

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Ghardaïa



Faculté des Sciences de la Nature et de Vie et Sciences de la Terre

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

En : Science biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : - *Bahtita Samira*

- *Kihoul Khadîdja Nour El Iman*

Thème

*Étude phytochimique et activité antioxydant des
extraits de L'espèce Zizyphus lotus de la région de
Metlili- Ghardaïa*

Soutenu devant le jury composé de :

Mlle. SEDDIKI M.	Maître Assistant A	Université de Ghardaïa	Présidente
M^{me}. BENSANIA W.	Maître Assistant A	Université de Ghardaïa	Promotrice
Me. BELHACHEMI M.H	Maître Assistant A	Université de Ghardaïa	Examineur

Année universitaire 2020/2021

REMERCIEMENT

Nous remercions Dieu, le tout Puissant et Miséricordieux pour la volonté et la patience qu'il nous attribuées, qu'il soit loué pour l'aide qu'il nous a fournie afin d'achever nos étude et poire nous avoir guidés dans le droit chemin dans notre vie.

*Au terme de ce travail, nous tiens, tout d'abord à exprimer toute nos gratitudes à notre promotrice Mm **BENSANIA Wafa** Maître au département de Biologie à l'université de Ghardaïa pour sa patience et ses précieux conseils, pour sa disponibilité exceptionnelle et ses nombreuses critiques constructives et d'avoir proposé ce thème et d'avoir dirigé ce travail.*

*J'adresse également mes remerciements à Monsieur **BELHACHEMI***

***Mohamed Elhabib** Maître assistant au département de Biologie à l'université*

de Ghardaïa pour avoir accepté d'examiner ce travail.

*J'aimerais également remercier Mademoiselle **SEDDIKI Malika** Maître assistant au département de Biologie à l'université de Ghardaïa pour avoir accepté de présider notre jury de soutenance.*

*Nos remerciements **Mr KRIMATE Mohamed***

*Ça serait inconcevable de ne pas remercier le chef département de Biologie, **BEN SEMOUNE Youcef***

et les enseignants du département pour les efforts consacrés et les informations qui nous ont donnés durant notre étude.

*Nos remerciements vont aussi à **Mr BENHAMOUDA Hicham** officiel de magasin des laboratoires*

*Nos remerciements vont aussi à **Mr BEN SALLAH Bachir,***

Mr. MOULAY Ali et Mr. MESSITFA Noredine

qui les fonctionnaires dans la conduite de l'organisation des laboratoires, merci pour vos efforts en tant que votre valeur.

Enfin ; je voudrais exprimer toute ma gratitude envers mon entourage et à toutes les personnes qui ont pris part directement ou indirectement à la Réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail

A Ma mère

À ceux qui m'ont toujours encouragé pour que je réussisse dans mes études. Pour leurs sacrifices et leurs soutiens tous au long mes étude. Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous mes chers Parents que je le dois, que Dieu vous garde.

À ma sœur : Rim

À mes très chers frères : Brahim et Yacine

À toute ma famille : Adjabi

À mes chères amies : B.A. Que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université. Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci

À mes ami(e)s de la promotion de master Biochimie appliquée Promotion

2020-2021

Samira

Dédicace

Aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

Bachir et ma très chère maman ; Fatma A mon très cher Papa ; Ce modeste

travail soit le simple beau cadeau que je peux leur offrir Ce travail est le fruit de leurs efforts et de

leurs sacrifices, qu'il soit

pour ils un faible témoignage de ma profonde affection. Aux joyaux de

ma vie mes sœurs ; Fadila et Manel

A mon oncle Ibrahim et son épouse Meriem qui m'encourager A mes proches

amis ; Samira, Asmaa, Marcoua, Samia A mes grands-mères, oncles et

tantes

chacun en son nom A toute ma famille

A tous ceux que j'aurais oublié de citer mais qui existent au fond de mon cœur et de ma

pensée.

Khadidja

Dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel, on a intéressé à une espèce de la famille de Rhamnacées «*Zizyphus Lotus*» provenant de la région de Metlili-Ghardaïa, ayant un fort potentiel d'activité du fait de leurs usages traditionnels largement répandus. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux extraits phénoliques des feuilles et des tiges de *Zizyphus lotus* et à l'étude de leur activité antioxydante in vitro. Pour ce faire, des extractions hydro-méthanoliques sont faites par macération à froid, puis les extraits bruts subissent une purification par des solvants de polarité croissante (acétate d'éthyle et butanol). L'utilisation de divers extraits afin d'obtenir un meilleur rendement.

L'analyse quantitative des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits a été déterminée par des méthodes de Folin-Ciocalteu et chlorure d'aluminium respectivement qui ont indiqué la présence d'une importante teneur en ces principes dans les extraits d'acétate d'éthyle et de butanol notamment dans les feuilles.

L'activité antioxydante a été évaluée par des tests chimiques tels que le test de DPPH et le test de FRAP qui ont montré que les extraits butanoliques des feuilles et des tiges ont une activité antioxydante remarquable par rapport à celle des extraits d'acétate d'éthyle. Ces résultats sont comparables et parfois mieux à ceux des antioxydants standards (le Trolox et l'acide ascorbique).

En concluant que la plante médicinale étudiée représente une source importante de substances et de composés naturels bioactifs.

Mots clés : *Zizyphus Lotus*, extrait d'acétate d'éthyle, extrait de butanol, phénols totaux, flavonoïdes, activité antioxydante,

ملخص:

دراسة كيميائية نباتية ونشاط مضاد للأكسدة لمستخلصات نبتة
Ziziphys lotus
من منطقة متيلي - غرداية .

"*Zizyphus Lotus* في إطار تثمين تراثنا الطبيعي، اخترنا العمل على نبتة السدرة "

المحصودة من منطقة متيلي-غرداية، لما لها من فوائد عديدة تبعا لاستخدامات في الطب التقليدي. لذلك في هذا العمل ، كنا مهتمين بالمستخلصات الفينولية لأوراق وسيقان السدرة لدراسة نشاطها مخبريا كمضاد للأكسدة. لذلك كمرحلة أولية قمنا باستخلاص المركبات الفينولية عن طريق النقع البارد ميثانول، ثم تخضع المستخلصات الخامة للتنقية بمذيبات ذات استقطاب متزايد (خلات في محلول ماء-الإيثيل والبيوتانول).

كشف التحليل الكمي للمركبات الفينولية والفلافونويدات للمستخلصات المدروسة باستخدام طرق وكلوريد الألمنيوم، على ثراء مستخلصات خلالات الإيثيل والبيوتانول بهذه المركبات Folin-Ciocalteu خاصة في الأوراق.

تم تقييم الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلصات الفينولية عن طريق الاختبارات الكيميائية مثل . أثبتت النتائج أن مستخلصات البيوتانول للأوراق والسيقان لها نشاط FRAP واختبار DPPH اختبار مضاد للأكسدة ملحوظ مقارنة بمستخلصات خلالات الإيثيل. كما أظهرت هذه المستخلصات قدرة ارجاعية موازية أو أفضل من مضادات الأكسدة المرجعية في بعض المستخلصات (ترولوكس وحمض الأسكوربيك).

من خلال دراستنا، يمكننا استنتاج أن النبتة الطبية المدروسة تمثل مصدرا هاما للمركبات البيولوجية النشطة و الطبيعية.

الكلمات المفتاحية :

خلالات الإيثيل ، البيوتانول ، الفينول ، الفلافونويد ، النشاط المضاد للأكسدة ، *Zizyphus Lotus*

As part of the enhancement of our natural heritage, we were interested in a species of the family of Rhamnaceae "*Zizyphus Lotus*" from the region of Metlili-Ghardaïa, having a strong potential of activity because of their widely used traditional uses. In this work, we were interested in phenolic extracts *Zizyphus lotus* leaves and stems and their antioxidant activity in vitro, to do this, hydro-methanolic extractions are made by cold maceration, and then the crude extracts undergo purification with solvents of increasing polarity (ethyl acetate and butanol). The use of various extracts in order to obtain a better yield.

The quantitative analysis of the contents of total phenols and of flavonoids in the various extracts was determined by methods of **Folin-Ciocalteu** and aluminum chloride respectively which indicated the presence of a significant content of these principles in the acetate extracts Ethyl and butanol especially in the leaves.

Antioxidant activity was assessed by chemical tests such as the **DPPH** test and the **FRAP** test which showed that the butanolic extracts from the leaves and stems have remarkable antioxidant activity compared to that of the acetate extracts from ethyl. These results are comparable and sometimes better to those of standard antioxidants (Trolox and ascorbic acid).

By conclusion that the medicinal plant studied represents an important source of bioactive substances and natural compounds.

Keywords: *Zizyphus Lotus*, ethyl acetate extract, butanol extract, total phenols, flavonoids, antioxidant activity.

AG	: Acidegallique
AlCl₃	: Trichlorure d'aluminium
DPPH	: 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
EC1	: Concentration équivalent 1 mM
ERO	: Espèces réactives de l'oxygène
Fe²⁺	: Ions ferreux
Fe³⁺	: Ions ferriques.
FeSO₄	: Sulfate de fer
FeCl₃	: Trichlorure de fer
FRAP	: Ferric reducing antioxidant power
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
IC₅₀	: Concentration inhibitrice à 50%
MeOH	: Méthanol
Mv	: Matière végétale
Ms	: Matière sec
OH	: Groupe hydroxyle
OH•	: Radical hydroxyle
ONOO⁻	: Peroxynitrite
R²	: Coefficient de détermination
TPTZ	: Ferric 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine.
Trolox	: Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroma-2-carboxylique
UV	: Ultra violé
VIS	: Visible

Numéro	Titre	Page
01	Couleur et aspect des extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .	21
02	Les valeurs d'IC ₅₀ en (mg/ml) des différentes fractions étudiées de <i>Zizyphus lotus</i> et les antioxydants standards.	41
03	Les valeurs d'EC1 des extraits phénoliques étudiés	47

N°	Titres	Page
01	<i>Zizyphus lotus</i> récoltées dans la région de Metlili de la Wilaya de Ghardaïa.	11
02	Situation géographique de la région d'étude (la wilaya de Ghardaïa, 80 km à l'ouest de la région de Metlili par application de Maps Google.	14
03	(a) : Séchage des feuilles et des tiges de <i>Zizyphus lotus</i> à l'étuve, (b) : Poudre des échantillons (Laboratoire d'Université de Ghardaïa).	14
04	Schéma général d'extraction des principes actifs de <i>Z. lotus</i> .	17
05	Réduction du radical libre DPPH• en présence d'un antioxydant .	20
06	Réduction du tripyridyl-triazine ferrique (Fe ³⁺ -TPTZ) en présence d'antioxydant.	22
07	Comparaison de rendements d'extraction des différents extraits de <i>Zizyphus lotus</i> .	25
08	Courbe d'étalonnage d'acide gallique.	29
09	Teneur en phénols totaux des différents extraits de <i>Zizyphus lotus</i> .	29
10	Courbe d'étalonnage de la rutine	33
11	Teneur en flavonoïdes des différents extraits de <i>Zizyphus lotus</i> .	33
12	Histogramme représentant le contenu en phénols totaux et flavonoïdes des différents extraits.	36
13	Variation de la teneur en phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes des différents extraits.	37
14	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% du radical DPPH• en fonction de la concentration des extraits phénoliques du <i>Zizyphus lotus</i> .	40
15	Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% du radical DPPH• en fonction de la concentration des antioxydants standards (Trolox et acide ascorbique).	40
16	Variation des valeurs d'IC ₅₀ du test DPPH en fonction des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des extraits de <i>Zizyphus lotus</i> .	44
17	Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.	48
18	Courbe d'étalonnage de la FeSO ₄	46
19	valeurs de FEAC des extraits phénoliques étudiés et antioxydants standards.	47
20	Variation des valeurs d'EC ₁ du test FRAP en fonction des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits étudiés.	50

Table des matières	Pages
Remerciements	I
Liste des tableaux	IV
Liste des figures	V
Introduction	1
Partie I : Matériel et Méthodes	
I. Matériel	10
I.1- Le lieu de travail	10
I.2-Réactifs chimiques	10
I.3-Matériel végétal	10
I.3.2- Description botaniques et systématique	11
I.3.3- Répartition géographique	12
I.3.4- Région d'échantillonnage	13
I.3.5- Préparation du matériel végétal	14
II. Méthodes d'analyses	15
II.1- Préparation des extraits	15
II.1.1- Macération	15
II.1.2- Purification	15
II.3- Analyses quantitative	18
II.3.1- Dosage des phénols totaux	18
II.3.2- Dosage des flavonoïdes	19
II.4- Activité antioxydante	19
II.4.1- Test du DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	20
II.4.2- Test de FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)	21
Parties II : Résultats et Discussion	
I.1- Les rendements d'extraction	24
I.2.- Analyses quantitative	28

II. 2.1- Dosage des phénols totaux	28
II.2.2-Teneur en flavonoïdes	32
III. Evaluation du pouvoir antioxydant	37
III.1-Test du DPPH (2,2-Diphényl-1-Picryl Hydrazyl)	38
III.2- Mesure du pouvoir réducteur ferrique (test FRAP)	46
III.2- Mesure du pouvoir réducteur ferrique (test FRAP)	52
Conclusion générale	55
Référence bibliographiques	58

*Introduction
générale*

La respiration est l'une des voies essentielles permettant aux cellules de produire de l'énergie métabolique pour leur développement et leur activité. Parmi les nutriments utilisés par les cellules des animaux et des plantes, on compte les glucides (ose), les peptides (acides aminés) et les lipides (acides gras), tandis que l'oxydant le plus fréquent dans les systèmes biologiques est l'oxygène moléculaire O₂.

En condition physiologique, l'oxygène (O₂) est une molécule indispensable à la vie, dont il est essentiel pour le métabolisme aérobie en tant qu'accepteur final des électrons de la chaîne respiratoire. Cette réaction est associée à la production de 38 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique. Les processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfaits car 2 à 3 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou plus communément radicaux libres (Koppenol, 2000; Salhi, 2018).

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme, dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques (Gutteridge, 1993).

Au niveau cellulaire, les espèces réactives de l'oxygène implique les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc...) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le peroxynitrite (ONOO⁻) (Goudable et Favier, 1997 ; Bartosz, 2003 ; Halliwell et Whiteman, 2004).

Dans les circonstances quotidiennes normales, la production des espèces réactives de l'oxygène, en permanence et aux doses faibles, est très utiles pour l'organisme et jouant des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques vasculaires et cellulaires ; tel que la transduction du signal et la phagocytose (Huet et Duranteau, 2008). Aussi, ils participent à l'expression de certains gènes et à leur régulation. Cela leur confère un rôle important dans les phénomènes de croissance et de mort cellulaire (ShahinSharif et *al.*, 2008; Pastre, 2005). Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants

/prooxydants est en équilibre (Favier, 2003).

Une libération excessive de radicaux libres ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut entraîner une situation de déséquilibre qualifiée de stress oxydant. Le stress oxydant se définira comme étant un déséquilibre de la balance entre la production d'ERO et les systèmes de défenses antioxydants, en faveur des premières (Médart, 2009).

Le stress oxydant peut avoir diverses origines: mauvaise alimentation, phénomènes inflammatoires chroniques ou aigus, habitudes de vie non adéquates (tabagisme, consommation excessive d'alcool), exercice physique intense ou mal géré, exposition inconsidérée à de grandes sources productrices d'ERO et aux radicaux ionisants (exposition importante au soleil, irradiation et radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, le contact avec certains pesticides et solvants, la prise de certains médicaments, tout processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante (Pincemail et Defraigne, 2004 ; Médart, 2009).

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes des molécules biologiques: oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides et des glucides, l'ADN (ruptures de brins, l'arrêt de réplication, provoquant des altérations des bases), modifient des structure primaire, secondaire et tertiaire des protéines (Mohammedi, 2006), les lipides (peroxydation lipidique) (Favier, 2003).

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies chroniques humaines comme facteur déclenchant ou associé à des complications, telle que le cancer, le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires et neurodégénérative, inflammation, et vieillissement (Bidie et *al.*, 2011), et les ischémies (Ghalem, 2014).

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Ce dernier va développer des systèmes de défense qui permettent de réguler la production des ERO que l'on qualifie d'antioxydants. Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine (Nouioua, 2018).

Il existe deux sources de défenses antioxydantes: l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamines C, vitamine E (alpha tocophérol), caroténoïdes, ubiquinone, polyphénols, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque, tandis que l'autre est endogène et se compose d'enzymes (SOD superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ou de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des co-facteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydantes (Favier, 2003; Pincemail et Defraigne, 2004; Médart, 2009).

La plupart des antioxydants utilisés commercialement dans l'industrie alimentaire, par exemple butylhydroxytoluène (BHT), butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroquinone tertiaire (BHQT), ont été soupçonné de causer ou de favoriser des effets négatifs sur la santé tel le cancer et, par conséquent, certaines restrictions sont placées sur leurs applications et il y a une tendance à les remplacer par des antioxydants naturels (Shahin, 2008 ; Krishnaiah et *al.*, 2010)

Ces dernières années, la recherche d'antioxydants naturels en particulier à partir de plantes a augmenté et certaines plantes médicinales ont été largement étudiées pour des activités anti-oxydantes. Les antioxydants naturels proviennent principalement de plantes sous forme de composés phénoliques (flavonoïdes, acides phénoliques et les alcools, stilbènes, tocophérols, tocotriénols) l'acide ascorbique et les caroténoïdes. Actuellement, les efforts visant à acquérir des connaissances approfondies sur le pouvoir d'antioxydants à partir de plantes et d'exploiter leurs potentiels sont donc en augmentation (Shahin, 2008).

La nature, avec 250.000 à 500.000 espèces de plantes, est la source d'une extraordinaire diversité de molécules, possédant parfois des propriétés thérapeutiques, Seule une poncée de ces richesses a été explorée (Krief, 2003).

En effet, les plantes possèdent des milliers de substances actives contenant dans leurs organes (feuilles, fleurs, fruits, racines,...) et nous pouvons, selon différentes techniques de les extraire et de les utiliser pour soigner diverses maladies. Souvent, ces remèdes naturels sont très efficaces avec moins d'effets secondaires que les médicaments

de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (Bougandoura, 2011).

Une plante médicinale étant définie comme toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir les maladies (Schauenberg et Paris, 2010). Comme elle peut renfermer des substances exerçant une action thérapeutique et/ou ayant des effets toxiques (Lullmann et *al.*, 1998).

Malgré les progrès de la pharmacologie et l'industrie pharmaceutique qui ont permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement. En Afrique, ces plantes constituent une richesse et une source importante de matières premières pour l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire (Tabuti et *al.*, 2003).

Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent de très large éventail d'activités biologiques (Aberkane, 2006).

Les métabolites secondaires des plantes constituent un groupe diversifié de composés chimiques d'origine naturelle qui n'ont généralement aucune fonction primaire évidente en ce qui a trait à la croissance des cellules de la plante. Ils sont synthétisés par la plante en réaction à des stimuli extérieurs et ont souvent une fonction régulatrice dans le cadre d'une série de réactions physiologiques et métaboliques en cascade à la suite d'un stress environnemental ou d'une attaque par des ravageurs (Benbrook, 2005). Ces molécules possèdent des fonctions comme pigment, phytohormone, précurseur de synthèse ou des arômes (Gravot, 2009 ; Scalbert et Williamson, 2000). Les métabolites secondaires sont en revanche très nombreux et variés (plus de 100.000) mais produits souvent en très faibles quantités. Les classifications de ces composés métabolique sont généralement basées sur :

- La nature biochimique des molécules, leurs propriétés et effets biologiques (dans le cas des alcaloïdes)
- de leur origine biosynthétique.

On distingue trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- les terpènes : les substances volatiles des plantes, les glycosides, les caroténoïdes, les stérols, ...
- les composés phénoliques : les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes, les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins, la lignine,
- les composés contenant de l'azote : les alcaloïdes, les glucosinolates, ... (Hopkins, 2003).

Les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire et l'un des plus importants groupes de composés présents dans les plantes. Leur accumulation dans les plantes, varie quantitativement et qualitativement non seulement dans les différentes parties de la plante (racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits), mais aussi d'une espèce végétale à l'autre (Raven et *al.*, 2000). Ils comprennent au moins 8000 différentes structures connues qui sont classés en : les acides phénoliques (C6-C1 et C6-C3), les flavonoïdes (C6-C3-C6), les lignanes (C6-C3-C3-C6) et les stilbènes (C6-C2-C6) (Bruneton, 2009).

Ces composés ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques sur la santé. Notons aussi leurs diverses propriétés biologiques comme les activités Anti-histaminique, anti-inflammatoire, hépato protective, antimicrobienne, anti-carcinogénique, cardio-protectrice, ... etc. Ainsi, ils sont fréquemment cités comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif et jouant un rôle d'inhibiteur des radicaux libres efficaces (Khenfer et Medjouel, 2016).

La classe flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels, avec plus de 4000 molécules identifiées. Ce sont des pigments essentiels, responsables de la coloration des fleurs, fruits et feuilles (Marfak, 2003; Hadi, 2004; Raven et *al.*, 2000). Les plus importantes sont les flavanols, les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavanones, et les anthocyanes (El Gharras, 2009).

Ces molécules se rencontrent à la fois sous forme libre, mais sont très souvent liées avec des sucres, on parle alors d'hétérosides qui sont constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. Elles sont localisées dans divers organes : fleurs, fruits, feuilles, tiges et racine. Les aglycones sont plutôt présents sous forme de cire dans les feuilles, les écorces et les bourgeons (Iwashina, 2000).

Les flavonoïdes sont des antioxydants puissants, des piègeurs de radicaux libres et des inhibiteurs de la peroxydation des lipides. Les exigences structurales pour les fonctions antioxydantes de flavonoïdes comprennent un groupe hydroxyle en position carbone trois, une double liaison entre les positions de carbone deux et trois, un groupe carbonyle en position carbone quatre et la poly hydroxylation des anneaux aromatiques A et B (Amedjoudj et *al.*, 2017).

Ghardaïa est située au nord du désert algérien à une altitude de 497, donc le climat de la zone d'étude est sec. Les températures varient entre le jour et la nuit, avec des températures hivernales comprises entre 1 et 25 degrés Celsius et entre 18 et 48 degrés Celsius en été. manque de précipitations au cours de l'année,

Les plantes de la zone d'étude sont utilisées dans la pharmacopée. Selon une étude, les plantes médicinales ont une grande capacité d'adaptation aux conditions climatiques difficiles. Il s'adapte par ses propres ressources à tous les stress, grâce à ses molécules organiques complexes qui sont synthétisées et assemblées en petites quantités par les plantes autotrophes (Lutge et al. 2002 ; Abdrazak et Joël ; 2007). Ainsi, ce climat sec et chaud conduit à la production de métabolites secondaires qui diffèrent en qualité et en quantité selon le climat et le lieu, ainsi que la différence dans le type de plantes d'un même type, et cette différence est classée en général selon Les zones environnantes, et donc ces facteurs ont un impact significatif sur les plantes du désert.

Le Sahara est le plus grand des déserts, mais également le plus extrême, c'est à dire celui dans lequel les conditions désertiques atteignent leurs plus grandes âpretés (Ozenda, 1977). La végétation des zones arides est très clairsemée; leur aspect est en général nu et désolé. Les arbres y sont aussi rares que dispersés, et les herbes n'y apparaissent que pendant une brève période de l'année, quand les conditions deviennent favorables (Chopra et *al.*, 1960).

En Algérie, le Sahara représente 84% de la superficie et l'un des plus vastes déserts du monde (FAO, 2012). Il caractérise par les oueds et les vallées sèches qui contiennent les groupements végétaux les plus diversifiés et par une grande pauvreté floristique. En effet, la flore saharienne comporte environ 3000 espèces pour une superficie de 8 millions de km², dont 15% endémique et appartenant à plusieurs familles botaniques (Gausson et Leroy, 1982 ; Salhi, 2018). Et environ 500 espèces de plantes supérieures (Maiza et *al.*, 1993). Ces plantes médicinales sont très peu étudiées du point de vue ethnobotanique (Bouallala et *al.*, 2014).

Parmi les familles qu'on peut trouver au Sahara la famille des Rhamnacées, qui est une famille des plantes dicotylédones qui comprend 900 espèces auprès de 58 genres. Ce sont des arbres, des arbustes, des lianes ou des plantes herbacées. Les Rhamnacées sont plus particulièrement présentes dans les régions tropicales et subtropicales (Benammar, 2011).

Les espèces fruitières du genre *Zizyphus*, à grand potentiel de sélection, représentent des exemples extraordinaires de plantes pérennes à usages multiples dans les zones arides et semi-arides voire même désertiques de presque tous les continents grâce à leur capacité de résister la sécheresse par leurs mécanismes physiologique et morphologique d'adaptation exceptionnels. L'aire naturelle de la majorité des jujubiers se situant entre 20° et 30° de latitude, zone qui est caractérisée par des climats chauds et secs. Ils jouent un rôle très important dans la conservation des sols grâce à leurs systèmes racinaires profonds et vigoureux qui permettent une stabilisation des substrats et protègent ceux-ci contre l'érosion (Laamouri et *al.*, 2008).

Le mot *Zizyphus* vient du grec «*Zizyphos* » mais le mot n'apparaît qu'au deuxième siècle, et qui viendrait du nom arabe Zizouf, employé pour désigner le jujubier. Environ 100 espèces principalement dans les régions tropicales et subtropicales de l'Asie et des Amériques existent, tandis que quelques espèces vivent en Afrique et dans les régions tempérées (Benammar, 2011). L'une entre elles, *Zizyphus lotus*.

Zizyphus Lotus, également connu sous le nom de jujube, est évoqué dans le Coran et considéré par des musulmans comme arbre sacré, ou arbre du paradis. Il pousse généralement dans les zones arides et pays semi-arides et est largement distribué en Chine, en Iran, L'Afrique, la Corée du Sud et l'Europe comme Chypre, l'Espagne, la Grèce, et Sicile (Richardson et al., 2004; Adeli et al., 2015). En Afrique, *Z. Lotus* est largement distribué dans les régions méditerranéennes, comme l'Algérie, le Maroc, la Tunisie et Libye (Adeli et al., 2015).

En Afrique du Nord et au Moyen-Orient, les différentes parties de *Zizyphus* ont été utilisées par la médecine traditionnelle et ancestrale pour traiter différentes pathologies, notamment les troubles digestifs, les faiblesses, les troubles hépatiques, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections cutanées, la fièvre, la diarrhée et l'insomnie (Ghalem, 2014 ; Benammar et al., 2010). *Zizyphus lotus* est utilisé aussi dans la médecine traditionnelle Algérienne pour ses activités antidiabétiques et sédatives (Chouaibi et al., 2012 ; Benammar et al., 2010), pour traiter les maux et les irritations de la gorge, des broncho pulmonaires et pour soulager le stress et les rhumes (Chouaibi et al., 2012 ; Naili et al., 2010).

De l'autre main, cette plante offre un délicieux fruit (jujube) qui a été consommé frais, séché ou transformé (miel, thé, confiture, jus, huile, pain et gâteau,...). Ainsi, il est utilisé dans la santé, la cosmétique sous plusieurs formes et la nutrition, comme aliment par les locales populations en quantités substantielles (El Aloui et al, 2014).

Ces dernières années, plusieurs rapports scientifiques ont été réalisés sur la présence de nombreuses molécules biologiquement actives de *Z. lotus*, qui peut avoir un bénéfice élevé pour la nutrition humaine et la santé (Renault et al, 1997 ; Chouaibi et al, 2012).

Les études faites sur les métabolites secondaires de *Zizyphus lotus* ont permis de mettre en évidence la présence des composés phénoliques qui présentant des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (Abdoul-Azize et al, 2013 ; Ghazghazi et al, 2014), des flavonoïdes (Borgi et al, 2008), des tanins hydrolysables (Naili et al, 2010), des alcaloïdes en particulier les alcaloïdes cyclopeptidiques (Ghedira et al, 1993) et le dammarane des saponines dans les feuilles (Renault et al, 1997).

La pulpe des fruits de *Zizyphus lotus* renferme une quantité très importante des sucres (26%) (Ghalem. 2014). Ainsi, les graines de *Z. lotus* contiennent jusqu'à 33% d'huile riche en acides gras insaturés (acide oléique (C18:1) et acide linoléique (C18:2), en campesterol et β -tocophérol (Chouaibi et *al.*, 2013).

Ces derniers temps, la concentration sur la recherche végétale a augmenté partout dans le monde et un grand nombre de preuves sont recueillies pour montrer l'immense potentiel des plantes médicinales utilisées dans différents systèmes traditionnels (Dahanukar et *al.*, 2000). Dans la wilaya de Ghardaïa la liste de plantes entrant précisément dans ce cadre est exhaustive. Cependant, La flore de la wilaya reste très peu explorée sur le plan phyto-chimiques comme sur le plan pharmacologique.

Le présent travail a donc été entrepris dans le cadre de la valorisation de ressources végétales de notre région par des recherches scientifiques, et plus spécifiquement pour une contribution à l'étude des propriétés biologiques de l'espèce *Zizyphus lotus* de la région de Metlili – Ghardaïa; par la quantification de certaines substances bioactives et l'évaluation de leur pouvoir antioxydant.

Notre étude il comprendre deux chapitres et commence par une introduction :

- le premier Chapitre présentera le matériel végétal étudié, les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail, à savoir : l'extraction et la quantification des composés phénoliques dans nos extraits, et l'évaluation de l'activité antioxydante de ces extraits par deux tests chimiques (test de DPPH et FRAP).
- Le deuxième chapitre de la partie expérimentale est consacré à la présentation des résultats obtenu lors le travail de cette étude et leurs discussions en se référant aux études antérieures faites dans ce domaine.

- Notre travail a été achevé par une conclusion générale qui englobe les principaux résultats obtenus. A la lumière de ces résultats, différentes perspectives de recherche seront évoquées.

Parties I :

Matériel et Méthodes

I. Matériel

I.1- Le lieu de travail

Ces L'université de Ghardaïa, qui était connue sous le nom de centre universitaire, et elle a été transformée en université par décision ministérielle en 2012. L'université contient plusieurs facultés, dont les plus importantes ces la faculté de La biologie .Dont notre travaille ce déroule entre les deux Laboratoire de recherche(Bio2) et d'équipement qui contienne le (spectroScan 40 a 8 post.) .

I.2-Réactifs chimiques

Les produits chimiques et les réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique. Ils ont été fournis par Université de Ghardaïa (Département de Biologie) et sont achetés de Sigma Aldrich, Fluka analyticals et VWR Prolabo Chemicals.

I.3-Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude est de certains composants du *Zizyphus lotus* (feuilles et tiges), récoltés en Mars 2021 de la wilaya de Ghardaïa, région de Metlili (Oued, 80Km du Metlili). (Fig.1)

I.3.1.- Choix du matériel végétal

L'espèce choisie dans cette étude est *Zizyphus lotus*, qui est une espèce endémique de la région méditerranéenne (Benammar, et *al.*, 2010). C'est une plante médicinale utilisée pour traiter de nombreuses maladies, notamment Y compris les maladies du système digestif, la faiblesse, les maladies du foie, l'obésité, les problèmes urinaires, le diabète, Infections cutanées, fièvre, diarrhée et insomnie, traitement des ulcères, activités Médicaments antidiabétiques (Charifi et Dardar, 2016). Les feuilles sont les plus utilisées car elles sont en même temps siège des réactions photochimiques et réservoirs de matières organiques qui en dérivent (Ould El Hadj et *al.*, 2003).

La plante étudiée été choisie essentiellement sur la base de leur intérêt et leur fréquence d'utilisation en médecine populaire et leur richesse en matière de métabolites

primaires et secondaires. Alors, l'objectif de ce travail vise à évaluer l'activité antioxydante des principes actifs extraits par des solvants de polarité différente des feuilles et des tiges de *Zizyphus lotus*.



Figure 1 : *Zizyphus lotus* récoltées dans la région de Metlili de la Wilaya de Ghardaïa (Originale, 2021)

I.3.2- Description botaniques et systématique

Zizyphus lotus est un arbuste très épineux à croissance lente qui peut atteindre 10 m de hauteur et 50 à 60 cm de diamètre du tronc. Il est à port arrondi, à ramure tortueuse, à branches vertes épineuses et à écorce fissurée. Les branches présentent une croissance en zigzag avec des tiges grêles, flexueuses, ramifiées, effilées et épineuses. Il existe deux types d'épines associées en paires, certaines sont longues de 2,5 cm et d'autres sont courtes et peuvent se recourber facilement (Mahajan, 2009).

Les feuilles sont petites (environ 8 x 15 millimètres), courtes et ovales-oblongues plus au moins elliptiques de 1 à 2 cm de longueurs et de 7 mm de largeur (Bayer et Butter, 2000). Elles sont lisses et brillantes sur les deux faces, et présentent trois nervures longitudinales saillantes partant du pétiole (Baba Aissa, 1999). Les épines sont stipulaires dissemblables ; l'une grande, plus ou moins droite et dressée vers le haut, l'autre plus petite et courbée en crochet vers le bas.

Les fleurs du *Z lotus* sont très visibles, de couleurs jaunes avec des sépales ouvertes en étoiles, des petits pétales et un ovaire supère bisexuel et fleurissent en juin (Baba Aissa., 1999 ; Nour et Dilmi., 2017).

Le fruit est ovoïde-ovale, ayant la forme et la grosseur d'une belle olive, d'abord vert puis jaune, il devient rouge foncé (ou brun orangé) quand il est mûr, en octobre (Bayer et Butter, 2000). Le fruit du jujubier est légèrement sucré. Les noyaux, plus souvent détachables des pulpes, peuvent atteindre 1,05 cm de long (El Aloui et al., 2010).

Z. lotus possède un système racinaire plus clairsemé que le pommier ou le pêcher (Mengjun, 2006). Ainsi, cet arbrisseau a une croissance très lente et commence à porter des fruits vers l'âge de 4 ans. Ils peuvent continuer à paraître vers 20 à 25 ans (Maraghni et al., 2011).

D'après Quézel et Santa (1963), la classification qu'occupe *Zizyphus lotus* est la suivante :

Règne :	Plantes
Embranchement :	Spermatophytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Sous classe :	Dicotylédone
Ordre :	Celastrale
Famille :	Rhamnacées
Genre :	<i>Zizyphus</i>
Espèce :	<i>Zizyphus lotus</i>

I.3.3- Répartition géographique

Les Rhamnacées, d'origine de la Chine, sont présentes dans plus de 30 pays (Mengjun et al. 2003 ; Li, 2006), mais plus particulièrement dans la région tropicale et subtropicale: l'Asie et l'Amérique du Nord (Lui et Cheng, 1995 ; Fekih, 2009).

Zizyphus lotus est une espèce méditerranéenne avec une faible pénétration dans le Sahara septentrional : Maroc, Algérie, Tunisie, Libye. Elle réapparaît ensuite au Yémen, dans l'île de Socotra, au Moyen-Orient : en Palestine, Syrie, Turquie et Chypre. On la

retrouve enfin en Grèce, Sicile, Espagne méridionale et Corée du Sud (Quezel, 1963 ; Richardso et *al.*, 2004 ; Si Benasseur, 2005; Gorai et *al.* 2010 ; Adeli et Samavati ., 2015).

occupe l'aire géographique du Maroc à l'Afghanistan et de l'Afghanistan jusqu'à la chine, Il est répandu en Mali, Niger, Burkina Faso et Sénégal (Blank, 2001; Ouedraogol et *al.* 2006). En Afrique, *Z.lotus* est largement distribué dans la région méditerranéenne, comme l'Algérie, le Maroc, la Tunisie et la Libye (Hammi et *al.*, 2015; Souleyman, 2016).

En Algérie, le *Z. lotus* s'étale sur tout le Nord du Maghreb (Quezel et Santa, 1963). Il est très Commun dans toutes les parties de l'Algérie (Daumas et De Chancel, 1848), et le Sahara septentrional, sauf le tell Algéro-Constantinois. Il est présent surtout sur les Hautes plaines steppiques, l'Atlas saharien et jusqu'au Sahara septentrional (de la mer au Sahara), il prospère dans les lits d'oueds et berges sableux graveleux, et pousse également dans les ravins pierreux et les pentes rocheuses (Quezel et Santa, 1963).

Il est très répandu dans les régions arides d'Algérie du sud, Ain Oussara et Maessad (willaya de Djelfa) au climat aride et à Taghit de la wilaya de Bechar au climat saharien (Mounni, 2008).

I.3.4- Région d'échantillonnage

Le matériel végétal qui est constitué des feuilles et des tiges du *Zizyphus lotus* ont été fraîchement récoltées le mois de mars 2021, 80 km à l'ouest de Metlili, la Wilaya de Ghardaïa (Algérie).(Fig.2).



Figure 2 : Situation géographique de la région d'étude (la wilaya de Ghardaïa, 80 km A l'ouest de la région de Metlili (oued) par application de Maps Google

I.3.5- Préparation du matériel végétal

La partie aérienne de la plante (les feuilles et les tiges) sont séchées dans l'étuve. fig.3(a). Après le séchage, le matériel végétal a été broyé par un mélangeur électrique et par mortier, pour obtenir une poudre fine. Fig.3 (b) Cette poudre ainsi récupérée a été conservées dans un endroit sec, en vue de procéder aux différentes manipulations.



Figure 3: (a) : Séchage des feuilles et des tiges de *Zizyphus lotus* à l'étuve, (b) : Poudre des échantillons (Laboratoire d'Université de Ghardaïa) (Originale, 2021)

II. Méthodes d'analyses

II.1- Préparation des extraits

L'extraction solide-liquide est la méthode utilisée pour extraire les composés phénoliques du matériel végétal. Cette méthode est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire ou de séparer par dissolution dans un liquide un ou plusieurs composants (solide ou liquide) mélangé à un solide (Velickovic et *al.*, 2006).

Les composés phénoliques sont présents dans toutes les parties de la plante. Ces molécules ont toutes des parties polaires hydrophiles, certaines ont des parties hydrophobes et leurs groupements alcools leur offrent la possibilité de former de nombreux liaisons hydrogène, cela explique leur solubilité dans les solvants polaires. Les formes hétérosidiques de ces composés phénoliques sont classiquement solubles dans l'eau. Par conséquent, il n'y a pas de procédure uniforme ou complètement satisfaisante et adaptée

pour l'extraction de tous les composés phénoliques ou une classe spécifique des substances phénoliques dans les substances végétales (Naczka et Shahidi, 2004).

Dans la présente étude, la méthodologie d'extraction a été effectuée suivant la méthode décrite par Marie-Joséphine Amiot (Amiot et al, 1986), avec une légère modification. Nous avons décrit deux sous étapes:

II.1.1- Macération

Une quantité de 5 g de la poudre précédemment obtenue, des feuilles et des tiges de *Z. lotus*, est macérée dans 100 ml d'un mélange hydro-alcoolique (solvant polaire) (80/20 : V/V) ; 80 ml méthanol et 20 ml eau, pendant 48 heures à température ambiante et à l'obscurité. L'extrait est filtré puis les macérats hydro-méthanoliques sont évaporés à sec sous pression réduite à 40°C.

II.1.2- Purification

Les phases aqueuses restantes de chaque extrait sont soumises à plusieurs affrontements par divers solvants organiques.

a-Ether de pétrole: dans une ampoule à décanter, la phase aqueuse est lavée plusieurs fois avec un demi-volume d'éther de pétrole jusqu'à l'épuisement des pigments et les composés apolaires. Pour notre travail, on n'intéresse pas par la fraction d'éther de pétrole; c'est une étape de dépigmentation.

b-Acétate d'éthyle: la phase aqueuse est ensuite lavée une ou plusieurs fois avec un même volume d'acétate d'éthyle en présence de deux solutions de 2% de sulfate d'ammonium et de 2% d'acide ortho phosphorique qui facilitent le passage des composés phénoliques vers la phase organique. Ce solvant permet d'extraire les composés phénoliques peu polaires à polaires. Fig.4

c-Butanol: ainsi, la phase aqueuse obtenue est lavée une troisième fois par le solvant butanol qui est extrait les composés phénoliques plus polaires et plus lourds (tannin, lignine).

Les deux fractions obtenues d'acétate d'éthyle et de butanol sont séchées par le sulfate de sodium anhydre puis évaporés à sec. Les résidus sont repris dans 10 ml de méthanol et les conservés à 4°C jusqu'à leur étude. La **figure 4** résume le mode opératoire de l'extraction des composés phénoliques.

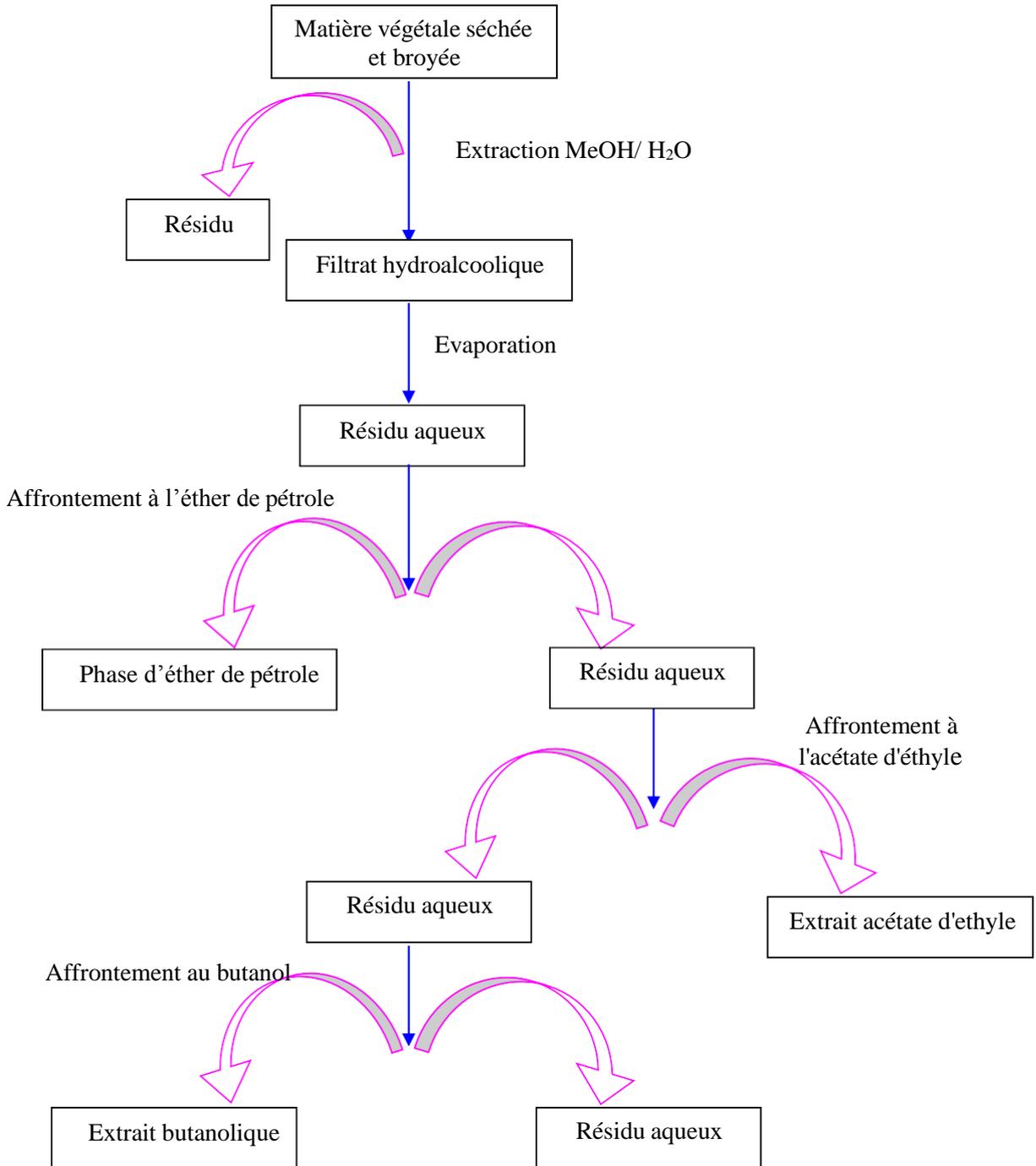


Figure 4 : Schéma général d'extraction des principes actifs de *Z. lotus*

II.3-Analyses quantitative

II.3.1- Dosage des phénols totaux

Principe

Le dosage des phénols totaux a été effectué par une méthode colorimétrique adaptée par Singleton et Ross (1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu (Kanatt et *al.*, 2011). Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui se réduit, lors de l'oxydation des composés phénoliques, en oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm. Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique (Boizot et charpentier, 2006).

Protocol expérimental

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations. 100 μ l de chaque concentration est mélangée avec 500 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) fraîchement préparé. Après 5 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, 2ml de solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 2 % a été ajoutée tout en agitant. Après, les solutions sont maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Spectroscan 40), contre un blanc. Les lectures de la densité optique à 760 nm des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Annexe 1). Toutes les mesures sont réalisées en duplicata.

L'analyse quantitative des phénols totaux des quatre extraits de *Z. lotus* a été réalisée par la même procédure. Les concentrations des phénols totaux contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage d'acide gallique. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g Ms).

II.3.2- Dosage des flavonoïdes

Principe

La quantification de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits a été effectuée par la méthode adaptée de Lamaison et Carnat (1991),

La détermination de la teneur en flavonoïdes des extraits est effectuée par la méthode adaptée de Lamaison et Carnat (1991), avec le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Le tri chlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec les groupements hydroxyles des flavonoïdes. Ce complexe de coloration jaune, absorbe à une longueur d'onde de 409 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'échantillon (Bahorun, 1997 ; Kaanin et Harfi, 2012).

Protocol expérimental

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage de la rutine à différentes concentrations. Brièvement, 1 ml de la rutine avec dilutions convenables a été ajouté à un volume égal d'une solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol). Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 409 nm a été lue dans le même spectrophotomètre après un temps de 20 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité.

Les lectures de la densité optique à 409 nm des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de la rutine (Annexe 1). On effectue la même opération pour les différents extraits étudiés. Toutes les opérations sont réalisées en duplicata.

Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la rutine et sont exprimées en mg équivalent la rutine par gramme de Ms.

II.4-Activité antioxydante

L'activité antioxydante des composés phénoliques provient de leur capacité à donner un électron ou un hydrogène, et de délocaliser un électron impair à l'intérieur de leur structure aromatique. Ils protègent ainsi les molécules biologiques contre l'oxydation.

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydante *in vitro* des différents extraits du *Zizyphus lotus* est réalisée par la méthode du piégeage d'un radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et test Ferric Reducing / Antioxydant Power (FRAP).

II.4.1- Test du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Principe

Pour étudier l'activité anti-radicalaire des différents extraits de *Z. lotus*, nous avons élit la méthode qui utilise le DPPH (diphénylpicryl-hydrayl) comme un radical libre relativement stable (Sharma et *al.*, 2009), selon le protocole décrit par Mansouri et *al.* (2005). Ce test est basé sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH \cdot). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène (fig. 5).

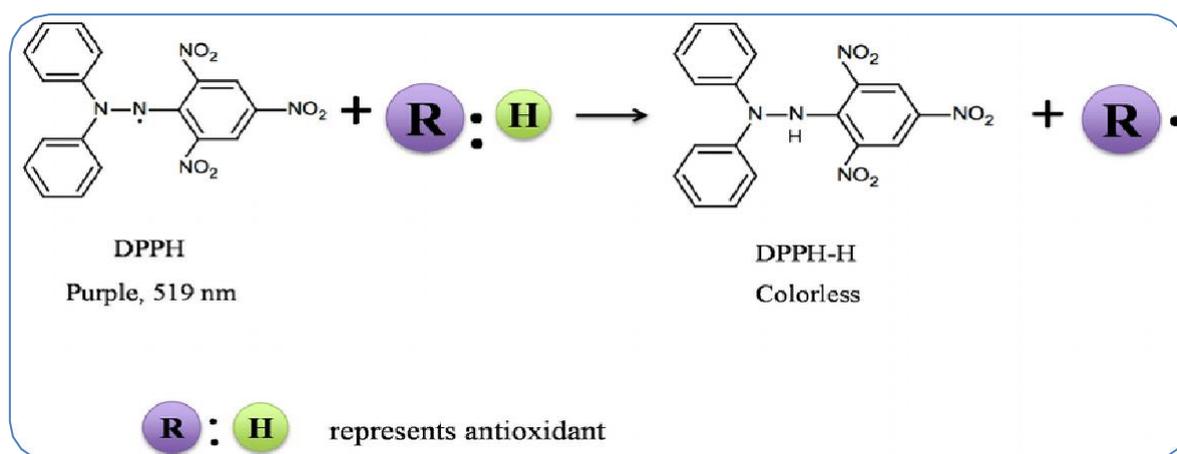


Figure 5: Réduction du radical libre DPPH \cdot en présence d'un antioxydant (Congo, 2012).

La réduction de DPPH \cdot (2.2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl) en DPPH-H (2.2 Diphenyl-1-picryl hydrazine) induit une perte de sa couleur violette qui peut être suivi à 517 nm ce qui reflète la présence des substances anti-radicalaires dans le milieu; ainsi quand la perte de la couleur est rapide, le donneur de l'hydrogène est considéré comme un fort antioxydant (Rice -evans et *al.*, 1996 ; Sanchez-Moreno, 2002).

Protocole expérimental

L'activité du piégeage du radical libre DPPH• a été mesurée selon le protocole décrit par Mansouri et al. (2005).

100µl de chaque solution des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1 ml de la solution méthanolique du DPPH• (250µM). Parallèlement, un témoin négatif est préparé en mélangeant 100µl de méthanol avec 1 ml de la solution méthanolique de DPPH•. Après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm contre le blanc correspondant.

A titre comparatif le pouvoir anti-radicalaire des standards (Trolox et acide ascorbique) a été mesuré suivant la même procédure citée précédemment. Les résultats de la mesure de la densité optique de chaque solution d'extrait à différentes dilutions ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition du DPPH par la formule suivante (Yu et al., 2004) :

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_{\text{Témoin}} - A_{\text{Echantillon}} / A_{\text{Témoin}}) * 100$$

Où : $A_{\text{Témoin}}$: désigne l'absorbance de DPPH• seul sans antioxydant.

$A_{\text{Echantillon}}$: représente l'absorbance de DPPH• en présence de l'antioxydant.

Ensuite, le traçage du pourcentage d'inhibition (%) en fonction de la concentration en antioxydant (composés phénoliques) ou antioxydant standard choisi a permis d'obtenir la concentration IC_{50} qui définit comme la concentration nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH• (Kroyer, 2004).

II.4.2- Test de FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)

Principe

Cette méthode est originalement développée par Benzie et Strain (1996) pour mesurer le pouvoir antioxydant du plasma sanguin puis la technique est appliquée sur les extraits végétaux (Nithiyantham et al., 2012). Elle est basée sur la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en un complexe tripyridyltriazine ferreux

(Fe²⁺-TPTZ) par un antioxydant (AH) (Maksimovic et *al.*, 2005), à un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer (Fig.6).

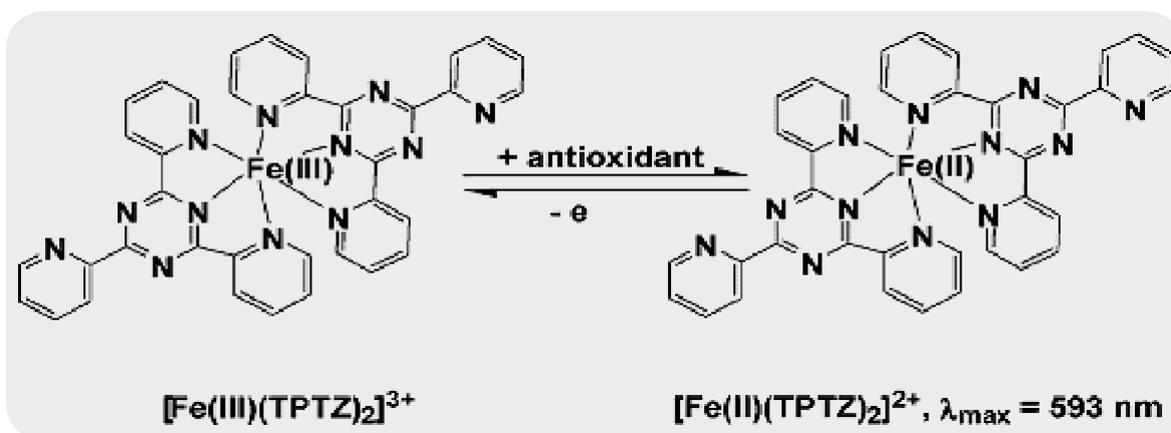


Figure 6: Réduction du tripyridyl-triazine ferrique (Fe³⁺-TPTZ) en présence d'antioxydant (Prior et *al.*, 2005).

Protocole expérimental

Le pouvoir de réduction ferrique est déterminé selon la méthode qui décrite par (Benzie et Strain, 1996) et modifiée par Pulido et ses collaborateurs (2000).

Le réactif FRAP a été préparé par un mélange de 25 ml du tampon d'acétate (300 mM, pH 3.4) avec 2.5ml de la solution du TPTZ (10 mM dans 40 mM HCL) et 2.5 ml de la solution du trichlorure de fer (FeCl₃.H₂O) (20mM) respectivement. 1ml d'une solution fraîche du réactif FRAPa été ajouté à 100 µl de chaque extrait. Les absorbances sont mesurés à 593nm après une incubation pendant 8 min à température ambiante.

L'activité antioxydante de nos extraits évalués par ce test est mesurée en FEAC qui représente l'activité antioxydante en équivalent de ferreux. Les résultats sont formulés en mg/ml de Fe (II) par l'utilisation de l'équation obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de FeSO₄.

Ainsi, le paramètre EC1 (concentration équivalente 1), des extraits et les standards, est calculé. Il est défini comme la concentration de l'antioxydant qui donne une réduction du TPTZ équivalent à 1mM du FeSO₄.7H₂O.

Le contrôle positif est représenté par deux standards comparatifs comme des antioxydants : le Trolox et l'acide ascorbique, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les extraits. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

Parties II :
Résultats et Discussion

I. Les rendements d'extraction

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside...) (Bruneton, 1999). Le nombre et la complexité des cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable aux propriétés physicochimiques caractérisant chaque composé (Machiex et *al.*, 2006).

La méthode d'extraction utilisée dans ce travail est l'extraction par macération. Il s'agit d'une méthode traditionnelle largement utilisée. Il s'agit de mettre en contact le matériel végétal avec le solvant à température ambiante avec ou sans agitation (Spigno et *al.*, 2007). Cette méthode permet une extraction douce des principes actifs, surtout lorsqu'ils sont thermolabiles (qui sont sensibles aux changements de température) (Chabrier, 2010) pour conserver l'impartialité des molécules bioactifs (Lecheheb, 2010).

Cette extraction a été effectuée par un mélange hydro-alcoolique méthanol/eau (8/2 V/V) afin d'extraire les principes actifs. Après, les extraits bruts obtenus ont subi une purification par une extraction liquide-liquide avec l'utilisation des solvants à une polarité différente. Cette méthode a permis de séparer les composés extraits de la poudre végétale en fonction de leur solubilité dans le solvant d'extraction (Kholkhal, 2014).

De ce fait, une purification selon une graduation de polarité a été réalisée pour les deux extraits bruts des feuilles et des tiges du *Zizyphus lotus*, par deux solvants l'acétate d'éthyle et le butanol. Ce qui nous a permis d'avoir deux fractions différentes d'acétate d'éthyle et le butanol à priori contiennent les composés phénoliques polaires et plus polaires.

Généralement, les quatre extraits obtenus présentent un aspect pâteux pour tous les extraits avec des couleurs différentes (Marron claire et verte foncé). La couleur et l'aspect de chaque extrait sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Couleur et aspect des extraits du *Zizyphus lotus*.

Partie utilisée	Fraction organique	Couleur	Aspect
Feuille	Ac.Et	Verte foncé	Pâteux
	BuOH	Verte foncé	Pâteux
Tige	Ac.Et	Marron claire	Pâteux
	BuOH	Marron claire	Pâteux

En général, la couleur des extraits est de verte foncé pour les feuilles et de marron claire pour les tiges. La différence de la couleur entre les extraits est due à la présence des pigments de différentes natures. Selon la littérature, ils peuvent être des chlorophylles, caroténoïdes, des anthocyanes, des flavones, des flavonoles, des lycopènes, des flavoxanthine et des lutéines (NezamEl-Din et *al.*, 1982; Gross et *al.*, 1983 et Barreveld, 1993).

Le rendement d'extraction a été déterminé par rapport au poids de matière végétale sèche rendu en poudre pour les différentes parties étudiées du *Zizyphus lotus* (les feuilles et les tiges). Les résultats de rendement d'extraction ont été exprimés en pourcentage (P/P) et ils sont représentés dans l'histogramme ci-dessous.

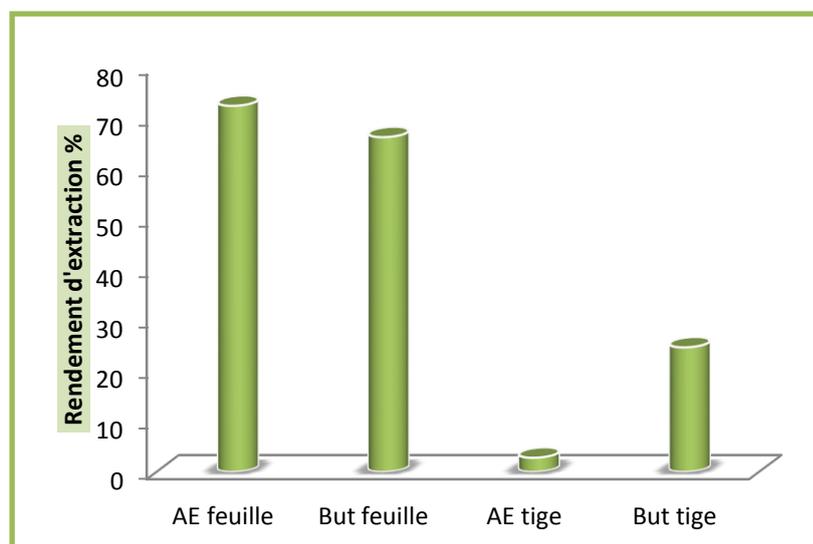


Figure 7 : Comparaison de rendements d'extraction des différents extraits de *Zizyphus lotus*.

Il ressort de ces résultats que les meilleurs taux d'extraction sont obtenus par la partie des feuilles de *Zizyphus lotus*, dont la fraction d'acétate d'éthyle présente un rendement de 72,4 % suivi par la fraction butanolique avec un taux de 62,2 %. Cela peut s'expliquer par le fait que les feuilles contenant des molécules bioactives à grande solubilité dans le solvant d'extraction choisi.

Tandis que, les extraits des tiges ont montré des rendements faibles et une différence très remarquable par rapport les extraits des feuilles. En effet, la fraction d'acétate d'éthyle a été présentée un taux de 2,8%, par contre la fraction butanolique a noté un rendement plus ou moins élevé (24,6 %).

Ainsi, on remarque que les taux varient d'une partie à une autre. Cette différence est aussi distinguée dans une même partie d'une fraction à une autre. Cela veut dire qu'il y a une différence de diffusion du solvant dans la poudre des plantes dans l'étape de macération et probablement à la nature des solvants utilisés pour la purification.

Plusieurs méthodes d'extractions ont été utilisées sur différentes parties de cette espèce. Toutefois, il est difficile de comparer les résultats du rendement avec ceux de la bibliographie (Mohammedi, 2006), car le rendement n'est que relatif et semble être lié à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de la récolte et de stockage ainsi qu'aux méthodes d'extraction appliquées (Saoud, 2016). D'autres facteurs peuvent avoir une influence sur le rendement d'extraction, tel que le pH, la température, le ratio solide/liquide, et le nombre et l'intervalle de temps des étapes d'extraction individuelles (Macheix et *al.*, 2005).

L'étude réalisée sur *Zizyphus lotus* par Baba Ouyoub (2017) a montré une grande variabilité de rendement d'extraction en fonction de la méthode d'extraction utilisée, continue et discontinue, et le solvant choisi. Cette étude a aussi montré que le rendement d'extraction de méthanol est plus élevé à ceux des autres extraits pour les deux méthodes utilisées.

De même, (Kanoun.K, 2010; Sawadogo, 2012 ; Hamida et Wassef, 2019) a trouvé que le rendement d'extrait acétate d'éthyle du *Z.Lotus* (feuilles et tiges) est assez faible que nos résultats (5.06 % et 1.38 %). Également, les extraits butanoliques des feuilles et des

tiges ont été noté même différence avec des rendements de 22.46% et 12.42 % respectivement.

La nature chimique des composés phénoliques végétaux varie du simple aux substances très polymérisés qui incluent des proportions variables de composés phénoliques : acides, phényl propanoïdes, anthocyanes et tannins, entre autres. Ils peuvent également exister sous forme de complexes avec des glucides, des protéines et d'autres composants, certains de haut poids moléculaire de ce fait les composés phénoliques peuvent être tout à fait insolubles (Naczk et Shahidi, 2004).

Par conséquent, les extraits phénoliques de matières végétales sont toujours un mélange de différentes classes de composés phénoliques dont certaines sont solubles dans le système de solvant utilisé. Des étapes supplémentaires peuvent être nécessaires pour éliminer les composés phénoliques non désirés et les substances non-phénoliques tels que les cires, les graisses, les terpènes et les chlorophylles (Naczk et Shahidi, 2004).

Par ailleurs, l'utilisation des solvants de différente polarité permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant. 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 (Zoughlache, 2009).

Ainsi, bien que la méthode d'extraction à partir du matériel végétal que nous avons choisi dans notre étude (un mélange hydro-alcoolique (méthanol-eau) avec un rapport (80/20) en volume) est citée dans diverse littératures : (Conforti et *al*, 2007 ; Chirinos et *al*, 2007 et Paduch et *al*, 2007) comme solvant et méthode de choix pour extraire des composés phénoliques ayant des activités importantes (Djeridane et *al.*, 2008), elle devra quelquefois être modifiée pour être mieux adaptée à leur nature chimique, leur solubilité et leur degré de liaison avec d'autre constituants végétaux.

II.2.- Analyses quantitative

Les différents extraits ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en phénols totaux et en flavonoïdes. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés anti-oxydantes des plantes leur sont attribués.

La mesure d'une longueur d'onde bien précise (λ max) ont été mesurées par une spectrophotométrie UV-Visible pour la molécule ou du Complexe qu'elle forme avec un réactif, l'intensité d'absorption (densité optique ; DO) permettra de déterminer la quantité de la molécule présente dans un échantillon, par rapport à un témoin de concentration connue Maisuthisakul et *al.*, 2008).

Des droites d'étalonnages ont été tracées pour cet objectif, qui sont réalisées avec des solutions d'étalons à différentes concentrations. Les quantités des phénols totaux et des flavonoïdes ont été rapportées en milligramme d'équivalents de l'étalon utilisé par gramme de matière sèche (mg EE/g Ms).

II. 2.1- Dosage des phénols totaux

La quantification de teneur en phénols totaux a été estimée par la méthode colorimétrique de Folin Ciocalteu adaptée par (Singleton et Ross, 1965). C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en phénols totaux, des plantes médicinales et les nourritures (Djeridane et *al.*, 2006 ; Abdel-Hameed, 2009). Cette méthode est basée sur la réduction de réactif Folin-Ciocalteu lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et molybdène. La coloration bleue produite, dont l'absorption maximale est à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de phénols totaux présente dans les extraits végétaux (Li et *al.*, 2007).

Les teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits de la plante étudiée ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage (Figure 08)

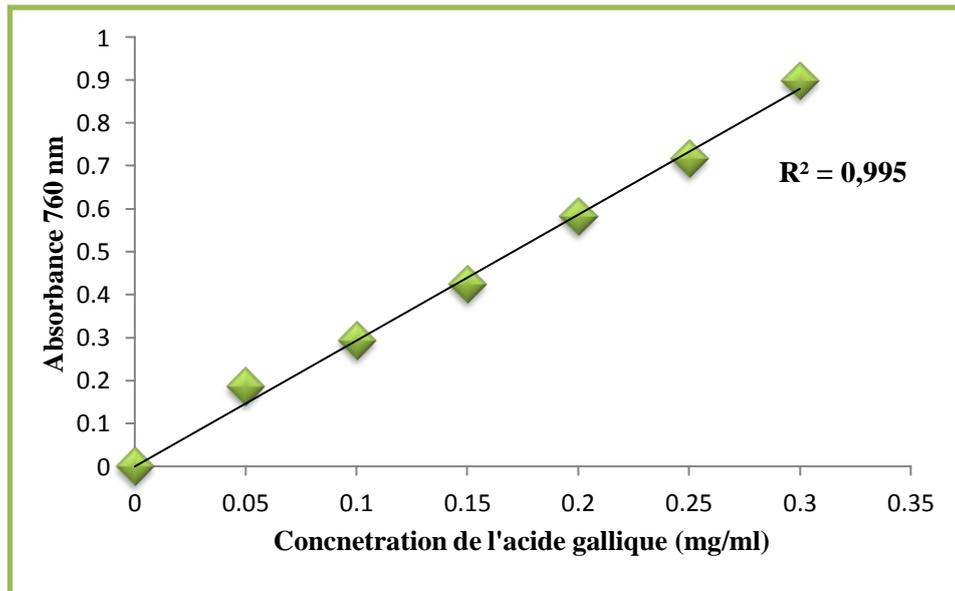


Figure 8 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Les teneurs sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique (GAE) par gramme de matière sèche. Généralement, l'acide gallique est le standard le plus souvent employé dans la méthode de Folin - Ciocalteu. Ainsi, c'est un composé de coût peu élevé et se solubilise facilement dans l'eau (Maisuthisakul et *al.*, 2008).

Les teneurs en phénols totaux des différents extraits de *Z. lotus* sont présentées dans la figure (9).

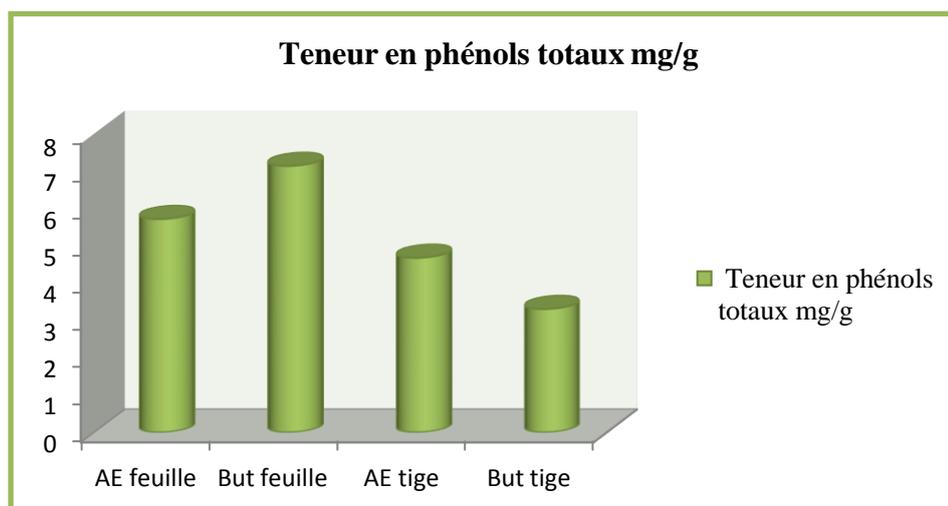


Figure 9 : Teneur en phénols totaux des différents extraits de *Zizyphus lotus*.

L'examen des résultats obtenus dans la figure 2 montrant que les extraits de *Z. lotus* possèdent des teneurs en phénols totaux très différentes et en relation étroite avec la partie étudié et la nature du solvant d'extraction utilisé.

Il ressort que la teneur en composés phénoliques la plus élevée se trouvait dans l'extrait butanolique (BuOH) des feuilles de *Z. Lotus* (7.140 ± 0.0025 mg EAG / g de matière sèche). Ainsi, par la suite vient l'extrait d'acétate d'éthyle (Ac.Et) avec une valeur de 5.718 ± 0.001 mg EAG/g de matière sèche. Néanmoins, les extraits des tiges représentent les teneurs les plus faibles avec des valeurs de (4.680 ± 0.004 mg EAG / g Ms et de 3.309 ± 0.001 mg EAG/g Ms pour les fractions d'acétate d'éthyle et de butanol respectivement.

Généralement, les résultats obtenus ont montré que les teneurs en phénols totaux sont très importantes que celles observées pour d'autres espèces. Ainsi, nous pouvons conclure que les feuilles et les tiges de *Zizyphus lotus* sont relativement riches en composés phénoliques et cela, en comparaison avec les teneurs obtenues dans les plantes de la famille d'Astéracée qui est très connue par sa richesse en composés phénoliques (Djéridane et *al.*, 2008).

Egalement, la richesse de la partie des feuilles en composés phénoliques peut être expliquée par le fait que ces composés interviennent dans la protection de cette partie vis-à-vis différents types de stress (lumineux, hydrique, thermique, salin. etc.) car cette partie est le siège de la photosynthèse (Telli, 2017).

En effet, les extraits organiques d'acétate d'éthyle comportent des taux importants en phénols totaux par rapport aux extraits butanoliques. Ceci, pourrait être dû à la nature des composés phénoliques extraits par l'acétate d'éthyle; possédant ainsi une polarité intermédiaire qui permettra se solubiliser la plupart des phénols comme les flavonoïdes aglycones et les acides phénoliques. Les composés phénoliques de nature polaires, tels que les tanins et les saponines, sont généralement plus extractibles par le butanol (Evans, 2006). Pour cette raison, on peut conclure la richesse des feuilles en les tanins et les saponines.

Il faut noter que les teneurs d'extraits bruts et les teneurs en phénols totaux ne varient pas dans le même sens, car on remarque que pour des teneurs élevés en extraits on enregistre des quantités faibles en phénols totaux. Cette constatation est valable pratiquement pour toutes les extraits et notamment dans l'extrait d'Ac.Et des tiges car il a enregistré la valeur la plus faible en rendement d'extraction 2,8 %; m/m alors que ce n'est pas le cas pour la teneur en phénols totaux où la quantité est très importante à celle des autres extraits, de 4.680 ± 0.004 mg EAG / g.

En termes de comparaison, ces résultats sont supérieures à ceux mentionnés dans le travail de Hamida et Wassef (2019) qui ont obtenu une teneur en composés phénolique de $0,03 \pm 0,01$ et $0,18 \pm 0,01$ mg EAG/g Ms et de $0,15 \pm 00$ et $0,07 \pm 0$ mg EAG/g Ms d'extrait des feuilles et des tiges respectivement. Ainsi, nos résultats sont plus élevés à ceux trouvés dans l'étude de D' Kanoun (2011).

De plus, le travail de Baba Ouyoyb (2017) a déterminé le contenu en phénols totaux dans des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles de *Zizyphus lotus*, de la région de Ghardaïa par deux méthodes d'extraction différentes, continue et discontinue. La teneur marquée dans l'extraction discontinue est assez supérieur à celle de notre extrait d'Ac.Et des feuilles (18.06 ± 0.38 mg GAE /g de matière sèche). Pourtant, l'extrait d'Ac.Et obtenu par une extraction continue a montré une teneur plus faible à celle de notre extrait (2.61 ± 0.02 mg GAE/g de matière sèche).

Alors la méthode d'extraction est bien influencée sur le contenu des extraits en composés phénoliques. Dans le travail de Baba Ouyoyb (2017), elle a constaté que l'extraction discontinue donne les meilleurs rendements des composés phénoliques par rapport à l'extraction continue. Celle-ci peut être expliquée par la diminution quantitative des composées phénoliques dans l'extraction (successive) continue selon le mécanisme de solubilité dans les différents solvants.

En outre, plusieurs facteurs peuvent avoir une influence sur la teneur en composés phénoliques. Des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que des facteurs géographiques et climatiques, sécheresse, nature du sol, pollution, agressions et maladies), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la

durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en composés phénoliques (Baba Ouyoub, 2017).

En réalité, il n'existe aucune méthode permettant de doser de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques présents dans un extrait végétal non purifié (Macheix et *al.*, 2005). Néanmoins, une estimation de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes, la plus utilisée est celui de Folin-Ciocalteu qui, en milieu alcalin, se réduit en mélange d'oxyde bleus de tungstène et de molybdène (Benkhedimallah et Kismon, 2014 ; Beddou, 2015).

Bien que la grande sensibilité de la méthode de Folin-Ciocalteu, elle peut présenter des problèmes d'interférence, de ce fait les résultats du dosage des composés phénoliques ne montrent pas à toute fois les valeurs exactes de contenu des extraits en phénols totaux. En effet, le réactif Folin-Ciocalteu peut réagir avec les acides aminés (tyrosine, tryptophane), les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose (Boizot et Charpentier, 2006).

D'autres techniques pour la quantification de ces composés tels que chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) peuvent être utilisées. Ces analyses permettront la séparation et la quantification de composés phénoliques ainsi que la connaissance des principales classes de composés phénoliques présentes dans chaque extrait ainsi que leurs quantités relatives. L'élucidation de la structure est souvent réalisée en utilisant la combinaison de GC et HPLC avec l'analyse par spectrométrie de masse, ainsi que d'autres techniques pertinentes.

II.2.2-Teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Lamaison et Carnat, 1991 et Bahorun, 1997), en utilisant comme standard la rutine. La méthode d' AlCl_3 est simple, peu coûteuse et offre une bonne sensibilité. Cette méthode permet de déterminer la teneur totale en flavonoïdes, qui forment un complexe jaunâtre avec AlCl_3 absorbe à 409 nm, même en présence d'autres composés phénoliques qui ne peut pas former un complexe avec AlCl_3 (Laouini, 2014).

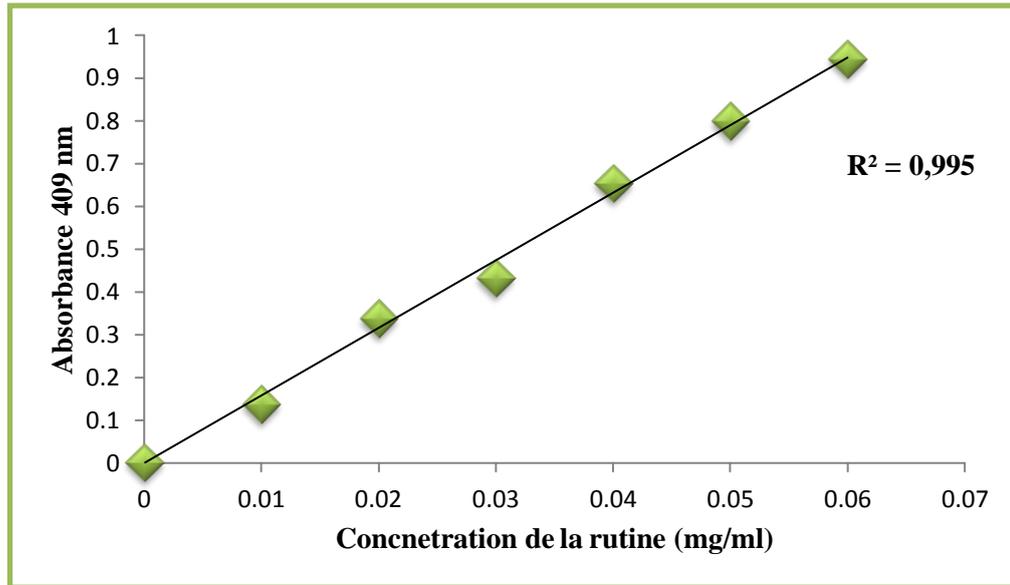


Figure 10 : Courbe d'étalonnage de la rutine

A partir la courbe d'étalonnage de la **rutine** (fig.10), on détermine les teneurs en flavonoïdes dans différents extraits, exprimant en milligramme équivalent de rutine par gramme de matière sèche (mg ER/g). Les résultats de la quantification des flavonoïdes des différents extraits de *Z. lotus* sont présentés dans la (fig.11).

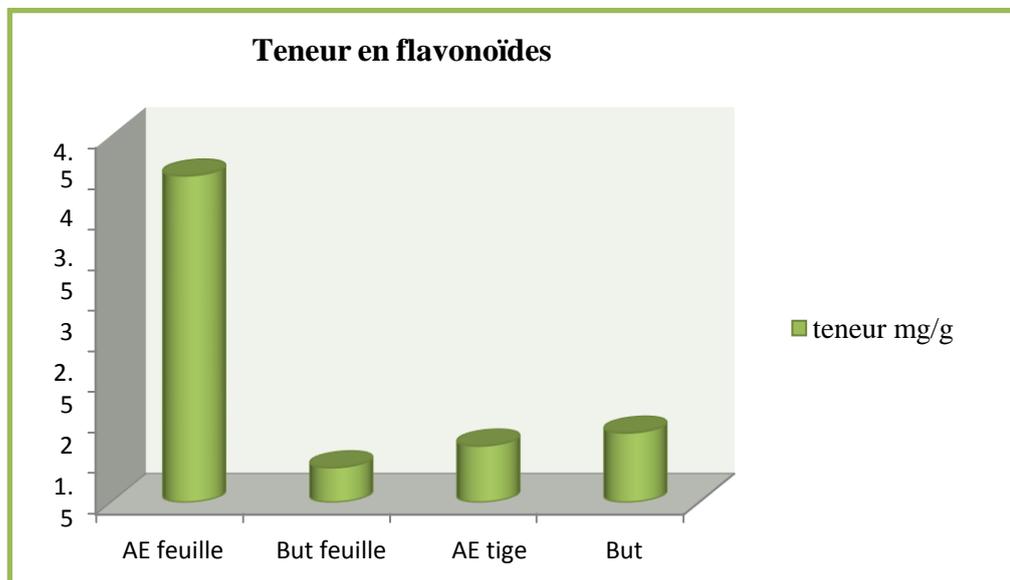


Figure 11 : Teneur en flavonoïdes des différents extraits de *Zizyphus lotus*.

L'analyse quantitative des flavonoïdes indique des valeurs comprises entre 0,425 et 4,008 mg ER/g Ms. En effet, la valeur maximale est obtenue avec l'extrait d'Ac. Et des feuilles ($4,008 \pm 0,393$ mg ER / g Ms), aussi cette partie enregistré la valeur la plus faible en flavonoïdes pour l'extrait de butanol ($0,425 \pm 0,004$ mg ER /g Ms). Autant, les fractions organiques des tiges ont montré des faibles teneurs en flavonoïdes ($0,850 \pm 0,005$ mg ER /g Ms et $0,691 \pm 0,033$ mg ER /g Ms pour les fractions de butanol et d'acétate d'éthyle respectivement).

Sur la base de ces résultats, nous pouvons constater que l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles est plus riche en flavonoïdes par rapport à l'extrait butanolique. Ceci, est peut être expliqué par la nature des composés flavonoïdiques (le cas des isoflavones, flavanones et flavonols) qui sont extraits préférentiellement par l'acétate d'éthyle (Andersen et Markham, 2005). Toutefois, la partie de la tige présente une répartition égale entre le contenu en flavonoïdes moyennement polaire et polaire.

Les flavonoïdes constituent l'un des groupes les plus diverses et répandus des composés naturels et ce sont les composés phénoliques naturels les plus importants (Djeridane et *al.*, 2010), ils désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, plus de 4000 molécules sont identifiées. Ce sont des pigments essentiels, responsables de la coloration des fleurs, fruits et feuilles (Marfak, 2003; Hadi, 2004).

De plus, les caractéristiques physicochimiques du milieu sont également des causes de modifications profondes des spectres d'absorptions (PH, teneurs en métaux) et à la solubilité qui dépend non seulement de la polarité du solvant d'extraction mais aussi du nombre et de la position des groupements hydroxyles libres, au poids moléculaire et même du nombre, du type et de la position de la liaison des glucides avec les flavonoïdes (Boukroune, 2012 ; Telli, 2017 ; Aitfella, 2010).

D'après la bibliographie, les teneurs en flavonoïde de nos extraits des différentes parties étudiées étaient élevés que celles mentionnées par Wassef (2019), qui a trouvé un teneur de $0,39 \pm 0,07$ mg ER /g et $0,16 \pm 0,03$ mg ER /g Ms pour les feuilles suivi et de $0,16 \pm 0,05$ et $0,10 \pm 0,01$ mg ER /g Ms pour les tiges. Ainsi sont plus élevés de ceux

présentés dans l'étude D'kanoun (2011). et aussi un teneur faible en flavonoïde des extraits des tiges, qui le résultat de (Halimi. KH., 2016).

Par Ailleurs, Charifi et Dardar (2016) ont quantifié la teneur en flavonoïdes des extraits aqueux des feuilles de *Z. lotus*, ils ont été trouvés un taux de flavonoïdes de 28.48 ± 1.29 mg /g. De même travail réalisé par Bakchiche et Gherib (2014) sur les extraits hydro-éthanolique des feuilles, ils ont révélé la richesse de ces extraits en flavonoïdes avec une teneur égale 14.79 ± 0.54 mg /g. Ces résultats sont plus importants en comparaison avec nos résultats.

D'après Hammoudi, (2015), les teneurs en flavonoïdes sont augmentés lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et de survivre.

Récemment, dans une étude réalisée par Baba Ouyoub (2017) sur les extraits d'Ac. Et des feuilles de *Zizyphus lotus* de la région de Ghardaïa, elle a estimé une teneur comparable à notre résultat pour les extraits obtenus d'une extraction discontinue.

Il est important de signaler qu'il est difficile de comparer nos résultats avec ceux rapportés par la littérature. Puisque, la variation de la teneur en phénols totaux et en flavonoïde qualitativement et quantitativement d'une plante à autre peut être attribuée à plusieurs facteurs :

- ✚ les conditions expérimentales : la méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (Lee et *al.*, 2003).
- ✚ Facteurs climatiques et environnementaux: la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. (Ebrahimi et *al.*, 2008).
- ✚ les facteurs génétiques, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (Miliauskas et *al.*, 2004).
- ✚ De plus, il est connu qu'une forte variabilité peut affecter la teneur en composés phénoliques à différents stades de maturation et dans différentes conditions de croissance (telles que la température et les précipitations) (El Abedletal, 2014).

Egalement, il faut toutefois appuyer qu'il ne s'agit ni de même solvant ni de même protocoles d'activité, ni de matériel de départ (sec, fraîche), ni de même durée de conservation et de température d'étude; ce qui pourrait expliquer l'intervalle observé entre nos résultats et ceux de la bibliographie.

A titre de simplifier la présentation des résultats, nous avons représenté dans l'histogramme qui suit les différentes valeurs du contenu en phénols totaux et en flavonoïdes pour les quatre extraits

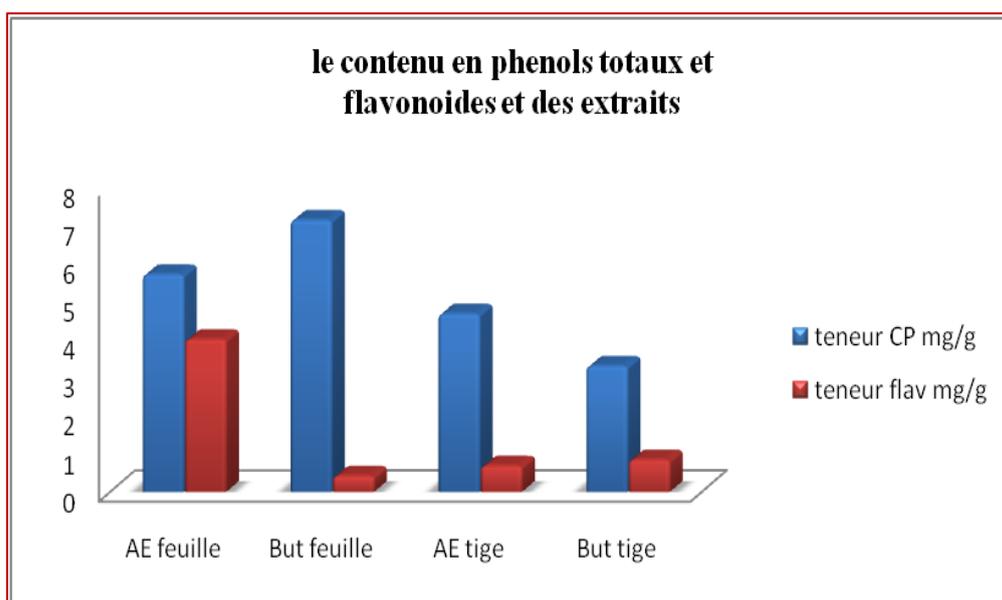


Figure 12 : Histogramme représentant le contenu en phénols totaux et flavonoïdes Des différents extraits.

À l'issue de cet histogramme, on peut déduire alors, que les extraits testés présentent des pourcentages très faibles en flavonoïdes qui sont compris entre 7 % et 14, excepté l'extrait Acétate d'éthyle des feuilles qui montre sa richesse en ces composés dont le pourcentage est de 67 %.

Ainsi, ces faibles proportions indiquent la présence des autres composés phénoliques à des structures chimiques différentes que celles des flavonoïdes (acide phénoliques, tanins, stilbènes ...); soit un composé majoritaire avec un pourcentage élevé, soit plusieurs composés à différents rapports.

Afin de chercher l'existence de corrélation entre teneurs en phénols et flavonoïdes, nous avons porté dans une courbe la variation de la quantité des phénols totaux en fonction de la teneur en flavonoïdes (Figure 13).

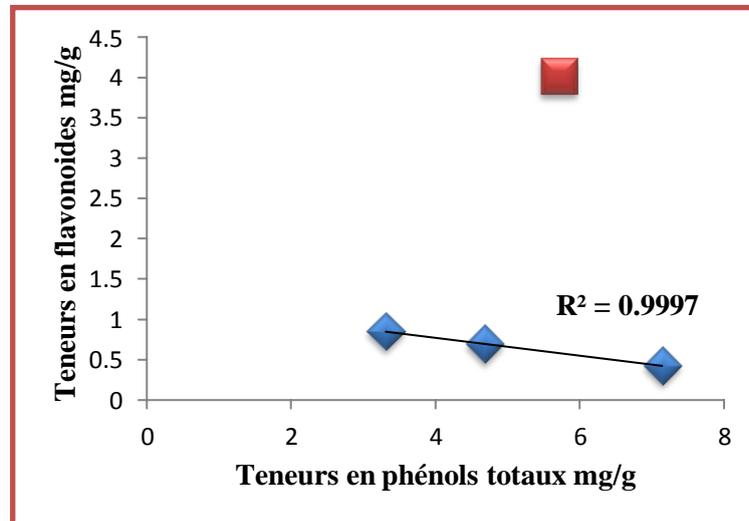


Figure 13 : Variation de la teneur en flavonoïdes en fonction de la teneur en phénols totaux des différents extraits

D'après le graphe représenté dans la figure ci-dessous, il convient de noter l'existence d'une bonne corrélation de 99.9% entre les quantités en phénols totaux et flavonoïdes, à l'exception des teneurs en flavonoïdes des extraits d'acétate d'éthyle des feuilles. Ce résultat montre que la quantité des flavonoïdes est inversement proportionnellement avec le contenu en phénols totaux, ce qui peut être traduit par le fait que les extraits étudiés renferment en général un matériel phénolique riche en d'autre classe de ces composés en quantité majeure que celle des flavonoïdes.

III. Evaluation du pouvoir antioxydant

De nombreuses études réalisées sur les produits naturels ont prouvé que ce sont particulièrement les composés phénoliques qui sont responsables de leur activité antioxydante (Apostolidis et *al.*, 2007 ; Nickavar et *al.*, 2008; Chao- Mei., 2009). Pour cette raison, nous avons évalué le pouvoir antioxydant de nos extraits phénoliques.

Plusieurs méthodes sont utilisées afin de mesurer l'activité antioxydante d'un matériel biologique. Les plus couramment utilisées sont celles faisant intervenir des composés chromogène des radicaux naturels qui stimulent les espèces réductrices d'oxygène. Ces méthodes sont populaires en raison de leur facilité de rapidité et de sensibilité. La présence d'antioxydants conduit à la disparition de ces chromogènes radicalaires; les plus largement utilisés étant l'ABTS et la méthode DPPH. Quelques autres dosages couramment utilisés comme test FRAP et le dosage ORAC (Shahin, 2008).

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos extraits phénoliques, a été réalisée par deux tests chimiques *in vitro*. On s'intéresse à mesurer l'activité de balayage du radical libre par les fractions antioxydantes de nos extraits phénoliques en employant le radical stable 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) qui a été largement appliqué pour estimer l'activité antioxydante ces dernières années (Nickavar *et al.*, 2008 ; Ravindra *et al.*, 2010). Ainsi, nous avons testé la capacité de nos extraits de réduire les ions ferriques en ions ferreux à partir le test de FRAP.

III.1-Test du DPPH (2,2-Diphényl-1-Picryl Hydrazyl)

L'activité antioxydante des différentes fractions des feuilles et des tiges du *Zizyphus lotus* vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée par spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires (Bougandoura et Bendimerad, 2012). Le potentiel pouvoir anti-radicalaires de ces substances a été comparer généralement par certains antioxydants standards connus pour leurs propriétés antioxydantes puissantes comme contrôles positifs. Les plus populaire étant la vitamine C, et le BHA et le Trolox (Liang-Liangetal., 2010).

Le radicale DPPH• (2,2'-Diphényl-1-picrylhydrazyl) c'est est un radical libre lipophile et stable qui a été généralement utilisé pour estimer l'activité antioxydante des produits alimentaires et des médicaments. Le choix particulier d'évaluer le pouvoir antioxydant par le test de DPPH a résidé que ce test est rapide, simple et peu coûteux pour mesurer la capacité antioxydante des différents extraits (Yen *et al.*, 2005 ; Khenfer et Medjouel, 2016).

Les mesures de l'absorbance de chaque solution d'extrait à différentes dilutions nous ont permis de calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH•. L'activité anti-radicalaire peuvent être formulée en tant que: pourcentage de l'activité anti-radicalaire ou en pourcentage du radical DPPH• restant ou peuvent également être exprimée en utilisant le paramètre IC₅₀, qui l'on choisi à fin déterminer l'activité anti-radicalaire de nos extraits.

La valeur d'IC₅₀ est inversement proportionnelle à la capacité anti-radicalaire (taux d'inhibition I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus l'activité anti radicalaire d'un composé est appréciable (Markowicz Bastos et *al.*, 2007).

Les valeurs d'IC₅₀ sont déterminées graphiquement à partir la courbe linéaire entre les différentes concentrations des extraits phénoliques ou les antioxydants standards choisis (Trolox et l'acide ascorbique) et la variation du pourcentage d'inhibition I % (Fig.14, 15).

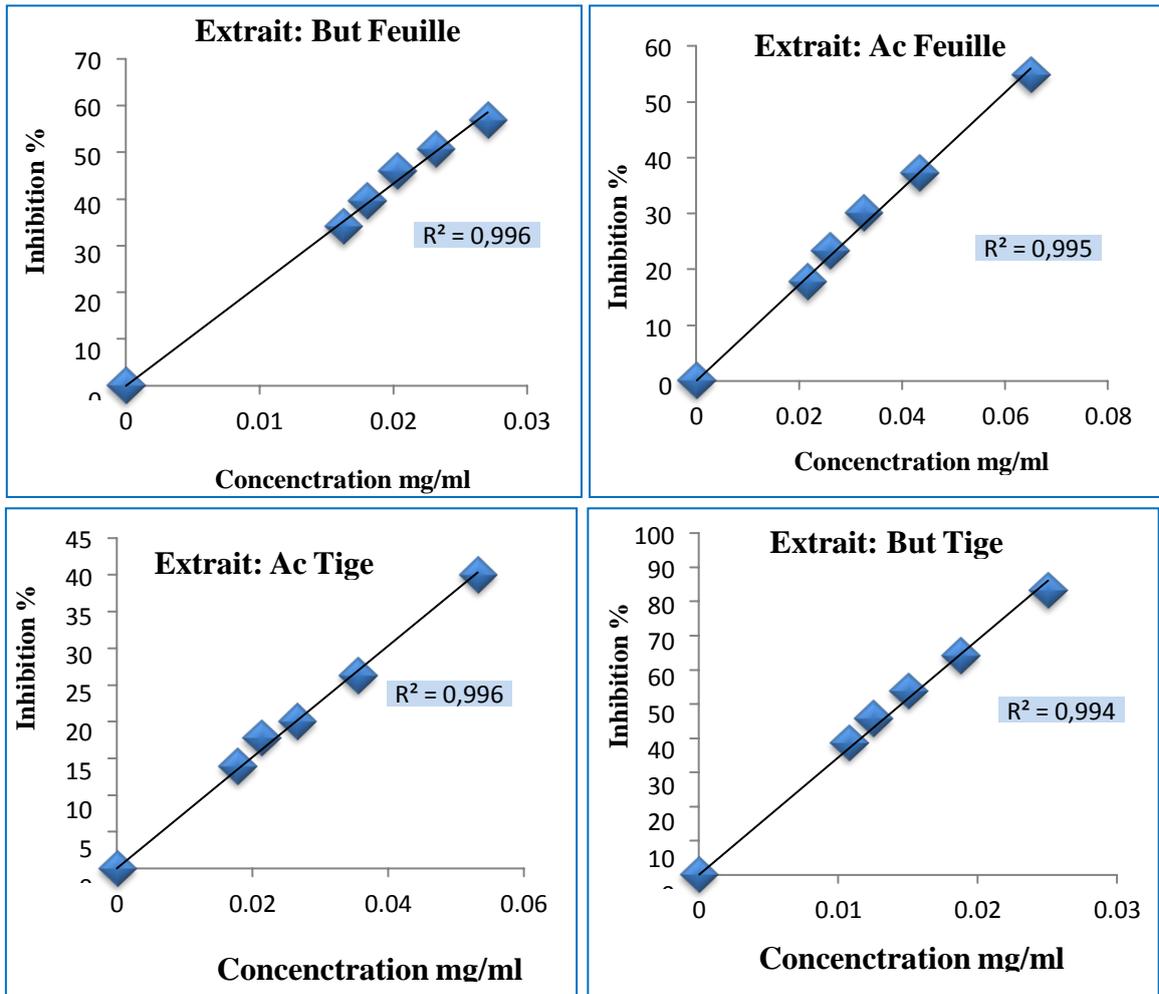


Figure 14 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I % du radical DPPH• en fonction de la concentration des extraits phénoliques du Zizyphus lotus.

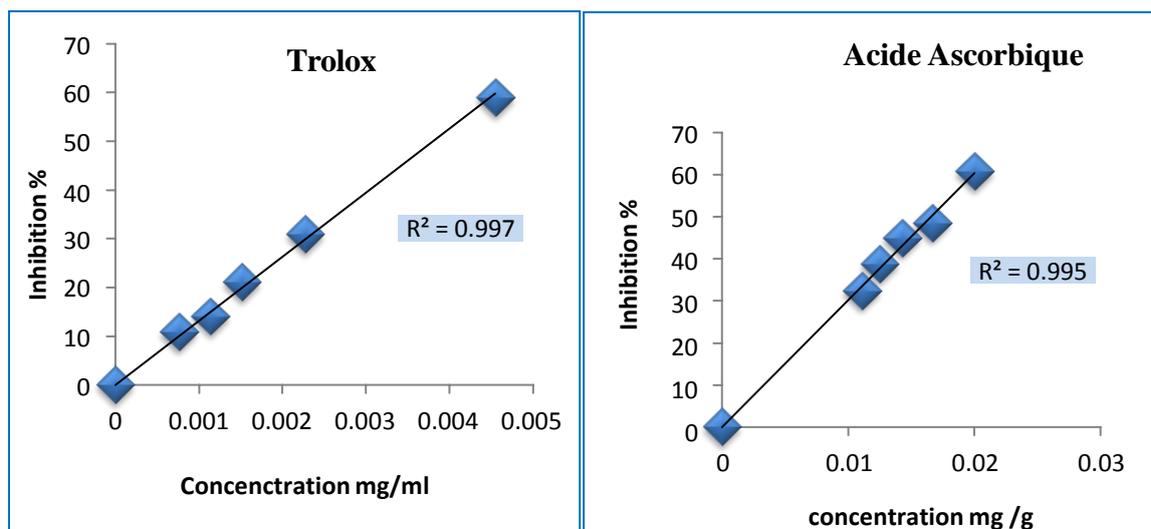


Figure 15 : Courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition I% du radical DPPH• en fonction de la concentration des antioxydants standards (Trolox et acide ascorbique).

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés à partir des tracées précédents, nous ont permis de déterminer la concentration d'inhibition à 50% des antioxydants présents dans les extraits phénoliques exprimés en mg/ml. De même, nous avons calculé les IC₅₀ de l'acide ascorbique et du Trolox afin de les comparer avec ceux des extraits phénoliques. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Les valeurs d'IC₅₀ en (mg/ml) des différentes fractions étudiées de *Zizyphus lotus* et les antioxydants standards.

Partie utilisée	Fraction organique	IC ₅₀ (mg/ml)
Feuille	Ac.Et	0.0582 ± 0.0067
	BuOH	0.024 ± 0.000048
Tige	Ac.Et	0.066 ± 0.0010
	BuOH	0.0146 ± 0.0013
Trolox	/	0.0038 ± 0.0001
Ac.Ascorbique	/	0.016 ± 0.0001

En analysant l'ensemble des résultats obtenus dans le Tableau (2) et sachant que le paramètre IC₅₀ est inversement proportionnel à l'activité anti-radicalaire. Nos résultats, montrent clairement que les extraits phénoliques des feuilles et des tiges de *Zizyphus lotus* possèdent un potentiel antioxydant important comparable avec celui des antioxydants de référence utilisés dans ce test. Puisque les valeurs d'IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'activité anti-radicalaire. La valeur d'IC₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité la plus élevée (Boubekri, 2014).

Les valeurs d'IC₅₀ des extraits d'acétate d'éthyle est de 0,0582 ± 0,0067 mg/ml et de 0,066 ± 0,0010 mg/ml pour les feuilles et les tiges successivement. Autant, les extraits butanoliques présentent des valeurs égales de 0,024 ± 0,000048 mg/ml et de 0,0146 ± 0,0013 mg/ml respectivement. Donc, nous observons que les valeurs d'IC₅₀ les plus faibles

ont été obtenues dans les extraits butanoliques, ce qui peut être expliqué par leurs richesses

en tanins et en flavonoïdes dont l'activité anti-radicalaire a été largement documentée. (Laughton M. J. et al., 1989, Chahma A., 2006, A.Meddour, et al., 2013).

Au regard du tableau précédent, on peut dire que l'extrait du butanol des tiges de *Zizyphus lotus* est un antioxydant puissant et que l'extrait d'acétate d'éthyle de la même partie étudiée est un antioxydant faible. Malgré qu'ils aient montré des teneurs proches en composés phénoliques, ce qui indique la caractérisation de l'extrait butanol des tiges par des molécules spécifiques, soit le type ou bien la structure chimique, qui agissent potentiellement sur les radicaux libres.

On remarque que les extraits d'acétate d'éthyle se sont révélés moins actifs vis - à - vis du DPPH' comparativement aux extraits du butanol. Deux hypothèses pourraient être émises pour expliquer à leur moindre effet : soit que ces extraits ne contiennent pas assez de composés phénoliques du fait du caractère polaire d'acétate d'éthyle; soit que les composés phénoliques présents ne correspondent pas à ceux possédant des propriétés antioxydantes intéressantes. D'après les résultats de la quantification des phénols totaux qui ont été montrés la richesse de ces extraits en ces composés par rapport les autres extraits, alors nous avons confirmé la deuxième hypothèse et que les extraits d'acétate d'éthyle ne possèdent pas des substances anti-radicalaires puissantes.

L'analyse des résultats de l'activité anti-radicalaire d'une partie à l'autre montre que tous les extraits des feuilles et des tiges possèdent presque les mêmes valeurs d'IC₅₀ selon la fraction. Ce qui peut être expliqué par le fait que ces différentes fractions d'acétate d'éthyle et butanolique issus d'une macération hydro-méthanolique renferment les mêmes structures de composés phénoliques actifs.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire des extraits de *Zizyphus lotus* a été faite en comparaison avec celles déterminées pour le Trolox et l'acide ascorbique, comme antioxydants de référence. Pour lesquels, nous avons noté les valeurs d'IC₅₀ de $0,016 \pm 0,0001$ mg/ml et de $0,0038 \pm 0,0001$ mg/ml respectivement. D'après ces résultats, on s'aperçoit que tous nos extraits testés ont dévoilé des activités anti-radicalaires proches ou bien comparable à celles déterminées pour les antioxydants standards. Puisqu'ils agissent à des faibles doses et comparables pour certains extraits avec l'acide ascorbique, mais reste

significativement inférieure à celle de Trolox.

En outre, les agents antioxydants choisis dans notre étude sont utilisés actuellement en thérapie et en industrie alimentaire, mais se sont accusés d'être dangereux pour la santé en particulier le BHA (Shahin, 2008). Les résultats suggèrent que nos extraits peuvent remplacer les antioxydants de synthèse puisqu'ils présentent un potentiel inhibiteur des radicaux libres comparable à celui observé pour les antioxydants de référence ; et notamment l'extrait butanol des tiges qui a enregistré le potentiel le plus important ($IC_{50} = 0,146 \pm 0,0013$ mg/ml). On peut dire que la variation de la capacité antioxydante de nos extraits comparativement à celle des antioxydants standards choisis pour l'étude pourrait être due à la teneur et/ou la présence de certaines molécules potentiellement actives soit phénoliques et / ou de flavonoïdes dans les extraits.

À titre comparatif avec des autres travaux, les résultats de l'activité anti-radicalaire de nos extraits sont en accord avec ceux obtenus par de Ghazghazia et al., (2014) qui travaillait sur les extraits aqueux des feuilles de *Zizyphus lotus*. Il a montré une activité anti-radicalaire proche à nos résultats avec une valeur d' IC_{50} égale de 0.05 mg/ml pour l'extrait aqueux des feuilles.

L'étude menée par Boulanouar et al., (2014) a montré que la concentration d'inhibition de la moitié du radical DPPH• est de 0,042 mg/ml pour l'extrait aqueux des feuilles de *Zizyphus lotus* qui est proche à celle de nos extrait d'acétate d'éthyle et de butanol. De ce fait, l'activité anti-radicalaire des feuilles de cette plante est attribuée à des substances polaires.

Dans un même travail, la capacité anti-radicalaire des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol des racines de *Zizyphus lotus* ont été évaluée. Il a noté une faible activité anti-radicalaire et une différence importante par rapport à nos résultats ($IC_{50} = 0,611 \pm 0,072$ mg /ml et $0,211 \pm 0,017$ mg /ml). Ce résultat peut être expliqué que les différentes parties (feuilles, tiges et racines) de *Zizyphus lotus* ne contiennent pas les mêmes types d'antioxydants.

Le test du radical libre DPPH• est largement utilisé dans l'étude des composés phénoliques en raison de leur facilité de mise en œuvre et de sa rapidité. De plus, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température) permettent d'éviter l'auto

oxydation des molécules testées et aussi

de comparer un grand nombre de composés (Yi et *al.*, 2008 ; Khenfer et Medjouel, 2016).

En revanche, le radical DPPH[•] pose le problème de son instabilité à la lumière vu que son absorbance à 517 nm décroît sans l'intervention de quelconque antioxydant. C'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH[•] doivent impérativement se faire à l'obscurité. Ce même inconvénient, peut expliquer la légère variation entre les valeurs d'IC₅₀ obtenues à partir des différents extraits d'acétate d'éthyle et des extraits butanoliques (Portes, 2008).

Afin de bien analyser la relation entre la quantité des composés phénoliques existant dans nos extraits et la capacité anti-radicalaire qui évoquée par ces extraits, nous avons étudié la corrélation entre les valeurs d'IC₅₀ et le contenu en phénols totaux et en flavonoïdes (Fig.16).

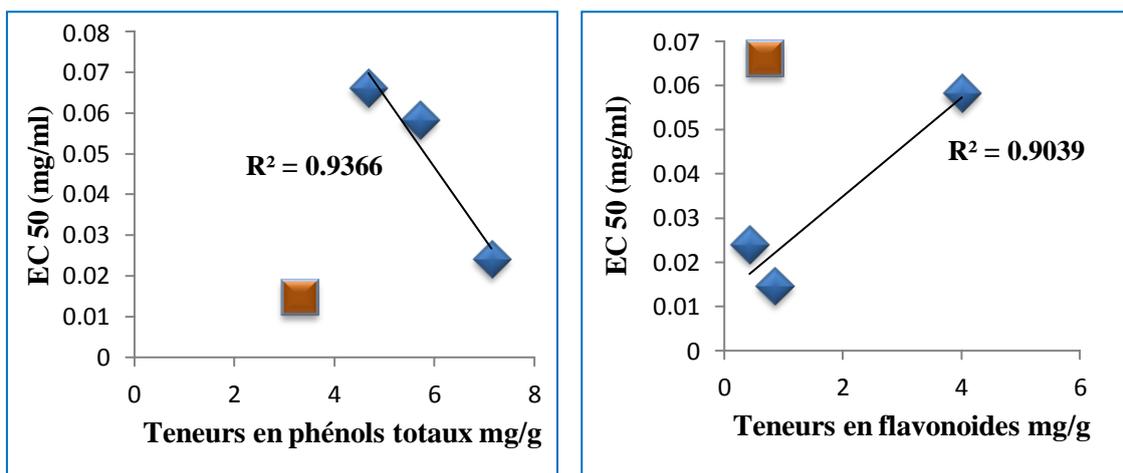


Figure16 : Variation des valeurs d'IC₅₀ du test DPPH en fonction des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des extraits de *Zizyphus lotus*.

À partir des tracés obtenus dans les figures précédentes, on peut mettre en évidence des corrélations linéaires et positives entre la teneur des extraits en composés phénoliques et en flavonoïdes et la capacité de réduire le radical libre DPPH[•].

L'examen de résultat du premier tracé, qui étudié la relation entre les valeurs d'IC₅₀ et le contenu en phénols totaux, reflète un ensemble des extraits ayant une activité qui varie proportionnellement avec le taux en phénols avec des $R^2 = 0,93$, à l'exception l'extrait butanol des tiges.

Le suivi des résultats du deuxième tracé montre ainsi une bonne corrélation avec $R^2 = 0,90$ entre la teneur des extraits en flavonoïdes et le pouvoir anti-radicalaire vis-à-vis le radical DPPH•. Néanmoins, l'augmentation de contenu en flavonoïdes implique une diminution dans l'activité anti-radicalaire.

Ce résultat montre clairement que les extraits qui renferment des teneurs en phénols totaux élevées présentent des pouvoirs antioxydants les plus forts et celles qui ont des taux en flavonoïdes forts présentent des pouvoirs antioxydants les plus faibles. Cela, implique qu'il n'y a pas une influence de la concentration en flavonoïdes sur l'activité, mais c'est le type des molécules qui agissent sur les radicaux libres.

Une explication simple de cette variation, c'est que l'activité des flavonoïdes à piéger les radicaux dépend essentiellement de leur structure comme le montre la figure (17). La position de la double liaison dans le cycle C ainsi que le nombre et/ou la position des groupements hydroxyles (OH) sont les éléments les plus importants pour expliquer l'augmentation ou la diminution de l'activité anti-radicalaire de nos extraits phénoliques (Marfak, 2003). D'après Javanovic et *al.*, (1994) l'effet de piégeage des flavonoïdes est produit par le transfert d'atomes d'hydrogène du groupe hydroxyle. Cette réaction rend les molécules de radicaux libres plus stables.

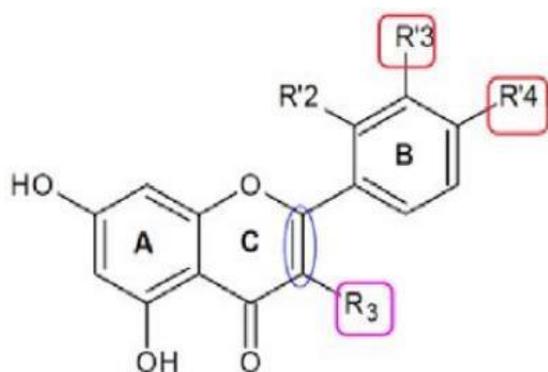


Figure 17 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

Ces résultats montrent qu'il y a une influence de la concentration en phénols totaux et spécifiquement en acides phénoliques sur l'activité.

En fin, on peut dire que la variation de la capacité anti-radicalaire de nos extraits

entre eux pourrait être due à la teneur et/ou la présence de certaines molécules potentiellement actives de flavonoïdes et /ou phénoliques dans les extraits.

Egalement, cette variation peut dépendre de plusieurs facteurs, comme; les groupements fonctionnels donneurs d'électrons, les fonctions hydroxyles, ainsi que des synergies entre les composés actifs qui constituent chaque extraits. Ces résultats positifs sur l'activité antioxydante des extraits suggèrent des études plus approfondies de leur activité biologique, afin d'élaborer des produits naturels de valeur pouvant être commercialisés substitués aux antioxydants existants.

III.2- Mesure du pouvoir réducteur ferrique (test FRAP)

L'activité antioxydante de nos extraits a été évaluée également en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est décrite initialement par Benzie et Strain (1996) et modifiée par Pulido et *al.*, (2000). Elle permet de mesurer le pouvoir réducteur d'un antioxydant qui réagit avec le complexe tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) et qui produit le tripyridyl-triazine ferreux (Fe^{2+} -TPTZ), d'une coloration bleue intense (Tiffany, 2012). La mesure de l'absorbance a été fait à une longueur d'onde $\lambda = 595\text{nm}$ par une spectrophotométrie UV-Visible (Tlili, 2015).

La capacité des antioxydants présents dans nos extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer Ferreux (Fe^{2+}) est déterminé à l'aide la courbe d'étalonnage de la solution de sulfate ferrique (FeSO_4) (Annexe1) et les résultats sont exprimés en des valeurs de FEAC (Ferrous sulphate Equivalent Antioxydant Capacity): mmol/ml de fer ferreux (mmol/ml Fe^{2+}).

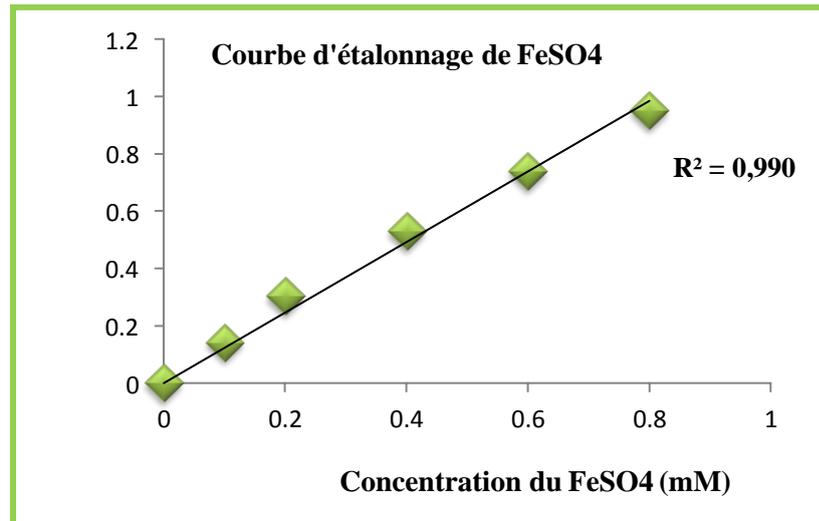


Figure 18: Courbe d'étalonnage de la FeSO₄

Le pouvoir antioxydant de nos extraits est comparé à ceux des antioxydants de référence comme le Trolox et l'acide ascorbique qui nous avons choisi dans cette étude. Les résultats des différents extraits et les antioxydants standards ont été présentés dans l'histogramme suivant :

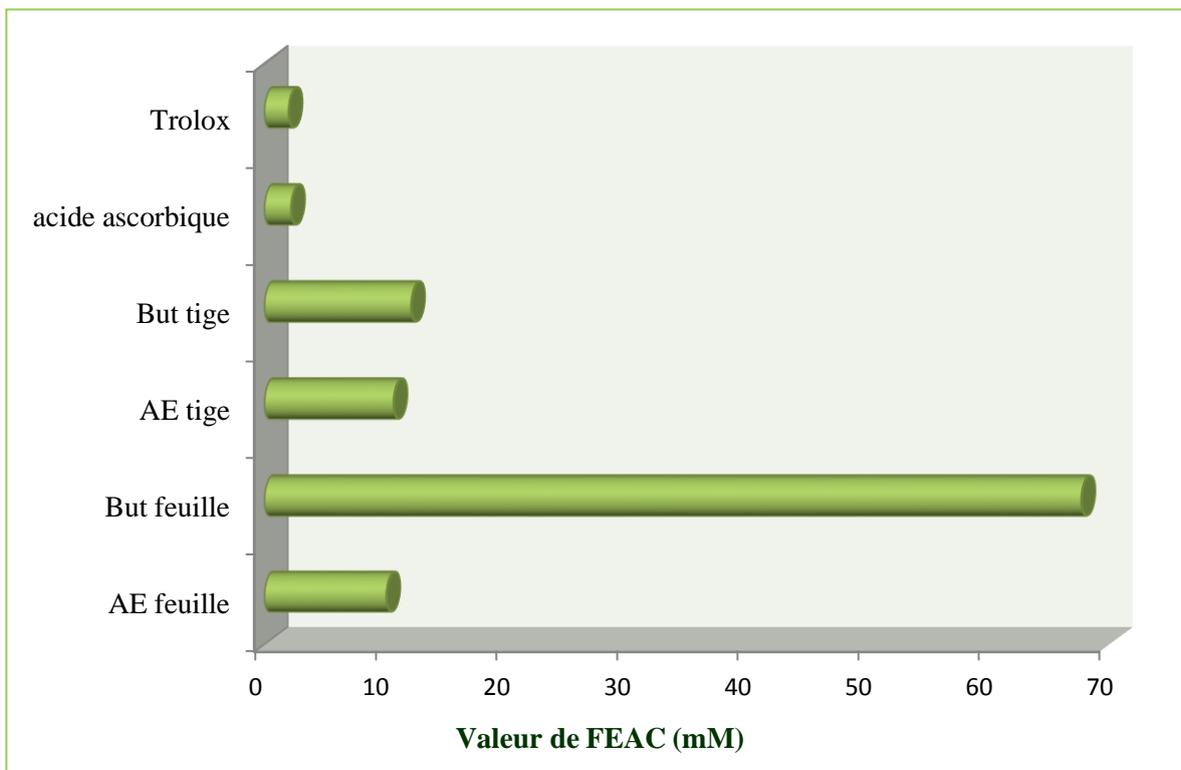


Figure 19 : valeurs de FEAC des extraits phénoliques étudiés et

Pour l'ensemble des extraits, nous observons une importante activité réductrice des ions de Fe^{3+} qui se traduit par de grandes valeurs en FEAC ; qui varient entre 67,756 et 10,162 mg /ml .En effet, l'extrait butanol des feuilles de *Zizyphus lotus* révèle une meilleure capacité antioxydante. La capacité réductrice de fer la plus faible est enregistrée pour l'extrait d'acétate d'éthyle de la même partie étudié.

D'après les résultats obtenus nous avons constaté encore un pouvoir réducteur puissant pour tous les extraits particulièrement ceux obtenus au butanol. Cette activité remarquable a été enregistrée pour l'extrait butanol des feuilles ($67,756 \pm 0,09$ mg/ml) suivie par l'extrait butanol des tiges ($12,219 \pm 0,02$ mg /ml). Cela peut être justifié par la richesse de ces extraits en des substances à des propriétés antioxydantes puissantes et de nature chimique polaire ou très polaire.

Ainsi, on remarque que les extraits d'acétate d'éthyle des feuilles et des tiges ont déterminé des valeurs très proches de FEAC, $10,162 \pm 0,05$ mg /ml et $10,756 \pm 0,09$ mg /ml successivement. Ce qui peut expliquer par la présence des mêmes molécules actives dans les deux extraits.

En outre, nos résultats montrent clairement que les extraits phénoliques pour les deux parties sélectionnées du *Z. Lotus* possèdent un potentiel antioxydant nettement supérieur à celui des antioxydants de référence utilisés dans ce test, Trolox et d'acide ascorbique, qu'ils ont noté des valeurs égale $2,048 \pm 0,06$ mg /ml et $2,252 \pm 0,02$ mg /ml respectivement. Ces résultats affirment que nos extraits peuvent remplacer les antioxydants de synthèse puisqu'ils présentent un pouvoir réducteur ferreux plus puissant et supérieur à celui marqué pour les antioxydants de référence.

En conséquence, le potentiel antioxydant des extraits et des standards peut exprimer par un autre paramètre qui a été calculée à partir la courbe d'étalonnage de FeSO_4 noté, EC1 (concentration équivalente 1). Le paramètre EC1 est défini comme la concentration de l'antioxydant qui donne une réduction du complexe (Fe^{3+} -TPTZ) équivalent à 1mM du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

La courbe d'étalonnage de FeSO_4 a servis également de déterminer le paramètre

EC1 pour les différents extraits. Ainsi, le paramètre EC1 est inversement proportionnel à

L'activité antioxydante; puisque plus la valeur d'EC1 est faible, plus le pouvoir antioxydant des extraits est important.

Tableau 3 : Les valeurs d'EC1 des extraits phénoliques étudiés

Partie utilisée	Fraction organique	EC 1 (mg/ml)
Feuille	Ac.Et	2.813
	BuOH	0.526
Tige	Ac.Et	2.175
	BuOH	1.354

L'analyse des résultats du pouvoir réducteur de fer ferrique qui présentés dans le tableau au-dessus permet de constater que les extraits étudiés dans ce travail présentent une Activité antioxydante puissante, dont ils ont noté des faibles valeurs en EC1 qui sont comprises entre 0,526 et 2,813 mg/ml.

Globalement, les valeurs EC1 révèlent que les extraits du butanol ont une activité antioxydante la plus forte que les extraits d'acétate d'éthyle qui ont noté les valeurs les plus élevés. Par ailleurs, l'extrait butanol des feuilles présente le meilleur pouvoir réducteur de fer dont il est marqué une valeur EC1 la plus faible (0,0526 mg/ml).

Autant, les extraits d'acétate d'éthyle des feuilles et des tiges ont marqué des valeurs très proches d'EC1 : 2,813 mg/ml et 2,175 mg/ml successivement. Ce qui confirme les valeurs de FEAC et peut être expliqué par la distribution égale des substances réductrices dans la partie aérienne de *Zizyphus lotus*.

En comparant nos résultats avec les résultats de Salah Halima, (2017) que ces résultats montrent la capacité de réduire les ions fer ferreux en ferreux avec un changement de concentration (400 et 500 µg/mL). Les extraits à concentration 500 µg/mL, le pouvoir réducteur des extraits de *Z. Lotus* est de $285,13 \pm 4,14$ mM et à une concentration de 400 µg/mL, les extraits de *Z. lotus* ont montré la capacité de la réduction des ions fer ferrique en ferreux égale à $(364, 65 \pm 6,59)$ mg /ml Fe(II), équivalent Fe(II) par rapport à l'acide

ascorbique ($281,68 \pm 3,59$ 94 mg/ml équivalent Fe(II)). Ces résultats sont plus forts que les résultats de notre travail et cela peut être attribué à la concentration des extraits

phénoliques et la présence des substances spécifiques à des propriétés antioxydantes puissantes.

Le travail de Baba Ouyoyba, (2017) sur l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Z. lotus* pour sa capacité à restaurer le fer en fer ferreux a montré une forte capacité réductrice avec une valeur d'IC₅₀ égale 10,804 mg / ml. Ainsi, Benammar, (2011) montrent qu'il existe une forte corrélation ente la capacité antioxydante et l'abondance de vitamine E dans les feuilles du *Z.Lotus*. En parallèle, Lenucci et al. (2006) ont démontré encore que l'activité antioxydante du jujubier est probablement due à sa teneur en vitamines antioxydantes.

Généralement, le puissant pouvoir réducteur des extraits de *Zizyphus Lotus* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron et provoque la réduction de complexe ferrique (Fe³⁺) en complexe ferreux (Fe²⁺). Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydant potentielle (Mansouri et al, 2005 ; Djeridane et al., 2006 ; Bougandoura et Bendimerad, 2013).

Dans le but d'élucider la relation entre le contenu en composés phénoliques et le pouvoir réducteur des extraits de *Zizyphus Lotus*, nous avons tracé les courbes qui relient le paramètre EC1 avec la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes.

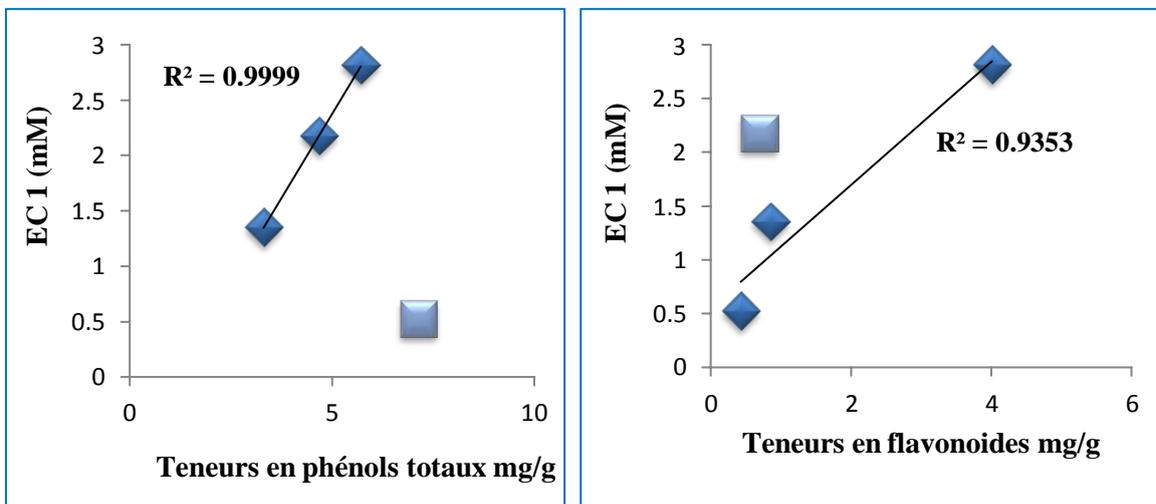


Figure20: Variation des valeurs d'EC1 du test FRAP en fonction des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes des extraits étudiés.

Ces résultats suggèrent que le pouvoir de réduction ferrique déterminé en utilisant un dosage de FRAP est corrélé avec la présence des composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes.

D'après les tracés précédents, nous avons remarqué une corrélation positive entre la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes et leur activité antioxydante. Ces tracés reflètent un seul ensemble des extraits (sauf l'extrait butanol des feuilles) ayant une activité antioxydante varie proportionnellement avec le taux en phénols totaux et en flavonoïdes avec un coefficient de corrélation R^2 égale 0,99 pour les phénols totaux et de 0,93 pour les flavonoïdes.

Autant, l'ensemble des extraits ayant une activité antioxydante varie inversement avec le taux en phénols totaux et en flavonoïdes; c'est-à-dire les extraits qui renferment des teneurs phénoliques élevées, présentant des pouvoirs antioxydants les plus faibles. Cela, implique qu'il n'y a pas une influence de la concentration sur l'activité antioxydante, mais c'est le type des molécules qui agit sur les radicaux libres.

Il ressort de ces résultats que le pouvoir de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) est bien corrélé avec la présence des composés phénoliques notamment les flavonoïdes et d'autres classes phénoliques. Ainsi, il est dû à la complexité de nos extraits par les composés phénoliques et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (Vermerris et Nicholson, 2006).

La capacité antioxydants des extraits de *Zizyphus Lotus* a été déterminée par le test du pouvoir réducteur de fer (FRAP), qu'il est simple, rapide, peu couteux et robuste (Tiffany, 2012). Aussi, il est universel et peut être appliqué bien chez les plantes que les plasmas et dans les extraits organiques et aqueux (Bougandoura et Bendimerad, 2013). En revanche, il faut noter qu'aucune méthode de test unique n'est capable de fournir une image complète du profil d'un échantillon antioxydant étudié et ne permet pas à aperçu tous les modes d'actions des composés. Bien qu'ils exigent de combiner de différentes méthodes d'étude de l'activité antioxydante à fin d'évaluer le pouvoir des échantillons.

Conclusion Générale

Un grand nombre des plantes médicinales représente une source inépuisable des substances bioactives qui présentent l'avantage d'une très grande diversité structurale et possèdent des propriétés biologiques très importantes. On trouve de nombreuses applications dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

L'objet de notre travail a porté sur l'étude d'activité antioxydante des métabolites secondaires (composés phénoliques) des feuilles et des tiges du *Zizyphus lotus*, plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle, récoltée dans la région Chabka –Metlili-Ghardaïa. De ce fait, nous nous sommes intéressés principalement, à la détermination par spectrophotométrie les teneurs de certaines molécules bioactives telles que les phénols totaux et les flavonoïdes; après l'évaluation *in vitro* l'activité antioxydante des fractions d'acétate d'éthyle et du butanol des feuilles et des tiges.

L'extraction de ces différents composés s'effectue par une macération à froid dans un solvant hydro-alcoolique : méthanol/eau avec un rapport de (8/2 v/v). Après, une purification d'extrait brut est réalisée en employant des solvants de polarité croissante (acétate d'éthyle et butanol). Les rendements d'extraction ont montré une rentabilité importante en tous les extraits, varié entre 2,8 % et 72,4%.

L'analyse quantitative des extraits du *Zizyphus lotus* est représentée par le dosage de leur contenu en phénols totaux et en flavonoïdes à l'aide de la spectrophotométrie UV-visible. Cette analyse nous a montré une richesse de nos extraits en phénols totaux et en flavonoïdes plus particulièrement ceux obtenus à partir des feuilles, avec des teneurs qui varient de 3,309 à 7,140 mg EAG / g de la matière sèche et de 0,425 à 4,008 mg ER / g de la matière sèche pour les phénols totaux et les flavonoïdes respectivement. Par ailleurs, on a révélé que l'extrait butanol des feuilles est le meilleur extracteur des phénols totaux. Tandis que, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles possède la capacité la plus importante à extraire les flavonoïdes.

La variation de la teneur en flavonoïdes en fonction la quantité des phénols totaux des extraits dévoilée une bonne corrélation avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,99$. La quantité des flavonoïdes est variée inversement proportionnelle avec le contenu en phénols

totaux, ce qui peut être traduit par la présence d'autre classe des composés phénoliques en quantité très importante que les flavonoïdes.

L'évaluation des propriétés antioxydantes et anti-radicalaires des différents extraits du *Zizyphus lotus* a été déterminée *in vitro* par deux tests chimiques: le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et le test de FRAP (FerricReducing/Antioxidant Power). Ainsi, elles sont comparées par rapport deux antioxydants de référence, le Trolox et l'acide ascorbique.

L'estimation du pouvoir de piéger le radical DPPH• par nos extraits a révélé que tous nos extraits phénoliques manifestent une très forte activité et comparable à celle déterminée par l'antioxydant standard, acide ascorbique, qui est enregistré une valeur d'IC₅₀ égale $0,016 \pm 0,0001$ mg/ml. Ainsi, une forte activité anti-radicalaire a été constatée par l'extrait butanol des tiges avec une valeur d'IC₅₀ = $0,0146 \pm 0,0013$ mg/ml.

Ainsi, la contribution des phénols et flavonoïdes dans l'activité anti-radicalaire est confirmée par les corrélations positives ($R^2 = 0,936$ et $R^2 = 0,90$) entre les valeurs d'IC₅₀ des extraits et le taux de ces composés. Ces résultats confirment que l'activité anti-radicalaire dans nos différents extraits dépend du contenu de ces extraits en composés phénoliques.

La capacité réductrice du fer ferrique par nos extraits par le test de FRAP a révélé que les extraits de la partie aérienne du *Zizyphus lotus* présentent une activité antioxydante importante et nettement supérieure à celle des antioxydants de référence, avec des valeurs de FEAC comprises entre 10,16 et 67,75 mM. Ces valeurs ont montré des corrélations positives avec les taux en phénols et en flavonoïdes ($R^2 > 0,90$). Egalement, le test de FRAP affirme que les extraits butanoliques ont une activité antioxydante la plus forte.

Ce travail a permis d'étudier les extraits des feuilles et des tiges de *Zizyphus lotus* de la région de Metlili – Ghardaïa, en évaluant le pouvoir antioxydant de certaines leurs substances bioactives : phénols totaux et les flavonoïdes. Les résultats affirment que cette plante est une source potentielle des composés phénoliques à une activité antioxydante puissante qui peut utiliser contre le stress oxydatif.

L'ensemble de ce travail a permis donc de mieux appréhender l'intérêt de l'étude des espèces locales de la région de Ghardaïa et de prouver *in vitro* l'importance des caractéristiques chimiques de certaines de leurs substances d'intérêt bioactif (structure - Activité).

Finalement, ce travail ne constitue qu'une première étape dans la recherche de sources naturelles des substances biologiquement actives, notre perspective d'avenir est d'étudier chaque extrait séparément puis isoler, purifier et identifier les différentes molécules responsables à ces deux activités

- Isoler et identifier les molécules bioactives ayons des effets bénéfiques .
- Evaluer *in vivo* l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antidiabétique et antimutagène et d'autres activités biologiques de chacun de ces composés pris séparément ;
- Déterminer la toxicité de ces molécules ;
- L'inclusion de ces molécules dans le développer des médicaments antioxydants, anti-inflammatoires ou anti-lithiasique...etc.

En fin, la biodiversité des plantes médicinales traditionnelles constituent un réservoir assez important de métabolites secondaires pour la recherche dans le futur.

*Références
bibliographiques*

A

Amiot, M. J., Fleuriet, A., & Macheix, J. J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol 34(5), p823-826.

Abderrazak M. et Joël R. (2007). *La botanique de A à Z*. Ed. Dunod. Paris. 177p.

Aberkane M. C., (2006). Etude phytochimique de la plante *Publicaria laciniata*. Thèse De Doctorat. Université EL-HADJ LAKHDAR-Batna. pp 166.

Amedjoudj, N. E. H,Bounab, R et Menzer, M., (2017) . Les polyphénols de l'extrait n-butanol d'une plante médicinale de la famille des Rosacées: Evaluation de leur pouvoir antioxydant et protecteur vis-à-vis la toxicité de la doxorubicine, Mémoire de Master Spécialité : Toxicologie. Université des Frères Mentouri Constantine-Alger.

Abdoul-Azize, S., Bendahmane, M., Hichami, A., Dramane, G., Simonin, A. M., Benammar, C., Khan, N. A. (2013). Effects of *Zizyphus lotus* L.(Desf.) polyphenols on Jurkat cell signaling and proliferation. *International immunopharmacology*, Vol 15(2), p 364-371.

Adeli, M., et Samavati, V. (2015) . Studies on the steady shear flow behavior and chemical properties of water-soluble polysaccharide from *Zizyphus lotus* fruit. *International journal of biological macromolecules*, Vol 72, p580-587.

Amiot M J, Fleuriet A, and Macheix J J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 34 (5), pp 823-826.

A, Chahma., (2006) .« Cataloge des plantes spontanées du sahara septentrional algerien », Dar elhoda, Ain mlila.

A.Meddour, M.Yahia, N.Benkiki, A.Ayachi., (2013), « Étude de l'activité antioxydante et antibacterienne des extraits d'un ensemble des parties de là fleurs du *Capparis Spinosa* (L.) », *J. Lebanese Science*,vol 14 (01), p : 49-60.

Anonyme, (1974). *Encyclopédie-Le Grand Médical*. L'histoire de la médecine et de la chirurgie, l'avenir de la médecine, les prix Nobel. Edition Service S.A., Genève (Suisse), 397 pp.

Andersen, O. M., & Markham, K. R. (Eds.). (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press.

Abdel-Hameed, E.S., (2009) Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. *Food Chem.* vol 114:p1271-1277.

B

Baba Aissa F. (1999) Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb). Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident, Ed. Edas, 178 p.

Bougandoura N., (2011) Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Satureja calaminthassnepta* (nabta) et *Ajugaiva L.* (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Mémoire de Magister. Université ABOU BAKR BELKAID-Tlemcen. p 76.

Bartosz, G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, Vol 9(1), p 5-21.

Bidie A. D, N'guessan Banga B, Yapou Adou F, N'guessan J. D., (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Sciences & Nature*. 8: 1-11.

Benammar C. E., (2011). effets antioxydants et immuno-modulateurs d'une plante médicinale nord-africaine, *Zizyphus lotus L.* (sedra) : étude des différents extraits, Thèse De Doctorat. Université ABOU BEKR BELKAID-Tlemcen. pp 120.

Bouallala M, Bradai L, Abid M (2014) Diversité et utilisation des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien dans la pharmacopée saharienne. Cas de la région du Souf. *Revue ElWahat pour les recherches et les études* vol 7(2):p 18–26.

Borgi, W., Recio, M. C., Ríos, 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*, Vol 74(2), p 320-324.

Bayer, E., and Butter, K. (2000). Guide de la flore méditerranéenne p. 280.

Boizot N, Charpentier J. P., (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA. P 79-82.

Benzie et Strain ., (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*. vol 239:p 70-76.

Bahorun, T. (1997). Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle, *Journal of Food and Agricultural Research*, p 83 -94

Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. In: *Technique et Documentation* Lavoisier, Paris, p. 418-419.

Bilušić Vundać, V., Brantner, A. H., & Plazibat, M. (2007). Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chemistry*, vol 104(3), p1277– 1281. doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.036 .

Baba Ouyoyba. F. (2017), Evaluation des activités biologiques des différents extraits de *Zizyphus lotus* récoltée dans la région de Ghardaïa.

Beddou, F., Bekhechi, C., Ksouri, R., Sari, D. C., & Bekkara, F. A. (2015). Potential assessment of *Rumex vesicarius* L. as a source of natural antioxidants and bioactive compounds. *Journal of food science and technology*, vol 52(6), p3549-3560.

Bougandoura, N. et Bendimerad, N., 2013. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Saturejacalaminthasp. Nepeta* (L.) Briq."Nature et Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques .9: p14 -19.

Benzie et Strain.,(1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*. Vol 239:p 70-76.

Boubekri, C., (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanummelongenapar* des techniques électrochimiques. Thèse présentée en vue del'obtention Du diplôme de Doctorat en sciences Spécialité Chimie. Université Mohamed Khider – Biskra-alger.

Benzie, I. and Strain, J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power: The FRAP Assay". *Analytical Biochemistry*, vol 239, p70-76. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Blank, M., Weinschenk, T., Priemer, M., & Schluesener, H. (2001). Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels: selective targeting of endothelial regulatory protein pigen. *Journal of Biological Chemistry*, vol 276(19), p16464- 16468.

Bruneton, J. (2009) Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes Médicinales. Lavoisier 4e éd, revue et augmentée, Tec & Dac-Editions médicinales internationales, Paris, 1288 p.

C

Chouaibi M, Mahfoudhi N, Rezig L, Donsi F, Ferraria G, Hamdi S., 2012.- Nutritional composition of *Zizyphus lotus* L. seeds. *J Sci Food Agric* ,Vol 92: p1171–1177.

Charifi H, Dardar A., (2016). L'étude de l'activité biologique in vitro et in vivo des extraits polaires des feuilles du *Zizyphus lotus* L, Mémoire De Master, Université MentouriConstantine. pp 102.

Congo M. (2012). Etude des propriétés antiradicalaire et antiproliferative d'extraits de feuilles et de rameaux de *Salvadora Persica* L. (Salvadoraceae).Thèse de pharmacie. Université d'Ouagadougou Burkina Faso, p 42.

Chabrier Jean-Yves. (2010). Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat. UHP-Université Henri Poincaré. p184.

Conforti, F., Statti, G. A., & Menichini, F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry*, vol 102(4), p1096–1104.

Chopra IC, Abrol BK, Handa KL (1960) With particular reference to the pharmacological aspects. In: *Medicinal Plants of the Arid Zones*, Chopra IC, Abrol BK, Handa L, Paris R, Dillemann G (eds.) UNESCO Publications, Paris, pp.11–54.

Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., & Larondelle, Y.(2007). Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology*, vol. 55, no 2, p. 217-225

D

Dahanukar, S. A., Kulkarni, R. A., & Rege, N. N. (2000). Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian journal of pharmacology*, Vol 32(4), S81-S118.

Daumas, E., et De Chancel A., (1884). Le grand désert, N. Chaix, 414p.

Djemai zoughlache. S, (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. mémoire de magister en biologie. Université -el hadj lakhder –batna. P23.

DJERIDANE, A., BRUNEL, J., VIDAL, N., YOUSFI, M., AJANDOUZ , E., & STOCKER , P. (2008). Inhibition of porcine liver carboxylesterase by a new flavone glucoside isolated from *Deverra scoparia*. *Chemico-biological interactions*, 172(1), 22-26.

Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., & Stocker , P. (2010). RETRACTED: Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants.

E

Elaloui, M., Laamouri, A., Albouchi, A., Cerny, M., Mathieu, C., Vilarem, G., & Hasnaoui, B. (2014). Chemical compositions of the tunisian *Zizyphus jujuba* oil. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, p 602-608.

El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science & Technology*, vol 44(12), p2512–2518.

Evans. W.C., (2006). *Pharmacognosy*, V.C Saunders, 585 pp.

F

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2012).

Fekih, N., (2009). Contribution a l'étude chimique de *zizyphus lotus* L. Mémoire de magister chimie. Universitaire Abou Baker Belkaid Tlemcen. 57p.

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 p.

G

Goudable J., Favier A. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutrition Clinique et Métabolisme. 1997 ;11: 115-20.

Gravot A., (2009). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Support de cours sur le métabolisme secondaire d'Antoine Gravot, Equipe pédagogique Physiologie Végétale. Université de Rennes.

Gausсен H., Leroy H. F., 1982.- Précis de botanique, végétaux supérieurs, 2ème Ed. Masson. Paris. pp 426.

Ghalem M., 2014.- Effets antioxydants et anti inflammatoires des extraits de Zizyphus lotus et Anthyllis vulneraria. Thèse De Doctorat. Université ABOU BEKR BELKAID-Tlemcen. pp 160.

Ghazghazi, H., Aouadhi, C., Riahi, L., Maaroufi, A., & Hasnaoui, B. (2014). Fatty acids composition of Tunisian Zizyphus lotus L.(Desf.) fruits and variation in biological activities between leaf and fruit extracts. *Natural product research*, 28(14), 1106-1110.

Gorai, M., Maraghni, M., & Neffati, M. (2010). Relationship between phenological traits and water potential patterns of the wild jujube Zizyphus lotus (L.) Lam. in southern Tunisia. *Plant Ecology & Diversity*, 3(3), 273-280.

GHAZGHAZIA, H., AOUADHIB, C., RIAHIC, L., MAAROUFIB , A. & HASNAOUIA, B. 2014. Fatty acids composition of Tunisian Zizyphus lotus L. (Desf.) fruits and variation in biological activities between leaf and fruit extracts. *Natural Product Research*, 28, 1106–1110.

GHALEM, M., MERGHACHE, S., et BELARBI, M. (2014). Study on the antioxidant activities of root extracts of Zizyphus lotus from the western region of Algeria. *Pharmacognosy Journal*, 6(4), 32–42. doi:10.5530/pj.2014.4.5

H

Hadi M. (2004). La quercétine et ses derives: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I.155p

Hammi, K. M. A. Jdey, C. Abdelly, H. Majdoub, and R. Ksouri, “Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian Zizyphus lotus fruits using response surface methodology,” *Food Chemistry*, vol. 184, pp. 80–89, 2015.

Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British J of pharmacol.*2004; 142: 31-32.

Huet, O., & Duranteau, J. (2008). Dysfonction endothéliale: rôle des radicaux libres. *Réanimation*, 17(4), 387-392.

I

Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287.

J

Jovanovic, SV, Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic, MG (1994). Les flavonoïdes comme antioxydants. *Journal de l'American Chemical Society*, 116 (11), 4846-4851.

K

Kaanin, G. et Harfi, L. (2012).Extraction et caractérisation physico-chimique et biologique del'huile du noyau de datte : essai d'incorporation dans unemargarine de table,Mémoire d'ingénieur d'état, Université Abderrahmane MIRA de Béjaia-Alger.

Kanatt, S., Arjun, K. et Arun, S. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of legume hulls.*Food Research International* 44: 3182–3187.

Khenfer, S et Medjouel, M., 2016. Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques d'une plante médicinale de la région sud du Sahara Algérien.DiplômeMasterAcademique. UniversiteKasdiMerbah Ouargla-Alger

Kholkhal F. (2014). Etude Photochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid.

Kroyer, G. T. (2004). Red clover extract as antioxidant active and functional food ingredient. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(1), 101-105.

Koppenol WH. (2001). The Haber-Weiss cycle, 70 years later. *Redox Rep*; 6:229–34. -
2GUTTERIDGE, J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence, *Free Radic Res Commun*, 19:141-158.

Khenfer, S., & Medjouel, M. (2016). Optimisation des condit ions d'extraction des composés phénoliques d'une plante médicinale de la région sud du Sahara Algérien. Mém. Master Académique. Université KASDI MERBAH OUARGLA. 73p.

Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2010) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*. In press.

Krief S., 2003.- Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (*pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse De Doctorat. Muséum national d'histoire naturelle. pp 364.

L

Laamouri A, Ammari Y, Albouchi A, Sghaier T, Mguis K, Akrimi N., 2008.- Etude comparative de la croissance et du développement du système racinaire de trois espèces de jujubier en Tunisie. *J. Geo-Eco-Trop.* 32 : 37-46.

Lullmann H, Mohr K, Ziegler A, 1998.- Atlas de poche de pharmacologie, 2ème éd, Médecine-Sciences Flammarion. Paris. pp 375.

Lutge U., Kluge M., Bauer G. (2002). Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 211p.

Li, H., Cheng, K.W., Wong C., Fan K.W., Chen, F. and Jiang, Y. (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food chemistry, 102 ; 771-776.

Li, J., Jiang, Y. (2007) Litchi Flavonoids: Isolation, Identification and Biological Activity. Molecules. 12: 745-758.

Lacheheb Y., 2010 : Contribution à l'étude des moineaux (Passer domesticus x P. hispaniolensis) : leurs hybrides et leurs dégâts à Chabkat M'Zab (Ghardaïa). Mémoire. Ing. sci.agro.Univ. Kasdi Merbah .Ouargla .p144.

LAOINI , S. E. (2014). Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de des feuilles de Phoenix dactylifera L dans la région du Sud d'Algérie (la région d'Oued Souf) (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).

Lenucci M. S, Cadinu D, Taurino M, Piro G, Dalessandro G., 2006.- Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. J Agric Food Chem. 54:2606-2613.

Lamaison, J.L.C. and Carnet, A. (1990) Teneurs en Principaux Flavonoides des fleurs de Crataegus Monogyna Jacq et de Crataegus Laevigata (Poiret D. C) en Fonction de la Vegetation. Pharmaceutica Acta Helvetia, 65, 315-320.

Liang, L., Xu, X. D., Zhang, X. Z., Feng, M., Peng, C., & Jiang, F. G. (2010). Prevention of filtering surgery failure by subconjunctival injection of a novel peptide hydrogel into rabbit eyes. *Biomedical Materials*, 5(4), 045008.

Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J et Lee, C.Y., 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. Food chem. 51:p 7292-

Li, J.-W L.-P. Fan, S.-D. Ding, and X.-L. Ding, "Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube," Food Chemistry, vol. 103, no. 2, pp. 454–460, 2007.

Leroy J-F. (1982). Précis de Botanique. Tome II. Les végétaux supérieurs. Edition Masson. Les Angiospermes, 201-473.

M

M. J. Laughton, B. Halliwell, P. J. Evans, J. Robin, S. Hoult., 1989, «Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolic quercetin, gossypol and myricetin», 38 (17), p:

2859-2865.

Markowicz-Bastos, D.H., Saldanha, L., Catharino, R., Sawaya, A.C.H.F; Cunha, I., Carvalho, P et Eberlin, M., 2007. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté(*Ilexparaguariensis*) and Green Tea (*Cameliasinensis*) Extracts. *Molecules*. 12: p 423-432.

Machiex J.J., Fleuriet A., and Sarni-manchado P. (2006). Composition phénolique dans la plante, structure, biosynthèse, reparation et role. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, paris, pp.390-399.

Mohammedi Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155p.

Macheix j j, Fleuriet A , jay-Allemand C. (2005).les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques).Edition techniques et documentation Lavoisier.

Maisuthisakul, P.; Pasuk, S. & Ritthiruangdej, P. (2008a). Relationship of antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 21, pp 229-240.

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

Maksimovic, Z., Malencic, D & Kovacevic, N. (2005). Polyphenol contents and antioxidant activity of Maydis stigma extracts. *Bioresource Technology* (96), 873–877.

Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E. and Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera* Article in *Food Chemistry*89(3) : 411-420.

Maiza K., Brac De La Perriere R.A. ET Hammiche V., 1993.- Pharmacopée traditionnelle saharienne : Sahara septentrional. – pp. 169-171 in : Actes du 2ème Colloque Européen d’Ethnopharmacologie & 11ème Conférence Internationale d’Ethnomédecine. Heidelberg.

Mengjun L., 2006 - Chinese jujube: botany and orticulture. *Horticultural Reviews* 32,229-298.

Médart, J. (2009). Manuel pratique de nutrition: l'alimentation préventive et curative. De Boeck Supérieur

Mohammedi, Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155 p.

Maraghni, M. Gorai, and M. Neffati, "Seed germination at different temperatures and water stress levels, and seedling emergence from different depths of *Ziziphus lotus*," South African Journal of Botany, vol. 76, no. 3, pp. 453–459, 2010.

N

Nickavar, B., Alinaghi, A., Kamalinejad, M., 2008. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. Iran J Pharm Res. 7 (3), 203–209.

Nour, A., et Dilmi, N. (2017). Utilisation des résidus végétaux secs (noyaux de *Rhamnus* d'une zone de Hodna. M'sila. Algérie) dans le domaine préservation environnemental (Doctoral dissertation, Université Mohamed Boudiaf, M'sila).

Nacz, M. and Shahidi, F. (2004) Extraction and Analysis of Phenolics in Food. Journal of Chromatography, 1054, 95-111.[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(04\)01409-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(04)01409-8).

Nithiyantham, S., Selvakumar, S & Siddhuraju, P. (2012). Total phenolic content and antioxidant activity of two different solvent extracts from raw and processed legumes, *Cicer arietinum* L And *Pisum sativum* L. Journal of Food composition and analysis (27), 52-60.

Naili M. B, Alghazeer R. O, Saleh N. A, Al-najjar A. Y., 2010.- Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Zizyphus lotus* (Rhamnaceae), Arabian Journal of Chemistry. 3: 79–84.

O

OMS. (2000). Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle.

Ozenda P. 2004. Flore et végétation des Sahara. 3ème édition, CNRS, Paris, p 662.

Ouedraogol S-J., Bayalal J., Dembe´ C., Kaborel A., Kaya B., Niang A., Some A-N., 2006 . Establishing jujube trees in sub-Saharan Africa: response of introduced and local cultivars to rock phosphate and water supply in Burkina Faso, West Africa. Agroforestry Systems,68: 69–80.

Ould El Hadj M. D., Hadj-Mahammed M., Zabeirou H., Chehma A., 2003.- Importance des plantes spontanées médicinales dans la pharmacopée traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional-Est Algérien). J. Sciences & Technologie. 20 : 73-78.

P

Paduch, R., Wójciak-Kosior, M., & Matysik, G. (2007). Investigation of biological activity of *Lamii albi flos* extracts. Journal of Ethnopharmacology, 110(1), 69–75. doi:10.1016/j.jep.2006.09.004

Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005 . Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. J. Agric. Food. Chem., 53: 4290-302

Prior, R.L., Huang, D et Ou, B., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural et Food Chemistry* .53 : p 1841-1856.

Pulido, R., Bravo, L et Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.48:p 3396-3402.

Pastre COJ. 2005. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat, Université Paul-Sabatier, Toulouse, p 116.

Pincemail, J., Meurisse, M., Limet, R., & Defraign, J. O. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaissaux, Cœur, Poumons*, 4, 1 – 7

Pincemail J. and Defraigne J. O., 2004. Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Symposium « Antioxydants et alimentation >>», Institut Danone.

Q

Quezel P., Santa S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris : C.N.R.S. p 786.

R

Ravindra GK, Achaiah G, Sastry GN (2008) Molecular modeling studies of phenoxy pyrimidinyl imidazoles as p38 kinase inhibitors using QSAR and docking. *Eur J Med Chem* 43:830–838. Doi :10.1016/j.ejmech.2007.06.009.

Raven J, Raven J. C., Court J. H. (2000). *Manual for Raven's Progressive Matrices and Vocabulary Scales. Section 3: The Standard Progressive Matrices.* Oxford, UK: Oxford University Press.

Rice-Evans C., 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 797-807.

Raven J., Raven J. C., Court J. H. (2000). *Manual for Raven's Progressive Matrices and Vocabulary Scales. Section 3: The Standard Progressive Matrices.* Oxford, UK: Oxford University Press.

Richardson J-E., Chatrou L-W., Mols J-B., Erkens H-J., Pirie M-D., 2004. Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*,

S

SALHI Imane . 2017/2018, Biochimie appliquée , Etude de l'activité biologique de la plante médicinale *Astragalus gombo* et quelques paramètres de stress oxydatif induite par le métribuzine chez des rattes de type Wistar albinos, mémoire de Master, Université Echahid Hamma Lakhdar -El Oued ; p12p14 p15.

Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, 8(3) , 121-137.

Spigno, G., Tramelli, L. and Favari, D. M. D. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81 (1): 200- 208.

Souleymane Abdoul-Azize, "Potential Benefits of Jujube (*Zizyphus Lotus* L.) Bioactive Compounds for Nutrition and Health", *Journal of Nutrition and Metabolism*, vol. 2016, ArticleID 2867470, 13 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2867470>.

Sharma, O.P. and Bhat, T.K. (2009) DPPH Antioxidant Assay Revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202-1205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.008>

Singleton, J.R.Rossi, "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid" *Am. J. Enol. Vitic*, 1965, Vol. (16), page : 144.

SALHI Imane . 2017/2018, Biochimie appliquée , Etude de l'activité biologique de la plante médicinale *Astragalus gombo* et quelques paramètres de stress oxydatif induite par le métribuzine chez des rattes de type Wistar albinos, mémoire de Master, Université Echahid Hamma Lakhdar -El Oued ; p12p14 p15.

Shahin Sharif, A., Naresh, K., Abhinav, L., Angad, S., Hallihosur, S., Abhishek, S etUtpal, B.,2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Journal of Food Research International*.41:p 1–15.

Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*130 :p 2073-2085.

T

TABUTI J.R.S., LYE K.A., DHILLION S.S. 2003 - Traditional herbal drugs of Bulamogi Uganda : plants, use and administration, *Journal of Ethnopharmacology*, 88: 19-44.

TELLI, A., 2009. Contribution à l'optimisation de l'extraction des polyphénols des dattes (variété Ghars) au cours de différents stades phénologiques et étude de leur activité Biologique. Mémoire de Magister en Biologie. universitéKasdiMerbah -Ouargla : 42-68p.

Tiffany, T., 2012. Le potentiel antioxydant de l'alimentation tel qu'estimé par le score ORAC : une comparaison des apports des personnes âgées avec démence du type Alzheimer avec ceux des témoins sans problèmes cognitifs. Mémoire l'obtention du grade. Université de Montréal-canada.

V

Veličković, D. T., Milenović, D. M., Ristić, M. S., & Veljković, V. B. (2006). Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. *Ultrasonics sonochemistry*, 13(2), 150-156.

Y

Yi Yan, Y., Liang ,Y et Zeng B., 2008. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of PericarpiumCitriReticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoids. LWT .

41: p 597-603.

Yen, J.L.,Su, N.Y et Kaiser P., 2005.The yeast ubiquitin ligase heavy metal reponse.Mol Bio Cell.16:p 18872-1882. 7295.

Yu, J., Ahmedna, M. and Goktepe, I. (2004). Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics.Food Chemistry. Pp 199–206.

Z

Zhang H , Peatman E , Liu H , Feng T , Chen L , Liu Z.(2012). Molecular characterization of three L-type lectin genes from channel catfish, *Ictalurus punctatus* and their responses to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Fish Shellfish Immunol. 2012. 32 , 598608

Zitouni A, Bahi A, Necib Y. (2015). Immunomodulatory Activity of Lectins Extracted from *Terfezia bouderei*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research 50,285-287 .