,  $p\leq 0,05$ ), entre l'AAR et la teneur en tanins condensés des différents extraits du *Zizyphus lotus* (**Figure 34**), alors cette corrélation est non significative entre l'AAR et la teneur en flavonoides des différents extraits.

Ces résultats nous permettent de déduire le rôle important des polyphénols des extraits du *Zizyphus lotus*, et précisément les tanins condensés dans l'activité antioxydante relative, où leur noyau phénolique leur confère une activité antioxydante puissante (Peronny, 2005).

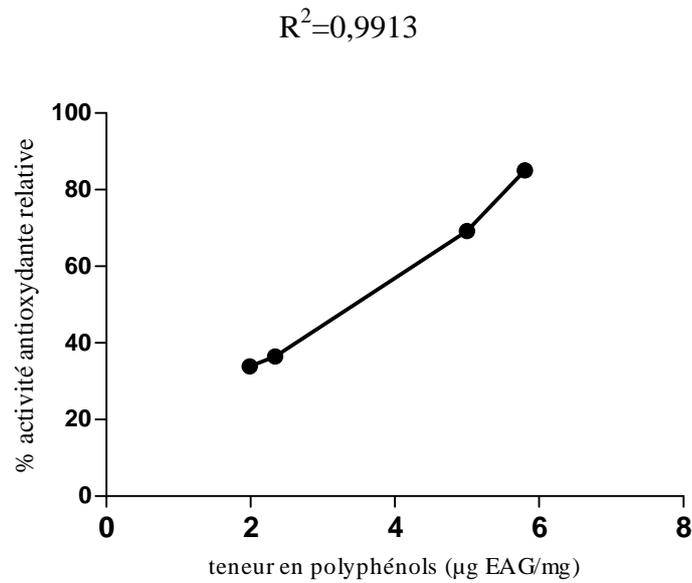
D'une manière générale, ces résultats sont en accord avec la littérature qui suggère que l'activité antioxydante des extraits végétaux dépend du type du solvant d'extraction et de sa polarité, dont la distribution des substances à activité antioxydante entre les différents extraits dépend de polarité des extraits (Kang et al., 2003).



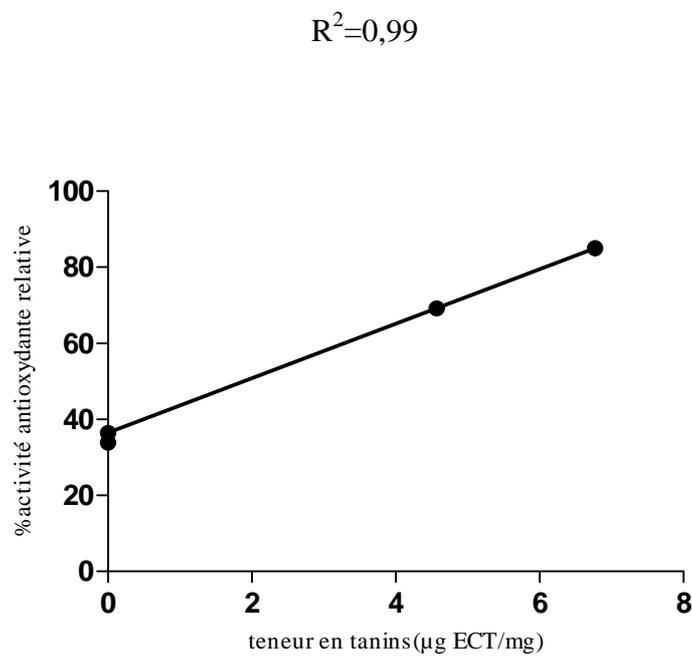
**Figure 31.** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits du *Zizyphus lotus*, du BHT, (chaque valeur représente la moyenne de trois essais)



**Figure 32.** Activité antioxydante relative des extraits du fruit du *Zizyphus lotus*, du BHT dans le système carotène /acide linoléique (les valeurs sont la moyenne de trois mesures  $\pm$  SD), les barres avec des lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ( $p \leq 0,05$ ).



**Figure 33.** Corrélation linéaire entre la teneur en polyphénols et le pourcentage de l'activité antioxydante relative ( $p \leq 0,05$ ).



**Figure 34.** Corrélation linéaire entre la teneur en tanins et le pourcentage de l'activité antioxydante relative ( $p \leq 0,05$ ).

### II.5.2.2. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits du *Zizyphus lotus* 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 (**Figure 35**).



Diphenylpicrylhydrazyl + **Antioxydant-OH** → Diphenylpicrylhydrazine + **Antioxydant-O<sup>•</sup>**  
 (Couleur violet) (Couleur jaune)

**Figure 35.** Réaction d'un antioxydant avec le DPPH (Molineux, 2004).

Le DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) 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 antiradicalaires des extraits végétaux (Yi et al., 2008).

Les profils d'activité antiradicalaire obtenu (**Figure 36,37**) révèlent que les extraits du *Zizyphus lotus* possèdent une activité antiradicalaire dose dépendante, les  $IC_{50}$  sont déterminés pour les extraits polaires (MET et AQ) seulement car les extraits apolaires n'atteignant pas 50% d'activité (**Tableau13**) Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont introduits :

-**Calcul de l'  $EC_{50}$**  qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%,  $EC_{50} = (IC_{50}/mg \text{ de DPPH}/ml)$ ]

-**Calcul du pouvoir antiradicalaire (APR)** qui est inversement proportionnel à l' $EC_{50}$  (Prakash et al., 2007).

**Tableau 13.** Activité antiradicalaire des extraits du fruit du *Zizyphus lotus*

	IC <sub>50</sub> (µg /ml)	EC <sub>50</sub> (µg /µg DPPH)	APR
<b>BHT</b>	4,47 ± 1,00	0,21± 0,04	4,77± 1,09
<b>Rutine</b>	1,25±0,01	0,06±0,00	16±0,18
<b>Quercétine</b>	0,44±0,00	0,02 ± 0,00	50 ±0 00
<b>Vitamine C</b>	1,44±0,07	0,07±0,00	13,86±0,74
<b>MET</b>	195± 35,35	9,75± 1,76	0,1 ±0,01
<b>AQ</b>	55±35,35	2,75±1,76	0,45±0,28
<b>DCM</b>	-	-	-
<b>ET</b>	-	-	-

Les valeurs représentent la moyenne de deux essais ± SD

A des fins comparative, quatre antioxydants standards sont utilisés, le BHT, la rutine, la quercétine et la vitamine C (**Figure 38**), ils ont montré une activité antiradicalaire puissante avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 4,47µg/ml et 1,25 µg/ml, 0,44 µg/ml, 1,44µg/ml et des APR de l'ordre de 4,77, 16, 50 et 13,86 respectivement. La valeur de EC<sub>50</sub> de la vitamine C est similaire à celle rapportée auparavant (EC<sub>50</sub>=0,07µg/µg DPPH) par Siddhurajuet et Manian (2007).

Baydar et *al.* (2007) ont rapporté que la rutine a montré une grande efficacité antiradicalaire vis-à-vis le radical DPPH par rapport le BHT, ce qui est en accord avec les résultats du présent travail, dont la rutine possède un pouvoir antiradicalaire 4 fois supérieure à celui du BHT.

Parmi les quatre extraits du *Zizyphus lotus*, l'extrait aqueux représente l'extrait le plus actif, avec une IC<sub>50</sub> de l'ordre 55µg /ml et un APR de 0,45 suivi par l'extrait MET avec une IC<sub>50</sub> 195µg/ml et un APR de 0,1.

Par contre les extraits apolaires (ET, DCM) montrent une très faible activité antiradicalaire, dont le pourcentage de l'activité antiradicalaire n'atteint même pas 50%, ce qui montre que les antioxydants apolaires sont inactifs vis-à-vis du DPPH.

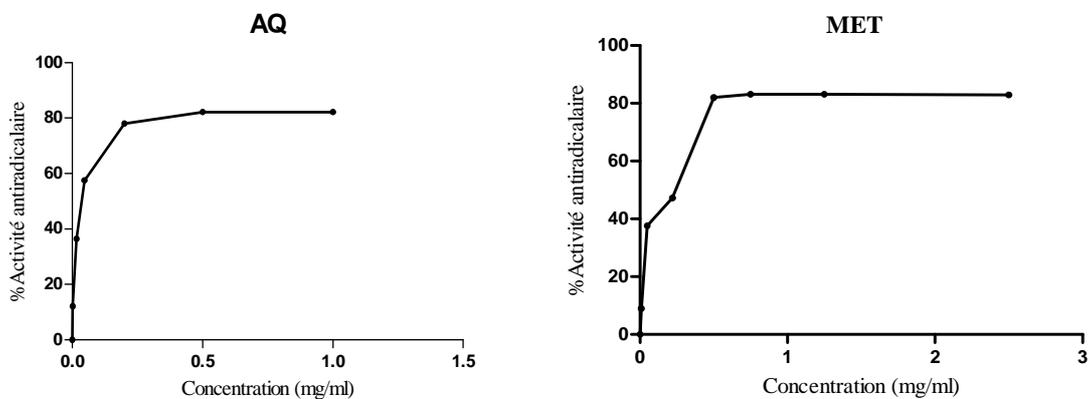
Globalement ces résultats confirment les résultats de la CCM de criblage où les extraits polaires apparaissent les plus actifs.

En comparaison avec les antioxydants standards, tous les extraits testés s'avèrent moins actifs. Le BHT ayant l'APR le plus faible entre les standards est 10,6 fois plus actif que l'extrait aqueux et 47,7 plus actif que l'extrait méthanolique.

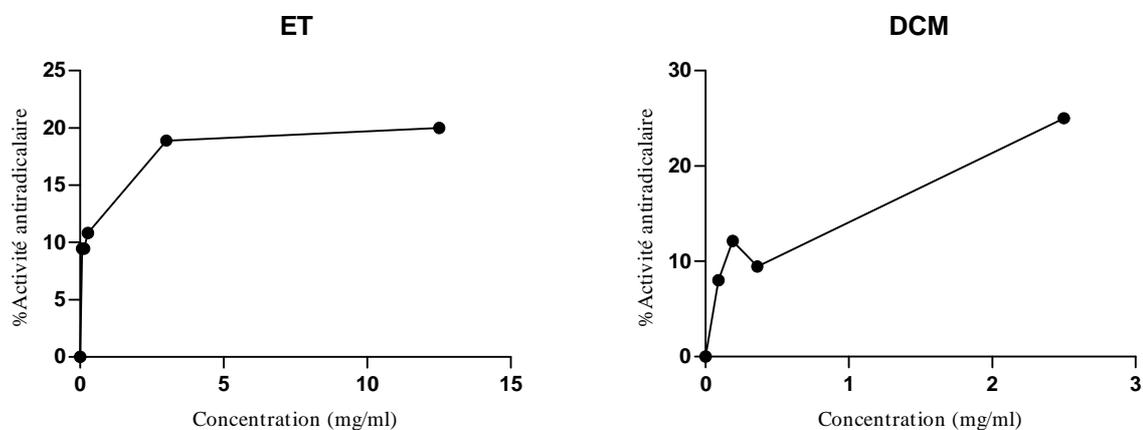
Li et al. (2005) ont évalué l'activité antiradicalaire vis-à-vis le radical DPPH des extraits méthanoliques de cinq variétés du *Zizyphus jujuba*, où l'effet antiradicalaire obtenu est entre 17,8 à 69,1% pour une concentration de 0,5 mg/ml. Cependant pour la même concentration l'extrait AQ et MET du *Zizyphus lotus* ont montré un effet antiradicalaire supérieure 83,56 et 83,14 % respectivement.

L'examen de ces résultats permet de mettre en évidence une corrélation linéaire significative ( $R^2=0,98$ ,  $p\leq 0,01$ ) entre la teneur des extraits en flavonoides et le pouvoir antiradicalaire (APR) (**Figure 39**). En effet, les flavonoides sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène.

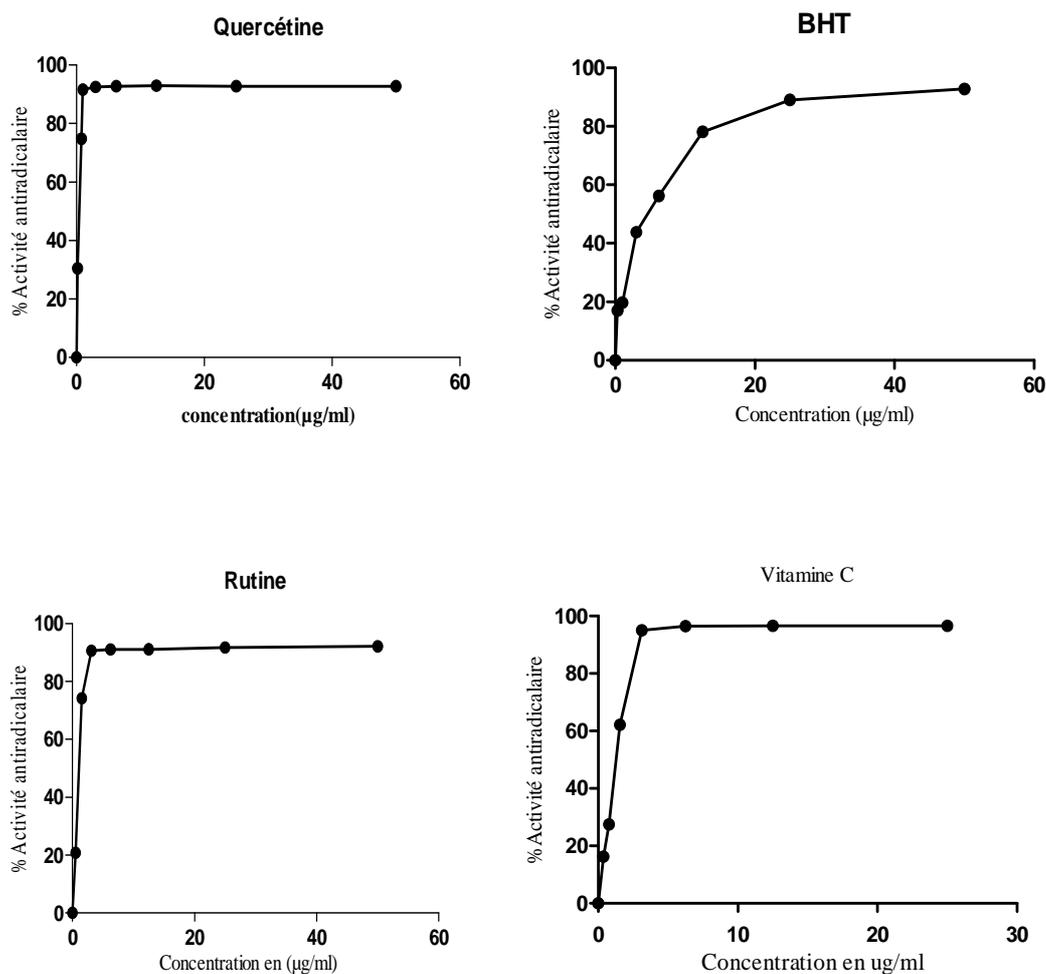
Il est évident que la forte activité des extraits AQ et MET est attribuée à leur richesse aux composés phénoliques, flavonoides et tanins, dont l'extrait AQ possède la plus forte teneur en molécules dosés (polyphénols, flavonoides et tanins), suivi par l'extrait MET. Une étude faite par Kang et al. (2003) a suggéré que les molécules polaires présentes dans les extraits végétaux contribuent à l'augmentation de l'activité antiradicalaire.



**Figure 36.** Activité antiradicalaire des extraits polaires (MET, AQ) des fruits du *Zizyphus lotus* (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais)

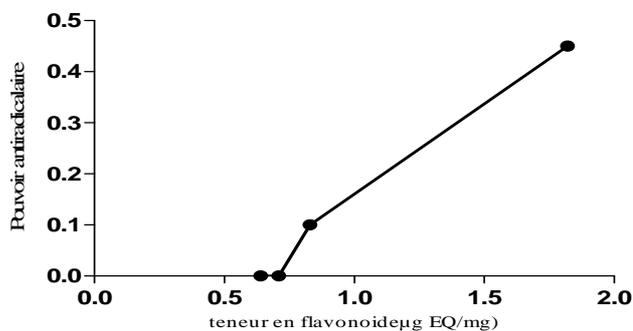


**Figure 37.** Activité antiradicalaire des extraits apolaires (DCM, ET) des fruits du *Zizyphus lotus* (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais)



**Figure 38.** Activité antiradicalaire des standards la quercétine , le BHT,la rutine et la vitamine C (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais)

$R^2=0,98$



**Figure 39.** Corrélation linéaire entre la teneur en flavonoides et le pouvoir antiradicalaire ( $p \leq 0,01$ ).



## 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.

L'étude des propriétés microbiologiques et antioxydantes des extraits du fruit du *Zizyphus lotus* nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.

Dans un premier temps, l'analyse qualitative de chacun des quatre extraits obtenus du fruit du *Zizyphus lotus*, a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins dans les extraits polaires, et leur absence dans les extraits apolaires, alors que l'analyse effectuée par chromatographie sur couche mince a montré la présence de la rutine et la quercétine dans l'extrait méthanolique.

L'analyse des différents extraits du *Zizyphus lotus* par HPLC a révélé la présence de quelques composés phénoliques dans les extraits, telles que dans les extraits apolaires, la catéchine et l'acide caféique. Dans l'extrait aqueux cette analyse montre la présence de quercétine et catéchine, alors dans l'extrait méthanolique l'acide caféique est présent.

L'analyse quantitative des extraits du *Zizyphus lotus* est représentés par le dosage spectrale des trois substances bioactives : les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins. Les extraits polaires (méthanolique et aqueux) sont les extraits aux teneurs considérables en métabolites dosés, dont l'extrait aqueux est l'extrait le plus riche, alors les extraits apolaires (éthérique et dichlorométhanique) sont les extraits en teneurs faibles.

Le test de l'activité antimicrobienne des différents extraits a montré que tous les extraits testés sont actifs. D'ailleurs toutes les souches microbiennes testées (bactéries et levures) sont inhibées au moins par l'un des extraits dont l'extrait éthérique qui a plus d'activité (une zone d'inhibition supérieure à 45mm), supérieure à l'antibiotique testé.

L'une des techniques utilisées pour étudier l'activité antioxydante des différents extraits est la méthode du blanchissement du  $\beta$ -carotène qui a révélé que les extraits polaires les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs, dont l'extrait aqueux a montré la plus grande activité, alors les extraits apolaires sont moins actifs.

Le criblage préliminaire des extraits en CCM a permis de localiser le pouvoir piégeur du DPPH dans les extraits polaires (AQ, MET) qui sont les extraits les plus riches en composés phénoliques. Effectivement, le test au DPPH révèle que ces deux extraits sont les plus actifs comme piégeur du radical DPPH dont l'extrait aqueux qui a l'effet antiradicalaire le plus puissant, suivi par l'extrait méthanolique, alors que les extraits apolaires ont montré une activité antiradicalaires faible.

En fin, 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 évidences.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- Abdel-Zaher A ., Salim Y-S ., Assaf M-H ., Abdel-hady R-H.** (2005). Antidiabetic activity of *Zizyphus spina –christi* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**:129-138
- Abu-Zarga M ., Sabri S ., Al-Boudi A ., Ajaz S ., Sultana N ., Rahman A-U.** (1995). New cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus lotus*. *Journal of Natural Products*, **58**:504-511.
- Ali Shtayeh M-S ., Yaghmour R-M-R ., Faidi Y-R ., Salem K ., Al Nuri M-a.** (1998). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethno Pharmacology*, **60**:265-271
- Anthony C.** (2005). A review of *Zizyphus Spina-christi*. Technical (Ed) .3 p.
- Antwerpen P-V.** (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myeloperoxydase /peroxyde d'hydrogène /chlorure . Thèse de Doctorat .Université libre de Bruxelles. 122p
- AOAC.** (1980). Official methods of analysis .11<sup>th</sup> Edition William Horwi WASHINGTON.D.C.
- Audigie C ., Figarella J ., Zonszaain F.** (1978). Manipulation d'analyse biochimique .Doin (Ed).Paris, 274p
- Awika J-M et Rooney L.W.** (2004). Sorghum phytochemicals and their impact on human health. *Phytochemistry* ,**65**:1199-1221.
- Babior B-M ., Lambeth J-D ., Nauseef W.** (2002). The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys*, **397**:342-344.
- Bahorun T., Gressier B ., Trotin F., Brunete C ., Dine T ., Vasseur J ., Gazin JC ., Pinkas M., Luycky M.** (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, **46**:1086-1089.
- Bahorum T.** (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle Food and Agricultural Research council Mauritiass pp 83-94.
- Baydar N-G ., Ozkan G ., Yasar S.** (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, **18**:1131-1136
- Boizot N et Charpentier J-P.** (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fougère. *Le cahier des Techniques de l'Inra*.pp79-82.
- Borgi W et Chouchane N.** (2006). Activité anti-inflammatoire des saponosides des écorces de racines de *Zizyphus lotus* (L.). *Revue des Régions Arides* ,283-286.
- Borgi W., Ghedira K., Chouchane N.** (2007(a)). Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks . *Fitoterapia*.**78**:16-19.
- Borgi W., Bouraoui A ., Chouchane N.** (2007(b)). Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extracts, *Journal of Ethnopharmacology*,**12**:228-231.

**Borgi W ., Recio M-C ., Rios J-L ., Chouchane N.** (2008).Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. *South African Journal of Botany*, **14**:320-324.

**Bross J.** (2000). Larousse des arbres et des arbustes. Larousse (Ed) Canada .576p

**Bruneton J.** (1999).Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3<sup>ème</sup> éd).Tec et Doc (Ed), Paris ,1120p

**Cabrera M ., Simoens M ., Falchi G ., LauraLavaggi M ., Piro O –E. ., Castellano E –E ., Vidal A ., Azqueta A ., Monge A ., Lopez de Cerain A ., Sagraera G I ., Seoane G ., Cerecetto H ., Gonzalez M.** (2007). Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral biological evaluation and structure activity relationships.*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**:3356-3367

**Catoire C ., Zwang H ., Bouet C.** (1999).Les jujubiers ou le Zizyphus fruits oubliés .article du n<sup>o</sup>1

**Capanoglu E ., Nilufer D ., Boyacioglu D.** (2006). Phenolic content and antioxydant activity of Dry jujube fruit (*Zizyphus vulgaris*) consumed in Turkey. 2<sup>nd</sup> International Congress on Functional Foods and Nutraceuticals.

**Cetkovic G ., Canadanovic-Brunet J ., Djilas S ., Savatovic S ., Mandic A ., Tumbas V.** (2008). Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, **109**:340-347

**Chavan U-D ., Shahidi F., Naczk M.** (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, **75**:509-512

**Choi Y-M ., Noh D-O ., Cho S-Y ., Suh H-J ., Kim K-M ., Kim J-M.** (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, **39**:756-761.

**Chung K-t et Wei C-I.** (2001). Are tannins a double edged sword in biology and health?.*Trends in Food Science et Technology*, **9**:168-175.

**Ciulel I.** (1982) .Methodology for analysis of vedetable drugs. Ed I.P.A.C.Romania.67p

**Curtay J-P et Robin J-M.** (2000). Intérêt des complexes antioxydants. Nutrithérapie Info.4p

**Dacosta Y.** (2003).Les phytonutriments bioactifs.Yves Dacosta (Ed).Paris.317 p

**Dan Y.** (2008).Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, **44**:149-161

**De Bruyne T.,Pieters ., Deelstra H., Vlietink A.**(1999).Condensed vegetable tannins :Biodiversity and biological activities .*Biochemical Systematics and Ecology*,**27** :445-459.

**Diallo D ., Sango R ., Yasambou H ., Traoré A ., Coulibaly K ., Maïga A.** (2004).Etude des constituants des feuilles de *Zizyphus mauritiana* Lam.(Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali .*Comptes rendus .Chimie*, **7** :1073-1080.

**Diallo A-M.** (2005). Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou) Phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk. (Capparidacée).Thèse de Doctorat. Université de Bamako.125p

- Dohou N ., Yani K ., Thahrouch S ., Idrissi Hassani L-M ., Badoc A ., G mira N.**(2003). Screeming phytochimique d'une endémique ibéro- Marocaine; *Thynelaea lythroides* .Bull..Soc.Pharm.Bordeaux.**142**:61-78.
- Favier A.** (2003). Le stress oxydant .Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* .108-115.
- Forkmann G et Martens S.** (2001).Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current opinion in biotechnology*, **12**:155-160.
- Formica J-V et Regelson W.** (1995).Review of the Biology of quercétin and related Bioflavonoids.*Fd Chem.Toxic*, **33**:1061-1080
- Galeotti F., Barile E ., Curir P., Dolci M ., Lanzotti V.** (2008). Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Photochemistry Letters*, **1**: 44-48.
- Gervaise Y.** (2004). Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. Polyphénols. Paris. 33 p.
- Ghedira K., Chemli R., Caron C., Nuzillard J-M., Zeches M., Le Men-Olivier L.** (1995).Four cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus lotus*.*Phytochemistry* ,**38** :767-772
- Ghestem A ., Seguin E ., Paris M., Orecchioni A-M.** (2001).Le préparateur en pharmacie .Dossier 2.Editions TEC & DOC Paris.275p
- Girotti –Chanu C.** (2006). Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine , flavone extraite de *mirotea de bilis* .thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon.136p.
- Grosskinsky B et Gullick C.** (2000). Exploring the potential of Indigenous Wild Food Plants in Southon Sudan. USAID (Ed).Sudan. 111p
- Gueye P-M.** (2007). Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-erythrocytaire sur le globule rouge .Thèse de Doctorat.Université Louis Pasteur Strosbourg.247p.
- Hagerman A-E ., Muller-Harvey I ., Makkar H-P-S.** (2000). Quantification of tannins in tree foliage.Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.Vienna.26 p
- Halliwell B et Whiteman M.** (2004).Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of pharmacology* .**142**:31-2.
- Heimler D ., Vignolini P ., Giulia Dini M ., Francesco Vincieri F ., Rmani A.**(2006).Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties .*Food Chemistry* ,**99**:464-469.
- Hostettman K.** (1998).Strategy for the biological and chemical evaluation of plant extracts .*Pure Appl.Chem*, **70**:23-27
- Ielpo M-T-L ., Bosile A ., Miranda R ., Moscatiello V., Nappo C ., Sorbio S ., Laghi E ., Ricciardi M-M ., Ricciardi L ., Vuotto M-L.**(2000).Immunopharmacological properties of flavonoids. *Fitoterapian*, **71**:101-109

- Juma B-F ., Majinda R-R-T.** (2004). Erythraline alkaloids from the flowers and pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties. *Phytochemistry*, **65**: 1397-1404
- Kandra L ., Guémant G ., Zajacz A., Batta G.** (2004). Inhibitory effects of tannin on human salivary  $\alpha$ -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **319**:1265-1271.
- Kamiloglu O ., Ercisli S ., Sengul M ., Toplu C ., Serce S.** (2009). Total phenolics and antioxidant activity of jujube (*Zizyphus jujube* Mill.) genotypes selected from Turkey. *African Journal of Biotechnology*, **8**:303-307.
- Kang D-G., Yun C-K ., Lee H-S.** (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, **87**:231-236.
- Kaur C et Kapoor H-C.** (2002). Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Food Sci. Technol.*, **37**:153-161
- Khanbaba K et Ree T.R.** (2001). Tannins: Classification and Definition. *Journal of Royal Society of Chemistry*, **18**:641-649.
- Khartal N ., Sokmen M ., Tepe B ., Daferera D ., Polissiou M ., Sokmen A.** (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, **100**:584-589
- King A et Young G.** (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, **99**:213-218.
- Kohen R et Nyska A.** (2002). Oxidation of biological systems: Oxidation stress phenomenon, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicology Pathology*, **30**: 620-650
- Kriventsov V-I et Karakhanova S-V.** (1970). The rutin content of jujube fruits [In Russian]. *Byulleten Gosudars to vennogo nikitskogo botanickogo Soda*, **14**:57-69.
- Kuntie V., Pejie N., Ivkovic B., Vugie Z., Ilie K., Miele S., Vukojevic V.** (2007). Isocratic R-P-HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **43**:718-721.
- Lahlou M ., El Mahi M ., Hamamouchi J.** (2002). Evaluation des activités antifongiques et molluscide de *Zizyphus lotus* (L.) Desf. du Maroc. *Journal des annales pharmaceutiques française*, **60**:410-414.
- Le Crouéour G ., Thèpenier P ., Richard B ., Petermann C ., Ghédira K ., Zèches-Hanrot M.** (2002). Lotusine G : a new cyclopeptide alkaloid from *Zizyphus lotus*. *Fitoterapia*, **73**:63-68.
- Lehucher-Michel M-P ., Lesgards J-F., Delubac O ., Stocker P., Durand P., Prost M.** (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.* **30**:1076-1081.
- Li J-W ., Ding S-D ., Ding X-L.** (2005). Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry*, **40**:3607-3613
- Li J-W ., Fan L-P ., Ding S-D., Ding X-L.** (2007). Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube. *Food Chemistry*, **103**: 454-460.
- Loke M -W., Proudfoot J -M ., Stewart S ., Mckinley A-J ., Needs P-W., Kroon P-A ., Hodgson J-M ., Croft K-D.** (2008). Metabolic transformation has a profound effect on anti-

inflammatory activity of flavonoids such as quercétine: Lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochemical pharmacology*, **75**:1045-1053

**Lopes G-C ., Sanches A-C-C., Nakamura C-V., Dias Filho B-P., Hernandes L., Carlos P de Mello J.** (2005). Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**:265-272

**Maciuk A ., Lavaud C ., Thépentier P., Jacquier M-J ., Ghédira K ., Zèche-Hanrot.** (2004). Four New Dammarane Saponins from *Zizyphus lotus* . *Journal of Natural Products*, **67** :1639-1643.

**Mansouri A ., Ennbarek G ., Kokkalou E ., Kefalas P.** (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry* ,**89**:411-420.

**Marfak A.**, (2003). Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 187 p

**Mbaveng A-T ., Ngameni , Kuete V ., Simo I-K ., Ambassi P ., Roy R ., Bezabih M ., Etoa F-X ., Ngadjui B-T ., Abegaz B-M ., Meyer J-J-M ., Lall N ., Beng V-P.** (2008). Antimicrobial activity of crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **116**:483-489

**Milane H.** (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 155p

**Molineux P.** (2004). The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J-Sci. Technol*, **26**:211-219

**Mueller-Harvey I.** (2001). Analysis of hydrosoluble tannins . *Animal Feed Science and Technology*, **91**:3-20.

**Murdock D-H.** (2002). Encyclopaedia of food and healthy Nutrition. APA academic Press (Ed), San Diego. California. 501 p

**Nasif M-N.** (2002). Phytoconstituents of *Zizyphus spina-christi* L. fruits and their antimicrobial activity. *Food chemistry*. **76**:77-84

**Nzengue Y.** (2008). Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble. 297p

**Okuda T.** (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, **66**:2012-2031

**Oyaizu M.** (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Journal of Nutrition*, **44**:307-315.

**Parakash D ., Upadhyay G ., Brahma N ., Singh H-B.** (2007). Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry*, **104**:783-790.

**Paris R et Dillemann G.** (1960). Les plantes médicinales des régions arides . Unesco (Ed) . Paris. 99p

- Pawliska A-M ., Camangi F., Bader A., Braca A.** (2009). Flavonoids of *Zizyphus jujube* L. and *Zizyphus spina christi* (L.) willd (Rhamnaceae) fruits .*Food chemistry*, **112**:858-862.
- Peronny S.** (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie .151p
- Perret C.** (2001). Analysis de tannins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par *Brytis cinerea* Pers.:FR .Thèse de Doctorat .Université de Neuchatel.173p.
- Petit P ., Granier T ., Langlois d'Estaintot B ., Manigand C., Bathany K ., Schmitter J-M ., Lauvergeat V ., Hamdi S ., Gallois B.** (2007). Crystal Structure of grape dihydroflavonol 4-ruductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis. *J. Mol. Biol*, **368**:1345-1357
- Petropoulos I.** (2003). Stress oxydant et vieillissement modifications oxydatives des protéines au cours du vieillissement.Diderat.Paris.5p
- Pinta M ., Bourdou B ., Rousselet F.** (1980).Spectrophotométrie d'absorption atomique .Masson et Arston (Eds).Paris ,478p.
- Pourcel L ., Routaboul J-M ., Cheynier V ., Lepinie C-L ., Debeaujon I.** (2006).Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological function.*Trends in plant science*, **12**:29-36
- Quezel P et Santa S.** (1962).Nouvelle flore de l'Algérie et régions désertiques méridionales. Tome 2. Centre national de la recherche, Paris ,565p.
- Renault J-H ., Ghedira K ., Therpenier P ., Lavaud C ., Zéches-Hanrot M ., Le Men Olivier L.**(1997).Dammarane saponins from *Zizyphus lotus* .*Phytochemistry*,**44**:1321-1327.
- Rsaissi N et Bouhache M.** (2002). La lutte chimique contre le jujubier .Programme National de transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA), DERD (Ed).n<sup>o</sup> 94.Rabat ,4p.
- Saija A ., Scalese M ., Lanza M ., Marzullo D ., Bonina F ., Castelli F.**(1995). Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes .*Free radical biology & medicine* ,**19**:481-486.
- Sanchez-Moreno C.** (2002).Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Foods Science and Technology*, **8**: 121-137
- Schofield P ., Mbugua D-M ., Pell A N.**(2001).Analyses of condensed tannins: a review .*Animal Food and Technology*,**91**:21-40.
- Sevanian A ., Nordenbrand K ., Kim E ., Ernester L ., Hochstein P.** (1990). Microsomal lipid peroxidation : The role of NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase and cytochrome P<sub>450</sub> .*Free Radic Biol Med*, **8**: 145-152
- Siddhuraju P.** (2007). Antioxydant activity of polyphenolic compounds axtracted from defatted raw and dry heated Tamarindus indica seed coat .*LWT*, **40**:982-990
- Siddhuraju P et Manian S.** (2007).The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of dietary phenolic extracts from horse gram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.)Verdc.) seeds.Food Chemistry

- Skerget M ., Kotnik P ., Hadolin M ., Hras A-R ., Simonic M ., Knez Z.** (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities . *Food chemistry*, **89**:191-198.
- Sokol-Letowska A ., Oszmianski J ., Wojdylo A.** (2007). Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chemistry*, **103**:853-859
- Souley Amadou B.** (2004). Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr.ex DC (Combretaceae). Thèse de Doctorat . Université de Bamako. Mali.
- Suksamrarn S ., Suwannapoch N ., Aunchai N ., Kuno M ., Ratananukul P ., Haritakum R ., Jansakul C ., Ruchirawat S.** (2005). Ziziphine N, O, P, new antiplasmodial cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus oenoplia* var. *brunoniana*. *Tetrahedron*, **61** :1175-1180.
- Tapiero H ., Tew K.D ., Nguyen Ba G ., Mathé G.** (2002). Poly phenol: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother*, **56**:200-207.
- Vivas N ., Nonier M-F ., Pianet I ., Vivas de Gaulejac N., Fouquet E.** (2006). Proanthocyanidins from *Quercus petraea* and *Q. robur* heartwood: quantification and structures. *Comptes rendus chimie*, **9**:120-126.
- Wong S-P ., Leong L-P ., William Koh J-H.** (2006). Antioxidant activities of extracts of selected plants. *Food chemistry*. **99**:775-783
- Xie D-Y et Dixon R A.** (2005). Proanthocyanidins biosynthesis-still more question than answers . *Phytochemistry* , **66**:2127-2144.
- Yanishlieva N-V-I et Marinova E-M.** (1995). Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*, **54**:337-382.
- Yang L-L ., Lee C-Y., Yen K-Y.** (2000). Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukaemia cells. *Cancer Letters*, **157**:65-75
- Yang J- H ., Lin H-C., Mau J-L.** (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food chem.*, **77**:229-235.
- Yang J ., Guo J ., Yuan J.** (2008). In vitro antioxidant properties of rutin . *LWT*, **41**:1060-1066
- Yi Z ., Yan Y ., Liang Y., Zeng B.** (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid. *LWT*, **41**:597-603
- Yoo K-M ., Lee C-H ., Lee H., Moon B-K ., Lee C-Y.** (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food chemistry*, **106**:929-936.
- Zimmer N et Cordesse R.** (1996). Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants Ed INRA Prod Anim, **9** :167-179.



## Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, nous avons tenté d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante des différents extraits préparés à partir du fruit du *Zizyphus lotus*. L'analyse qualitative de ces extraits par CCM et HPLC a révélé la présence des flavonoïdes et des tanins dans différents extraits, ce qui est confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage, des composés phénoliques, des flavonoïdes et des tanins dont les extraits polaires qui sont les plus riches en ces molécules, où la teneur en composés phénoliques est (5,8 µg EAG/mg d'extrait) pour l'extrait aqueux, et (5 µg EAG/mg d'extrait) pour l'extrait méthanolique. L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits a révélé une puissante activité des différents extraits, surtout l'extrait éthérique qui est responsable d'une grande zone d'inhibition de la souche bactérienne *E. coli* (>45mm).

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode du blanchissement du β-carotène et le test du DPPH a révélé le pouvoir antioxydant des extraits polaires (AQ, MET) suite à une comparaison avec les extraits apolaires (ET, DCM), dont l'extrait aqueux représente l'extrait le plus actif, avec une activité antioxydante relative de 85,05% et une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 55 µg/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 :** *Zizyphus lotus*, activité antimicrobienne, activité antioxydante, composés phénoliques, flavonoïdes, tanins.

### المخلص

تحتوي المستخلصات النباتية الطبيعية على كم هائل و متنوع من الجزيئات النشطة بيولوجيا . في هذا السياق حاولنا تقدير النشاط ضد الميكروبات و النشاطية ضد الأوكسدة لمختلف مستخلصات ثمار النبق (*Zizyphus lotus*)

التحليل النوعي لهذه المستخلصات بواسطة CCM كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة و HPLC كروماتوغرافيا السائلة ذات الفعالية العالية كشف عن وجود الفلوفونويدات و الصباغ في مختلف المستخلصات , و هذا ما أكد بواسطة التحليل الكمي المعتمد أساسا على حساب تركيز المركبات الفينولية و الفلوفونويدات و الصباغ في مختلف المستخلصات حيث أن المستخلصات المائية و المثانولية تمثل المستخلصات الأكثر غنا بهذه المركبات حيث أن كمية المركبات الفينولية في المستخلص المائي (5,8) ميكروغرام مكافئ الغاليك / مغ مستخلص) و المستخلص مثانولي (5) ميكروغرام مكافئ الغاليك / مغ مستخلص).

تقدير النشاط ضد الميكروبات لمختلف المستخلصات اظهر فعالية مختلفة للمستخلصات و خاصة المستخلص الاثيري الذي اظهر منطقة منع ميكروبي ضد *E. Coli* أكثر من 45 mm.

دراسة النشاطية ضد الأوكسدة بطريقة ال β كاروتين و اختبار DPPH كشف عن فعالية المستخلصات (AQ و Met) مقارنة بالمستخلصات الأخرى (DCM,ET) حيث اظهر المستخلص المائي (AQ) نشاط يقدر ب 80,05% من التثبيط و IC<sub>50</sub>= 55 µg/ml.

يمكننا القول من خلال هذه الدراسة ان المستخلصات الأكثر غنا بالمركبات الفينولية هي المستخلصات الأكثر قدرة ضد الأوكسدة.

### الكلمات المفتاحية:

النبق, النشاط ضد الميكروبات, النشاطية ضد الأوكسدة, المركبات الفينولية, الفلوفونويدات, الصباغ