



الجمهورية الجزائرية الشعبية الديمقراطية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE



والبحث العلمي التعليم العالي وزارة  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

**Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire.**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master.**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie.**

**Filière : Sciences Biologiques.**

**Spécialité : *Biochimie/Biochimie moléculaire et santé.***

**Intitulé :**

**Étude phytochimique et biologique des extraits aqueux et  
méthanolique des écorces des racines du *Zizyphus lotus* (L).**

**Présenté et soutenu par : LAHMER Nadjat & MESSAI Soumia.**

**Le : 28-06-2017.**

**Jury d'évaluation :**

**Président : Mr. NECIB Youcef (Pr-UFM Constantine).**

**Rapporteur : Mme. DJEMAI ZOUGHLACHE Soumia (MA-UFM Constantine).**

**Examineurs : Mme. BAHY Ahlem (MA-UFM Constantine).**

***Année universitaire  
2016/2017***



## ***Remerciement***

*Avant toutes choses, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.*

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à M<sup>me</sup> DJEMAI ZOUGHLACHE Soumia, maître-assistant à l'université des Frères Mentouri Constantine pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, Sa disponibilité, ses conseils et la confiance*

*Qu'elle nous a accordé, nous ont permis de réaliser ce travail.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à M<sup>r</sup> NECIB Youcef, professeur à l'université Des Frères Mentouri Constantine d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous tenons également nos vifs remerciements à M<sup>me</sup> BAHY Ahlem, maître-assistant à l'université des Frères Mentouri Constantine pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

*Un merci très spécial à M<sup>r</sup> BENSEGUENI Abd Errahmane, professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine d'être présent parmi nous.*

*À M<sup>r</sup> ZAGHBID Nacim ET M<sup>r</sup> TOUMI Seddik.*

*À toute l'équipe ISOPHARM pour leur précieuse aide.*

*À tous nos ami(e)s.*

*À tous les étudiants de master de la promotion 2017.*

*À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la Réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*À nos chers parents*

*À la pensée de nos grands parents*

*À toute la famille LAHMER*

*À toute la famille MESSAI*

*À nos amis (e) et nos collègues*

*À tous ceux qui aiment la science et la biologie*



# Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale

1<sup>er</sup> Partie : Synthèse Bibliographique

## Chapitre I : La Phytothérapie et les Plantes Médicinales

I.1. Définition de la phytothérapie .....	1
I.2. Différents types de la phytothérapie.....	1
I.3. Les avantages de la phytothérapie .....	3
I.4. Les inconvénients et les risques de la phytothérapie .....	3
I.5. Les plantes médicinales.....	3
I.6. Efficacité des plantes entières.....	4
I.7. Modes de préparation des plantes pour la phytothérapie.....	4
I.8. Les éléments actifs des plantes.....	5

## Chapitre II : Généralité sur le *Zizyphus lotus*

II.1. Étude botanique.....	7
II.2. Description .....	8
II.3. Aire géographique.....	9
II.4. Position Systématique .....	9
II.5. Composition chimique .....	10
II.6. Activités biologiques du <i>Zizyphus lotus</i> .....	10
II.6.1. Activité antioxydante et anti-inflammatoire .....	11
II.6.2. Activité antimicrobienne et antifongique.....	11
II.6.3. Activité antidiabétique et hypoglycémique .....	11
II.6.4. Activité antidérogène et gastro protectrice .....	11
II.6.5. Activité analgésique et antispasmodique .....	12
II.6.6 Autres activités.....	12

## Chapitre III : Les composés phénoliques

III.1. Les polyphénols.....	13
III.1.1. Définition.....	13
III.1.2. Distribution.....	13
III.1.3. Classification.....	14
III.1.4. Rôle, intérêt et propriétés.....	15
III.2. Les flavonoïdes .....	16
III.2.1. Définition et structure .....	16
III.2.2. Classification.....	17
III.2.2. Activités et propriétés biologiques.....	18
III.2.2.1. Activité antioxydante.....	18
III.2.2.2. Activité anti-inflammatoire et l'effet sur le système immunitaire .....	18
III.2.2.3. Propriété antivirale et antibactérienne.....	18
III.2.2.4. Propriété anti-cancérogène.....	18
III.2.2.5. Autres activités .....	19
III.3. Les tanins .....	19
III.3.1. Définition .....	19
III.3.2. Classification.....	20
III.3.3. Propriétés biologiques .....	21

## 2<sup>ème</sup> Partie : Matériel et Méthodes d'Analyse

### Chapitre I : Étude phytochimique

I.1. Matériel.....	22
I.1.1 Matériel végétal.....	22
I.1.2. Détermination du rendement.....	22
I.2. Méthodes d'analyse.....	22
I.2.1. Extraction par macération à partir des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i> .....	22
I.2.1.1. Extrait aqueux.....	23
I.2.1.2. Extrait méthanolique.....	24
I.2.2 Analyses des extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	25
I.2.2.1. Analyse qualitative .....	25
I.2.2.1.1. Tests préliminaires .....	25

1.2.2.1.1.1. Caractérisation des composés phénoliques .....	25
1.2.2.1.1.2. Caractérisation des Flavonoïdes.....	25
1.2.2.1.1.3. Caractérisation des Tanins condensés (TCs) .....	25
1.2.2.1.1.4. Différentiation des tanins .....	26
1.2.2.1.1.5. Caractérisations des saponines .....	26
1.2.2.1.2. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM) .....	26
1.2.2.2. Analyse quantitative et dosages biochimiques .....	29
1.2.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT) par colorimétrie .....	29
1.2.2.2.2. Dosage des Flavonoïdes (FV) par le trichlorure d'aluminium.....	30
1.2.2.2.3. Dosage des tanins condensés (TCs) .....	31

## Chapitre II : Étude des Activités Biologiques

II.1. Activité antimicrobienne .....	33
II.1.1. Souches microbiennes expérimentées .....	33
II.1.2. Test antimicrobien .....	34
II.2. Activité antioxydante .....	35
II.2.1. Teste du pouvoir réducteur du fer pa la méthode de FRAP .....	35

## 3<sup>ème</sup> Partie : Résultats et Discussion

### Chapitre I : Étude phytochimique

I.1. Extraction à partir des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i> .....	37
I.1.1. Extrait aqueux et méthanolique .....	37
I.1.2. Détermination du rendement d'extraction .....	37
I.2. Analyse des deux extraits du <i>Zizyphus lotus</i> .....	38
I.2.1. Analyse qualitative.....	38
I.2.1.1. Tests préliminaires .....	38
I.2.1.2. Chromatographie analytique sur couche mince .....	40
I.2.2. Analyse quantitative et dosages biochimiques .....	43

### Chapitre II : Étude des Activités Biologiques

II.1. Activité antimicrobienne .....	48
II.1.1 Les résultats de l'extrait méthanolique .....	48
II.1.2 Les résultats de l'extrait aqueux .....	50

II.1.3 Les résultats de l'antibiotique .....	52
II.1. Activité antioxydante .....	58
II.2.1 Les résultats des deux extraits .....	58
II.2.1 Les résultats des deux standards .....	60

Conclusion et Perspectives

Références Bibliographiques

## Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante des différents extraits préparés à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus*, ces extraits ont été obtenus par macération dans deux solvants polaires : l'eau et le méthanol. Les rendements respectifs sont : 8,2794g/100g de poudre, 21,8669g/100g de poudre.

L'analyse qualitative de ces extraits par les tests préliminaires et la CCM a révélé la présence des composés phénoliques, des tanins, des flavonoïdes et des saponines dans les deux extraits, ceci est confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des composés phénoliques, des tanins, et des flavonoïdes dont les valeurs sont : pour les composés phénoliques ( $26,989 \pm 2,0168 \mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait), les tanins ( $21,9233 \pm 1,5739 \mu\text{g}$  ECT/mg d'extrait) et les flavonoïdes ( $3,2608 \pm 1,3140 \mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait) dans l'extrait méthanolique, et ( $39,9667 \pm 2,5554 \mu\text{g}$  EAG/mg d'extrait), ( $14,5105 \pm 2,755 \mu\text{g}$  ECT/mg d'extrait), ( $4,3719 \pm 0,9226 \mu\text{g}$  EQ/mg d'extrait) respectivement dans l'extrait aqueux.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits a révélé une puissante activité de l'extrait méthanolique contre *Staphylococcus aureus*, dont la zone d'inhibition la plus grande est de  $10,80 \pm 0,80 \text{mm}$ , par comparaison avec les autres souches bactériennes testées. Par contre l'extrait aqueux est révélé moins actif.

L'activité antioxydante a été établie par la méthode de FRAP *in vitro*, les résultats obtenus démontrent la présence des principes actifs antioxydants dans les deux extraits avec des proportions différentes.

**Mots clés :** *Zizyphus lotus*, composés phénoliques, flavonoïdes, tanins, activité antimicrobienne, *Staphylococcus aureus*, activité antioxydante, FRAP.



# Abstract

The Natural extracts derived from plants contain a variety of biologically active molecules. In this context, we tried to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of the various extracts prepared from the root bark of the *Zizyphus lotus*, these extracts were obtained by maceration in two polar solvents: water and methanol. The respective yields are: 8,2794g / 100g of powder, 21,8669g /100 g of powder.

The qualitative analysis of these extracts by the preliminary tests and the CCM revealed the presence of the phenolic compounds, tannins, flavonoids and saponins in the both extracts, this being confirmed by a quantitative analysis based on the determination of phenolic compounds, Tannins and flavonoids whose dosage values are: for the phenolic compounds ( $26,989 \pm 2,0168\mu\text{g EAG} / \text{mg extract}$ ), tannins ( $21,9233 \pm 1,5739\mu\text{g ECT} / \text{mg extract}$ ) and flavonoids ( $3,2608 \pm$

$1,3140\mu\text{g EQ} / \text{mg of extract}$ ) In the methanol extract, and ( $39,9667 \pm 2,5554\mu\text{g EAG} / \text{mg extract}$ ), ( $14,5105 \pm 2,755\mu\text{g ECT} / \text{mg extract}$ ), ( $4,3719 \pm 0,9226\mu\text{g EQ} / \text{mg of extract}$ ) respectively in the aqueous extract.

The evaluation of the antimicrobial activity of the various extracts revealed a potent activity of the methanol extract compared to *Staphylococcus aureus*, whose zone of inhibition is greater ( $10,80 \pm 0,80 \text{ mm}$ ) with respect to the other bacterial strains tested. On

the other hand, the aqueous extract is found to be less active.

The antioxidant activity was established by the method of FRAP *in vitro*, the results obtained demonstrate the presence of antioxidant active ingredients in the two extracts with different proportions.

**Key words:** *Zizyphus lotus*, phenolic compound, flavonoids, tannins, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus*, antioxidant activity, FRAP.



## الملخص

تقدر منطقة تثبيطها ب  $0,80 \pm 10,80$  مم , مقارنة بالسلالات البكتيرية الأخرى التي تم اختبارها. من ناحية أخرى، وجد أن المستخلص المائي أقل نشاطا.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقة فراب في المختبر، والنتائج التي تم الحصول عليها تثبت وجود المكونات النشطة المضادة للأكسدة في المستخلصين مع نسب مختلفة.

**الكلمات المفتاحية:** السدر، المركبات الفينولية، الفلافونويد، العفص، النشاط المضاد للميكروبات، المكورات العنقودية الذهبية، النشاط المضاد للأكسدة، فراب.

المستخلصات الطبيعية المشتقة من النباتات تحتوي على مجموعة متنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجيا. في هذا السياق، حاولنا تقييم النشاط المضاد للميكروبات ومضادات الأكسدة من مختلف المستخلصات التي أعدت من لحاء جذور السدر.

تم الحصول على هذه المستخلصات عن طريق الاستخلاص في مذيبين قطبيين: الماء والميثانول. عوائد كل منها هي على التوالي: 8,2794 غ / 100 غرام من مسحوق، 21,8669 غ / 100 غرام من مسحوق.

كشف التحليل النوعي لهذه المستخلصات بواسطة الاختبارات التمهيدية و الكروماتوغرافيا وجود المركبات الفينولية والعفص والفلافونويد والصابونين في المستخلصين، وهذا ما أكده التحليل الكمي الذي يستند أساسا إلى تحديد تراكيز المركبات الفينولية، العفص والفلافونويدات التي كانت بقيم: المركبات الفينولية ( $2,0168 \pm 26,989$  ميكرو غرام مكافئ الغاليك /ملغ)، العفص ( $1,5739 \pm 21,9233$  ميكرو غرام مكافئ الكاتشين/ملغ)، الفلافونويدات ( $1,3140 \pm 3,2608$  ميكرو غرام مكافئ الكارستين /ملغ)، بالنسبة للمستخلص الميثانولي، و ( $2,5554 \pm 39,9667$  ميكرو غرام مكافئ الغاليك /ملغ)، ( $2,755 \pm 1,5105$  ميكرو غرام مكافئ الكاتشين/ملغ)، ( $0,9226 \pm 4,3719$  ميكرو غرام مكافئ الكارستين /ملغ) على التوالي بالنسبة للمستخلص المائي.

أظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات المختلفة نشاطا قويا لمستخلص الميثانول مقارنة بالمكورات العنقودية الذهبية، التي



## Liste des abréviations

ABS : Absorbance

ADN : Acide désoxyribonucléique.

Ag : Acide gallique.

AGMI : Acides gras mono-insaturés.

AlCl<sub>3</sub> : trichlorure d'aluminium

AlCl<sub>3</sub> : Trichlorure d'aluminium.

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique.

Aq : Aqueux.

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

ATB : Antibiotique.

ATPase : Adénosine tris phosphatase

*B. subtilis* : *Bacillus subtilis*.

BAW: Butanol/Acide acétique/Eau.

Cat : Catéchine.

CCM: Chromatographie sur Couche Mince.

D.O : Densité Optique

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl.

*E. coli* : *Escherichia coli*.

E.Aq : extrait aqueux

E.Mét : extrait méthanolique

Epcat : Epicatéchine.

FCR : Réactif de Folin Ciocalteu.

Fe<sup>2+</sup> : Ions Ferreux.

Fe<sup>3+</sup> : Ions Ferriques.

FeCl<sub>3</sub> : Trichlorure de fer.

FRAP : Ferric Reducing-Antioxidant power.

FV : Flavonoïdes.

Gp 120 : Glycoprotein 120

HCL : Acide Chlorhydrique.

HE : Huile Essentielle.

IL2 : Interleukine 2.

K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> : Ferricyanure de Potassium.

Méch : 100g de la masse sèche de l'échantillon végétal.

Mét : Méthanolique.

Mext : La masse de l'extrait après évaporation du solvant en gramme.

MH : Muller Hinton.

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Carbonate de Sodium.

Nrg : Naringénine.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*.

PAF : Platelet Activating Factor.

PPT : Polyphénols Totaux.

Que : Quercétine.

R : Rendement en gramme.

Rf : Rapport frontal.

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*.

SD : Standard Déviation.

TCs : Tanins Condensé.

TPTZ: ferric2,4,6-tripyridyl-s-triazine.

TSA : Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja.

TSE : Solution tampon peptonée au chlorure de sodium à pH 7,0.

UFC : Unité Formant Colonies.

UV : Ultra-violet.

UV-VIS : Ultra-violet-Visible.

VIH : Virus Du SIDA.

*Z. lotus* : *Zizyphus lotus*.

µg EAG/Mg d'extrait : Microgramme d'équivalent acide gallique par milligramme d'extrait.

µg ECT/Mg d'extrait : Microgramme d'équivalent catéchine par milligramme d'extrait.

µg EQ/Mg d'extrait : Microgramme d'équivalent quercétine par milligramme d'extrait.

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Les composants chimiques majeurs et leur quantité dans les différents organes végétaux du <i>Zizyphus lotus</i> (Nutr Métab, 2016).....	10
Tableau 2 : Principales classes des composés phénoliques (Macheix et al., 2005 ; Daayf et Lattanzio, 2008).....	14
Tableau 3 : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM. ....	27
Tableau 4 : Quelques critères des souches bactériennes expérimentées. ....	33
Tableau 5 : La couleur et l'aspect des deux extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines de <i>Zizyphus lotus</i> . ....	37
Tableau 6 : Le rendement des deux extraits aqueux et méthanolique des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i> (g/100g de plante fraîche). ....	38
Tableau 7 : Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait aqueux du <i>Zizyphus lotus</i> . ....	38
Tableau 8 : Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait méthanolique du <i>Zizyphus lotus</i> . ....	39
Tableau 9 : Les Rapports frontaux et les couleurs après révélation physique (366nm/254nm), et chimique par l'anisaldéhyde sulfurique. ....	41
Tableau 10 : Les Rapports frontaux et les couleurs après révélation chimique et physique à 254nm par le DPPH.....	43
Tableau 11 : La teneur en composés phénoliques des deux extraits aqueux et méthanolique. ....	44
Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait méthanolique. ....	50
Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait aqueux. ....	52
Tableau 14 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (mm) obtenus par différentes concentrations dans l'antibiotique. ....	54
Tableau 15 : La réduction du fer des deux extraits. ....	58
Tableau 16 : La réduction du fer des deux standards. ....	60

## Liste des figures

Figure 1 : Image représentative de l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie [Site3].	6
Figure 2 : La plante du <i>Zizyphus lotus</i> en mars 2017 (Mila).	7
Figure 3 : la plante du <i>Zizyphus lotus</i> en mai 2017 (Mila).	7
Figure 4 : La plante du <i>Zizyphus lotus</i> en juin 2017 (Constantine).	7
Figure 5 : La plante du <i>Zizyphus lotus</i> en été [Site4].	7
Figure 6 : Image représentative du <i>Zizyphus lotus</i> (Bellakhdar et al 1991).	8
Figure 7 : Aire de répartition du <i>Zizyphus lotus</i> (L) en méditerranée (Quezel et Santa, 1962).	9
Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes (Bruneton,1999).	16
Figure 9 : Les différentes classes des flavonoïdes (Gamet-Payraastre, 1999).	17
Figure 10 : Structure d'un tanin hydrolysable (Peronny, 2005).	20
Figure 11 : Structure d'un tanin condensé (Peronny, 2005).	21
Figure 12 : Les racines du <i>Zizyphus lotus</i> (Mars 2017).	22
Figure 13 : Lyophilisateur de l'Université des Frères Mentourie Constantine1 (Mai 2017).	23
Figure 14 : Différentes étapes de préparation de l'extrait aqueux.	24
Figure 15 : Évaporateur rotatif (Avril 2017).	24
Figure 16 : Différentes étapes de préparation de l'extrait méthanolique.	25
Figure 17 : Plaque CCM dans une cuve à chromatographie (Mai 2017).	28
Figure 18 : Différentes étapes du dosage des polyphénols totaux (PPT) des deux extraits aqueux et méthanolique.	30
Figure 19 : Différentes étapes du dosage des flavonoïdes (FV) des deux extraits aqueux et méthanolique.	31
Figure 20 : Différentes étapes du dosage des tanins condensés (TCs) des deux extraits aqueux et méthanolique.	32
Figure 21 : La réaction entre la vanilline est les tanins condensés (Schofield et al., 2001).	32
Figure 22 : L'extrait aqueux après lyophilisation.	37
Figure 23 : L'extrait méthanolique après évaporation sous vide.	37
Figure 24 : Chromatographie sur couche mince des extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i> révéler sous UV à 366nm et 254nm, et par l'anisaldéhyde sulfurique (de gauche à droite : E.Aq; E.Mét; Ag; Que; Cat; Epcat; Nrg).	40
Figure 25 : Chromatographie sur couche mince des extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i> révéler par le DPPH et sous UV à 254nm (de gauche à droite E.Aq ; E.Mét).	42
Figure 26 : La teneur en polyphénols, en tanins et en flavonoïdes (g/Eq Standard/mg) dans l'extrait aqueux.	44
Figure 27 : La teneur en polyphénols, en tanins et en flavonoïdes (g/Eq Standard/mg) dans l'extrait méthanolique.	45
Figure 28 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne $\pm$ SD de deux essais).	46
Figure 29 : Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne $\pm$ SD de deux essais).	46
Figure 30 : Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne $\pm$ SD de deux essais).	47
Figure 31 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique sur <i>Staphylococcus aureus</i> .	48

Figure 32 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique sur <i>Escherichia coli</i> .....	49
Figure 33 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	49
Figure 34 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique sur <i>Bacillus subtilis</i> .....	49
Figure 35 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait aqueux sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
Figure 36 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait aqueux sur <i>Escherichia coli</i> .....	51
Figure 37 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait aqueux sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	51
Figure 38 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait aqueux sur <i>Bacillus subtilis</i> .....	51
Figure 39 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....	52
Figure 40 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique sur <i>Escherichia coli</i> .....	53
Figure 41 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53
Figure 42 : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique sur <i>Bacillus subtilis</i> .....	53
Figure 43 : Les différents diamètres d'inhibition des extraits sur les quatre souches bactériennes testés.....	54
Figure 44 : Les diamètres d'inhibition obtenues par l'extrait méthanolique contre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
Figure 45 : La différence entre les parois bactéries à Gram+ et des bactéries à Gam- [Site7].....	56
Figure 46 : L'évolution de la réduction du fer des deux extraits.....	59
Figure 47 : L'évolution de la réduction du fer des deux standards.....	60

# **Introduction Générale**

**D**epuis des milliers d'années, l'humanité a utilisée diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies (Lee, 2004). Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 81% de l'humanité a recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (World Health Organisation, 2000). Les médicaments à base de plantes sont encore largement utilisés et ont une importance considérable dans le commerce international (Cordell et Colvard, 2005).

Le continent Africain est doté d'une biodiversité immense parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. 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 un très large éventail d'activités biologiques.

Malgré la nature hétérogène du continent Africain en général et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier le *Zizyphus lotus* (jujubier sauvage), appartenant à la famille des *Rhamnacées* (Baba Aissa, 1999). Il est distribué principalement dans les régions méditerranéennes, tropicales et subtropicales du monde (Mukhtar *et al.*, 2004).

En Algérie, le jujubier est présent dans plusieurs régions arides, semi-arides et même sahariennes (Rsaissi et Bouhache, 2002 ; Lahsissene *et al.*, 2009), c'est une espèce à usages multiples : les feuilles sont broutées par les animaux, les fruits sont consommés par l'Homme, le bois sert de combustible d'excellente qualité et les fleurs sont butinées par les abeilles qui en produisent un excellent miel. Par ailleurs, les graines broyées de cette espèce sont traditionnellement utilisées pour le traitement de nombreuses maladies, ils sont antipyrétiques, toniques, antiviraux (Hseini *et al.*, 2007) et antimicrobiens (Rsaissi *et al.*, 2013). Les racines sont utilisés en décoction, comme pectorale, émolliente, sédatif, diurétique, pour les affections pulmonaires, et dans le cas d'ictères (Chehma, 2006). L'huile de fruit du jujubier est riche en AGMI, en stérols et en tocophérol (Rsaissi *et al.*, 2013).

Au cours des dernières années, la résistance aux antibiotiques chez les micro-organismes pathogènes et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse (Eloff, 1998).

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont le but principal est d'étudier les deux activités biologiques : antioxydante et antimicrobienne des deux extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines de *Zizyphus lotus*. Pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur une analyse qualitative : extraction et mise en évidence, et une autre analyse quantitative du contenu en composés phénoliques. Le second aspect est consacré à une évaluation de deux activités biologiques : activité antioxydante et antibactérienne afin de déterminer l'efficacité des molécules bioactives, cette dernière a été effectuée contre quatre souches microbiennes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Bacillus subtilis* pouvant être pathogènes pour l'homme.

# **1<sup>er</sup> Partie : Synthèse Bibliographique**

# Chapitre I : La Phytothérapie et les Plantes Médicinales

**D**epuis l'existence, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Qu'est-ce qui les a guidés à employer une plante plutôt qu'une autre ? Le hasard ? La religion ? La superstition ? L'expérience, certainement (Iserin *et al.*, 2001).

Aujourd'hui, les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins (Hans, 2007). En effet sur les 300 000 espèces végétales dénombrées sur la planète, plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des propriétés médicinales (Millogo *et al.*, 2005).

### **I.1. Définition de la Phytothérapie**

Le mot "Phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : "*phuton*" et "*therapeia*" qui désignent respectivement "plante" ou "végétale" et "traitement" et qui veut dire «**Soigner par les plantes**» (IESV, 2015/2016).

La phytothérapie est une science à la fois ancestrale et moderne (IESV, 2015/2016), qui signifie approche thérapeutique utilisant des plantes médicinales dans leur intégralité pour leurs propriétés thérapeutiques (Bach *et al.*, 2006). C'est donc une technique de soins qui utilise les plantes pour venir à bout des causes et symptômes de diverses maladies (Caroline et Michel, 2013). Elle peut se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes (Wichtel *et al.*, 2003).

La Phytothérapie compte parmi les premières et les plus anciennes méthodes curatives. C'est ainsi que les êtres humains utilisent des plantes depuis des siècles voire des millénaires à des fins thérapeutiques sur l'ensemble de notre planète (Beatrix *et al.*, 2013).

Une phytothérapie efficace repose sur la qualité de la plante utilisée : plante fraîche, plante sèche, sur son extrait, et aussi sur sa teneur et sa richesse en actifs. De plus, un produit à base de plante, doit – pour avoir une efficacité optimale – rétablir toute la complexité moléculaire qui est à l'origine de son activité thérapeutique (IESV, 2015/2016).

### **I.2. Différents types de la Phytothérapie**

Tout d'abord se place la phytothérapie traditionnelle. C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une infection qui se base sur l'utilisation de plantes selon les capacités découvertes expérimentalement [Site1].



Ce type de phytothérapie est encore très répandu dans de nombreux pays mais il n'est pas conventionnel car il ne repose pas, dans la plupart des cas, sur des études cliniques [Site1].

La seconde forme existante est la phytothérapie clinique, qui est une médecine de terrain dans laquelle le malade passe avant la maladie. Une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet (Moreau, 2003). Elle repose sur les avancées de la recherche, des preuves scientifiques reconnues et des extraits actifs des plantes [Site1].

Il est important de préciser que connaître une plante, c'est aussi être conscient de ses limites et de ses dangers car la phytothérapie n'est en aucun cas une technique douce. Son utilisation thérapeutique nécessite une bonne connaissance de la matière médicale (Chabrier, 2010).

Il est donc très important que la médecine traditionnelle et la médecine moderne collaborent :

- afin de permettre la validation et l'amélioration des remèdes traditionnels.
- afin de pouvoir apprendre l'une de l'autre et se compléter, en faisant évoluer la recherche (CTA, 2007).

### **Quelques termes scientifiques concernant la phytothérapie traditionnelle et moderne**

- **Aromathérapie** : C'est l'art et la science d'utiliser les essences des plantes ou les huiles essentielles qui mettent les arômes et les bienfaits des plantes au service de la santé et la beauté (Colette, 2007).
- **Gemmothérapie** : Une thérapie utilisant des bourgeons végétaux et autres tissus embryonnaires vivants sous forme buvable, dont le but est de réaliser un drainage profond de l'organisme (Halfon, 2011).
- **Herboristerie** : Correspond à la méthode de phytothérapie la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée ; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs) (Besançon, 2012).
- **Phytothérapie pharmaceutique** : Utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats...etc. (Strang, 2006 ; [Site2]).



### I.3. Les avantages de la phytothérapie

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments décroît. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs (Iserin *et al.*, 2001).

Le grand intérêt de la phytothérapie est la bonne tolérance des plantes, lorsque celles-ci sont utilisées aux bonnes posologies. Les effets secondaires, sont généralement mieux connus que pour les molécules de synthèse (Arnal-Schnebelen, 2004).

Généralement, les plantes médicinales d'usage courant ne provoquent que très peu d'effet indésirable, de plus, l'usage est simple et a domicile et l'effet recherché est pratiquement immédiat (Robert, 2010).

### I.4. Les inconvénients et les risques de la phytothérapie

Certaines plantes peuvent s'avérer dangereuses (allant jusqu'à provoquer la mort) mais elles ne seront jamais prescrites, même à de faibles doses. Parmi les risques rencontrés face à cette discipline, on peut citer :

- Surdosage ;
- Allergie ;
- Contaminations par des toxiques divers (métaux lourds, micro-organismes) ;
- Présence d'une substance allopathique dans la préparation ;
- Interaction avec d'autres plantes ou traitements en particuliers allopathique ;
- Modification des doses absorbées (Cavalier *et al.*, 2015).

### I.5. Les plantes médicinales

Une plante médicinale est une drogue végétale dont l'un des organes, possède des propriétés curatives et parfois toxiques selon son dosage. Au Moyen Âge, on parlait de "simples". Enfaite il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux (Debuigne, 1974 ; Farnsworth *et al.*, 1986). Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains (Elqaj *et al.*, 2007).



### I.6. Efficacité des plantes entières

La phytothérapie à la différence de la médecine classique, recommande d'utiliser la plante entière, appelée aussi "totum" plutôt que des extraits obtenus en laboratoire. Une plante entière est plus efficace que la somme de ses composants (Iserin *et al*, 2001).

### I.7. Modes de préparation des plantes pour la phytothérapie

Il y a plusieurs modes de préparation des plantes en phytothérapie, et cela selon l'usage que l'on veut en faire. Les modes de préparation les plus courants sont :

- **L'infusion** : Elle se fait généralement avec les fleurs et les feuilles des plantes, mais il est possible de faire infuser des racines et des écorces. On peut l'obtenir en plongeant une plante (une cuillerée à café par tasse) dans de l'eau bouillante et laissez infuser entre 10 et 20min, dans un récipient couvert. Une infusion peut se conserver au réfrigérateur pendant 48 heures maximum. En principe, il est préférable de ne pas sucrer les tisanes (Nogaret-Ehrhart, 2003).
- **La décoction** : Elle se fait en mélangeant le macérât et le solvant à température ambiante. On fait bouillir le mélange à feu doux. D'une part, on ne peut préparer de décoction lorsque la chaleur détruit les ingrédients actifs, d'autre part, la chaleur peut accentuer leurs effets (Sean et Timothy., 2005).
- **La macération** : Consiste à maintenir en contact la drogue avec un solvant à température ambiante pendant une durée de 30 minutes à 48 heures. Cette méthode permet une extraction douce des principes actifs, surtout lorsqu'ils sont thermolabiles (Chabrier, 2010)
- **Les extraits** : Communément, cela désigne la plante avec tous ses principes actifs, c'est-à-dire la plante entière de laquelle sont retirées les parties fibreuses et l'eau. Il existe plusieurs sortes d'extraits « L'extrait sec, L'extrait liquide, Les extraits standardisés, Les lyophilisats » (Caroline et Michel, 2013)
- **La poudre** : Elle s'obtient en pulvérisant une plante, soit au moulin à café, soit au mortier et au pilon. Elle peut être aisée en passant la plante au four à feu très doux pendant quelques instants (Morigane, 2007).



### I.8. Les éléments actifs des plantes

Les effets de certaines plantes sont bien connus. La camomille allemande, par exemple, est utilisée depuis des milliers d'années contre les troubles digestifs, ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme.

Les principes actifs capitaux des plantes sont :

- **Les phénols ;**
- **Les flavonoïdes ;**
- **Les tanins ;**
- **Les huiles essentielles :** Ce sont des mélanges complexes de substances chimiques naturelles, volatiles et odorantes contenues dans une plante aromatique, usuellement extraites par hydrodistillation ou bien par expression. Elles sont volatiles car elles sont uniquement constituées de molécules de très faible masse moléculaire. Elles sont solubles dans des solvants organiques tels que l'alcool et les huiles végétales ou minérales. Les HE sont utilisés en parfumerie, en cosmétique, en phytothérapie, en aromathérapie...etc. (Khodjet El Khil, 2015).
- **Les alcaloïdes :** Des substances azotées d'origine végétale, à réactions alcalines (Alcaloïde + Acide → Sels), ils renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et de l'azote, et le plus souvent de l'oxygène, et rarement du soufre. Les alcaloïdes sont des produits aminés naturels qui ont des effets physiologiques sur l'organisme humain (Badiaga, 2011).
- **Les anthocyanes :** Constituent le groupe de pigments solubles dans l'eau le plus important. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ils sont dissous dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs et des tissus auxquels ils donnent des couleurs rose, rouge, bleu et violet (Mazza *et al.*, 1993).
- **Les coumarines :** Elles sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique. Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques dans lesquels ils sont extractibles. Elles ont un spectre UV caractéristique. Les coumarines présentent des effets cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices... etc. (González-Gallego *et al.*, 2007).
- **Les vitamines :** Des substances organiques, qui sont nécessaires à l'organisme et que l'homme ne peut synthétiser. Elles doivent être fournies par l'alimentation. Il s'agit d'un



groupe de molécules chimiquement très hétérogènes. Certaines d'entre elles ont des structures proches de celles d'autres composés organiques (Les vitamines, 2010/2011).

- **Les minéraux** : De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux. Les plantes, notamment celles issues de l'agriculture biologique, tirent les minéraux du sol et les transforment en une structure aisément assimilable par l'organisme. Dans de nombreux cas, les minéraux contenus dans une plante, participent activement à son activité thérapeutique dans l'organisme (Iserin *et al*, 2001).



**Figure 1** : Image représentative de l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie (<http://www.cosmopolitan.fr/lutter-contre-les-douleurs-articulaires-avec-la-phytotherapie,1905201.asp>.)



## Chapitre II : Généralités sur le

*Zizyphus lotus*

## II.1. Étude botanique

En 1784, Desfontaines découvrait le jujubier aux abords du désert en Tunisie, et il a été nommé par Linné *Rhamnus lotus* (Aug chevalier, 1939), par contre d'après Bonnet (2001) le mot « *Zizyphus* » vient du grec « *Zizyphos* » mais le mot n'apparaît qu'au deuxième siècle, et qui vient du nom arabe « *Zizouf* ».

*Zizyphus lotus* (L), en Algérie et en Tunisie, est connu sous le nom de « *Sedra* » ou « *N'beg* » appeler aussi Jujubier de la berbère ou jujubier sauvage dans la langue française (Benammar *et al.*, 2010). Cette plante appartient à la famille des *Rhamnacées*, elle comprend environ 900 espèces, auprès de 58 genres dans les régions tropicales et subtropicales (Baba Aissa, 1999).

Les espèces de la plante ont plusieurs caractéristiques physiologiques et morphologiques qui peuvent contribuer à leurs capacités à s'adapter aux environnements arides. Ils poussent sur les rives sud de la méditerranée jusqu'en Afghanistan (Baba Aissa, 1999).

*Zizyphus lotus* (L) est réputée en médecine traditionnelle algérienne vu sa richesse en molécules ayant des activités biologiques variées.



**Figure 2:** La plante du *Zizyphus lotus* en mars 2017 (Mila).



**Figure 3:** la plante du *Zizyphus lotus* en mai 2017 (Mila).



**Figure 4 :** La plante du *Zizyphus lotus* en juin 2017 (Constantine).



**Figure 5 :** La plante du *Zizyphus lotus* en été [Site4].



## II.2. Description

C'est un arbrisseau sous forme de buisson à rameaux flexueux ne dépassant pas 2,5 m de hauteur, il est très épineux de couleur gris blanc poussant en zigzag (Claudine, 2007).

Les feuilles sont petites, courtes, et ovales plus au moins elliptiques de 1 à 2 cm de longueurs et de 7 mm de largeur (Bayer et Butter, 2000), 3/2 à 2 fois plus longues que larges, à marges entières ou finement sinuées (Ben Ziane et Yousfi, 2001). Elles sont lisses et brillantes sur les deux faces, et présentent trois nervures longitudinales saillantes partant du pétiole (Baba Aissa, 1999).

Les fleurs du *Zizyphus lotus* (L) 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 ; Claudine, 2007).

Le fruit est ovoïde-olong, ayant la forme et la grosseur d'une belle olive, d'abord vert puis jaune, il devient rouge foncé quand il est mûr, en octobre (Bayer et Butter, 2000). Le fruit du jujubier est légèrement sucré [Site5].



**Figure 6** : Image représentative du *Zizyphus lotus* (Bellakhdar *et al* 1991).



### II.3. Aire géographique

L'arbuste vit dans les steppes subméditerranéennes comprises entre la mer et le Sahara (Aug chevalier, 1947), tout au long de l'Algérie, la Tunisie, la Libye, le Maroc, et les pays de l'Europe du Sud comme l'Espagne, la Sicile, la Grèce et Chypre (Benammar *et al.*, 2010).

*Zizyphus lotus* (L) est très répandu dans les régions arides d'Algérie du Sud, Ain Ouessara et Maessad (willaya de Djelfa) à climat aride, Taghit (wilaya de Bechar) au climat saharien (Saadoudi, 2008), et aussi à Constantine (Aïn Smara).

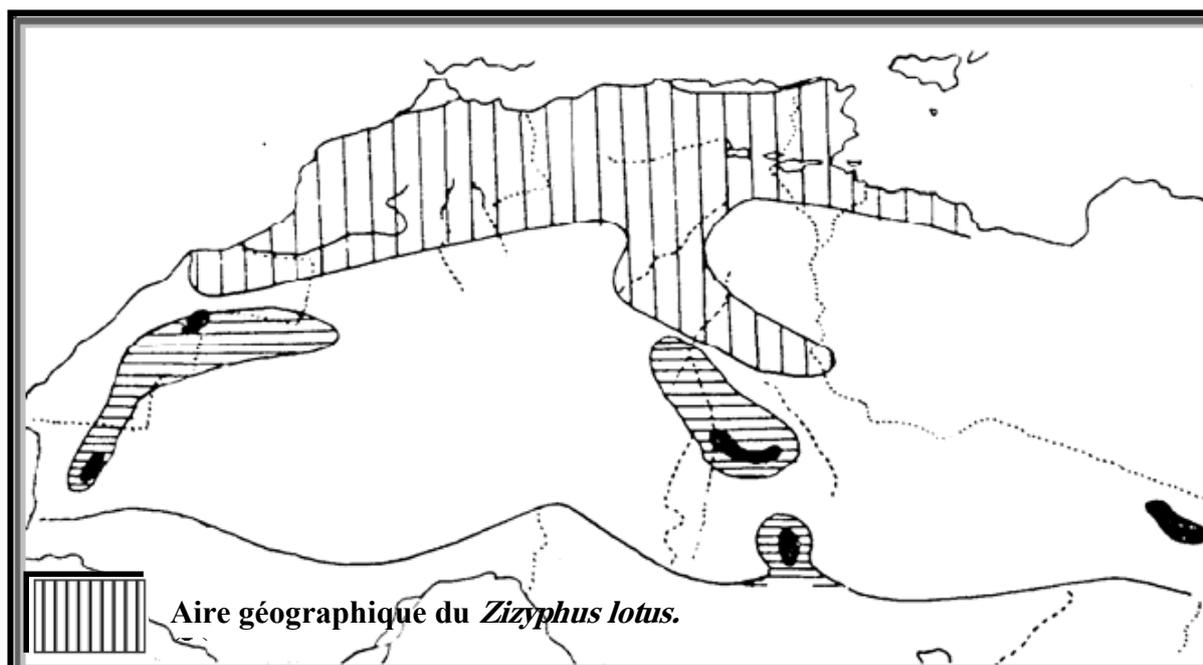


Figure 7: Aire de répartition du *Zizyphus lotus* (L) en méditerranée (Quezel et Santa, 1962).

### II.4. Position Systématique

Règne :	<i>Végétale.</i>
Embranchement :	<i>Spermatophytes.</i>
Sous embranchement :	<i>Angiospermes.</i>
Sous classe :	<i>Dicotylédone.</i>
Ordre :	<i>Celastrale.</i>
Famille :	<i>Rhamnacées.</i>
Genre :	<i>Zizyphus.</i>
Espèce :	<i>Zizyphus lotus</i> (L) (Quezel et Santa, 1962).



## II.5. Composition chimique

La composition chimique de la plante se présente dans le tableau si dessous :

**Tableau 1:** Les composants chimiques majeurs et leur quantité dans les différents organes végétaux du *Zizyphus lotus* (Nutr Métab, 2016).

Organe végétale	Composés majeurs	Quantité
Fruits	Polyphénols totaux	297 - 4078,2mg/100g
	Flavonoïdes	122mg/100g
	Tanins	33mg/100g
Feuilles	Glucides (monosaccharides)	8720mg/100g
	Saponines	340mg/100g
	Flavonoïdes	130 - 199mg/100g
	Polyphénols totaux	664mg/100g
	Rutine	3,66mg/100g
Graines	Flavonols glycosides	3,00mg/100g
	Lipides	29730mg/100g
	Protéines	14220mg/100g
	Glucides	4087 - 4720mg/100g
	Suce soluble	4100mg/100g
Écorces des racines	Polyphénols totaux	14,68mg/100g
	Polyphénols totaux	109mg/100g
	Saponines (lotuside I et II, lotusine A-G)	219mg/100g
	Proanthocyanidine	156mg/100g
Pulpes	Flavonoïdes	87mg/100g
	Sucre soluble	10500mg/100g
	Minéraux	3200mg/100g
	Protéines	1180mg/100g
	Tanins	922mg/100g
	Polyphénols totaux	325mg/100g
	Flavonoïdes	173mg/100g

## II.6. Activités biologiques du *Zizyphus lotus*

Cette plante est riche en polyphénols, alcaloïdes cyclopeptides, saponines de dammarane, vitamines, minéraux, acides aminés et acides gras polyinsaturés (Abdoul-Azize, 2013), donc les propriétés médicinales de cette plante dépendent de la teneur et la répartition de ces composés dans les différents organes de la plante (Benammar *et al.*, 2014).



Plusieurs parties du *Z. lotus* (L) sont administrées en tant qu'agents anti-infections urinaire, cutanées, antiviraux, antidiarrhéique, agents d'insomnie (Anand *et al.*, 1989 ; Adzu *et al.*, 2003), contraceptif, antimicrobien (Yoon *et al.*, 2010), médicament, stimulant de l'immunité (Benammar *et al.*, 2010), antidiabétique (Ambasta, 1986), hypoglycémiant (Glombitza *et al.*, 1994), sédatif et hypnotique (Tschesche, 1975 ; Anand *et al.*, 1989), analgésique (Borgi *et al.*, 2007 ; Borgi *et al.*, 2008) et une activité d'agglutination (Ahmad *et al.*, 2011).

### **II.6.1. Activité antioxydante et anti-inflammatoire**

*Z. lotus* (L) est riche en composés antioxydants tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes, ces composants préviennent le stress oxydatif et l'inflammation (Mothana, 2011). Les recherches réalisées par Benammar et ses collègues en 2010 et en 2014 confirment la richesse de la plante en vitamines (A, C et E), qui présentent des propriétés antioxydantes *in vitro*. D'autres travaux mentionnent que l'acide oléique des fruits du jujubier est responsable des propriétés antioxydantes (Ochoa *et al.*, 2002).

### **II.6.2. Activité antimicrobienne et antifongique**

Des études *in vitro* ont clarifié les effets des extraits du *Z. lotus* (L) sur la croissance de plusieurs espèces de bactéries et de champignons, ils ont démontré que les extraits des fruits, dans des solvants étheriques et méthanoliques, présentaient les effets les plus bactéricides pour induire une inhibition de la croissance microbienne (Rsaissi *et al.*, 2013 ; Ghazghazi *et al.*, 2014). Ces activités antimicrobiennes semblent être médiées par la teneur en composés phénoliques, c'est-à-dire en molécules bioactives (Aziz *et al.*, 1998).

### **II.6.3. Activité antidiabétique et hypoglycémique**

Les effets hypoglycémiant du *Z. lotus* (L) indiquent que les extraits aqueux des racines présentent des activités plus efficaces par rapport aux feuilles (Benammar *et al.*, 2014). Il a été rapporté que la sensibilité à l'insuline était améliorée par la vitamine A grâce l'activation du récepteur de l'insuline et de la protéine tyrosine phosphatase 1B (Jeyakumar *et al.*, 2011).

### **II.6.4. Activité antidérogène et gastro protectrice**

Dans de nombreuses études *in vivo*, les effets protecteurs des extraits aqueux du *Z. lotus* (L) (écorces des racines, feuilles et fruits) administrés par voie orale ont été observés dans les lésions de plusieurs modèles ulcérogènes chez le rat Wistar (B. Wahida *et al.*, 2007 ; Bakhtaoui *et al.*, 2014).



Ces rapports suggèrent que les extraits de cette plante agissent comme agents antiulcéreux en réduisant l'acidité gastrique et la sécrétion du jus (Abdoul-Azize, 2013)

### **II.6.5. Activité analgésique et antispasmodique**

Des études *in vivo* réalisés sur le duodénum du rat isolé, montrent que l'extrait aqueux des feuilles du *Z. lotus* (L) et des écorces des racines exerce des activités antispasmodiques en modulant la signalisation  $Ca^{2+}$  via des récepteurs cholinergiques (Borgi *et al.*, 2009).

### **II.6.6 Autres activités**

Cette plante est aussi employée dans le domaine de la nutrition, la santé et la cosmétologie sous plusieurs formes (Abdoul-Azize, 2013).

Certains extraits du jujubier exercent des propriétés immunes modulatrices sur l'activation des cellules T humaines IL2, et aussi l'expression de l'ARNm (Abdoul-Azize, 2013 ; Benammar *et al.*, 2014).

Ils ont aussi des effets anticancéreux (résistance au cancer du sein et cancer du côlon) et modulent la rétention intestinale de plusieurs substances toxiques pour l'alimentation vue sa richesse en acides gras polyinsaturé (l'acide oléique et l'acide linoléique) (Soel *et al.*, 2007 ; Aspenström-Fagerlund *et al.*, 2015).



# **Chapitre III : Les Composés Phénoliques**

### III.1. Les polyphénols

#### III.1.1. Définition

Les polyphénols sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire (Walton et Brown, 1999) ayant toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 atomes de carbones (cycles benzéniques) portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Hennebelle *et al.*, 2004). Ils constituent un groupe de substances variées et ubiquistes (Marouf, 2000 ; Hopkins, 2003 ; Georgé *et al.*, 2005) et correspondent à une très large gamme de structures chimiques (Ferguson, 2001).

Les polyphénols constituent une famille importante de métabolites secondaires du règne végétal (Akowah *et al.*, 2004). À l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolés et identifiées (Mompon *et al.*, 1998).

Ils sont divisés en plusieurs catégories :

- Les acides phénoliques.
- Les flavonoïdes.
- Les tanins condensé et hydrolysables (SFA, 2005).

#### III.1.2. Distribution

En phytochimie les polyphénols sont les dérivés des acides benzoïques et cinnamiques (Belyagoubi, 2011). On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits (racines, tiges, bois et dans les cellules épidermiques des feuilles) (Marfak, 2003 ; Hadi, 2004).

La couleur et l'arôme, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ces composés représentent 2 à 3% de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% (Walton et Brown, 1999).

- ✚ À l'échelle cellulaire, ils s'accumulent principalement dans deux sites : la paroi cellulaire et la vacuole.
- ✚ À l'échelle tissulaire, une repartions très inégales des différents composés phénoliques. Ainsi les anthocyanes et les flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes : épidermes des fruits et des feuilles (Sarni et Cheynier, 2006).



### III.1.3. Classification

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes, qui se différencient par la complexité du squelette de base, le degré de modification de ce squelette et les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres (glucides, lipides, protéines...etc.) (Herbert, 1989 ; Beta *et al.*, 2005 ; Macheix *et al.*, 2005).

**Tableau 2 :** Principales classes des composés phénoliques (Macheix et al., 2005 ; Daayf et Lattanzio, 2008).

Nombre de Carbone	Structure de base	Classe	Origine « exemple »
6	C6	Phénols simples. Benzoquinones.	Busseroles.
7	C6-C1	Acides phénoliques.	Épices, fraises.
8	C6-C2	Acétophénones. Acides benzoïques.	/
9	C6-C3	Acides hydroxyci- namiques. Coumarines. Polypropènes.	Pomme de terre. Pommes. Les fruits du genre <i>citrus</i> .
10	C6-C4	Naphtoquinones.	Noix.
13	C6-C1-C6	Xanthonnes.	Racines de <i>Gen- tiane</i> . <i>Centauree</i> .
14	C6-C2-C6	Stilbénes et anthra- quinones.	Vignes.
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes. Isoflavonoïdes.	Fruit et légume. Soja et pois.
18	(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanes Néolignana	Pin.



30	(C6-C3-C2) <sub>2</sub>	Biflavonoïdes.	<i>Carcinia hyperic.</i>
N	(C6-C3) <sub>n</sub> (C6) <sub>n</sub> (C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Lignines. Catéchols. Tanins condensés.	Bois. Noyaux des fruits. Raisins rouges.

#### III.1.4. Rôle, intérêt et propriétés

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu, au cours l'évolution de la vie des plantes, dans l'utilisation de l'Homme des végétaux (Maury et Legrand 2000 ; Macheix *et al.*, 2005). Les techniques modernes d'isolement des molécules et d'exploration médicale, montrent que ces dernières ont beaucoup de propriétés thérapeutiques :

- ❖ La pigmentation, la signalisation et la protection contre des agents biotiques et abiotiques (Brouillard *et al.*, 1997 ; Maury et Legrand, 2000 ; Macheix *et al.*, 2005 ; Stalikas, 2007).
- ❖ Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, floraison et tubérisation (Nitsch et Nitsch, 1961 ; Misirli *et al.*, 2001).
- ❖ Ils exercent un effet majeur sur les caractères organoleptiques des produits (Sarni et Cheyner, 2006).
- ❖ Ils diminuent la perméabilité des vaisseaux capillaires en renforçant leur résistance (Nissiotis et Tasioula-Margari, 2002 ; Lahouel, 2004).
- ❖ Ils ont une propriété anti-cancéreuse (Li *et al.*, 2008), antiulcéreuses (Martin *et al.*, 2007), anti-inflammatoire (Nowakowska, 2007), analgésiques (Borsato *et al.*, 2000).
- ❖ Ils sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (Bruneton, 1999).

#### ✚ L'activité antioxydante des polyphénols

Les propriétés antioxydantes des polyphénols participent à la prévention de diverses pathologies impliquant le stress oxydant, le vieillissement cellulaire, et les maladies cardiovasculaires ou dégénérative (Wang et Mazza, 2002 ; Macheix *et al.*, 2005 ; Sarni *et al.*, 2006).

Les antioxydants naturels comme les composés phénoliques, et particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes peuvent empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant plus rapidement que ce dernier.



Un tel effet résulte d'une structure de donneur d'atome d'hydrogène ou d'électron souvent aromatiques (Vansant, 2004).

### III.2. Les flavonoïdes

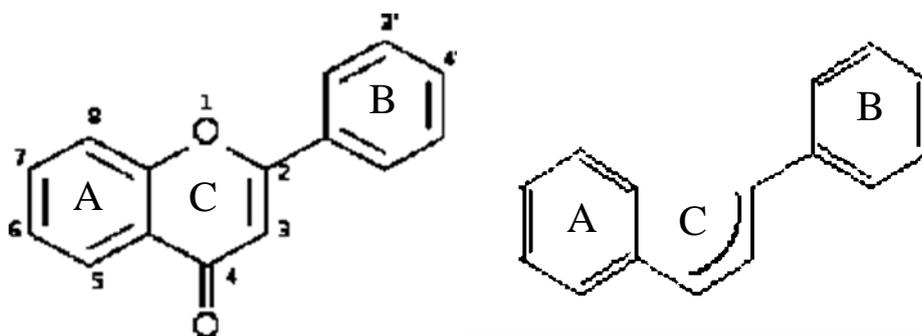
#### III.2.1. Définition et structure

Le nom flavonoïde proviendrait du terme « flavedo », désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du « flavus » qui signifie jaune (Karaali *et al.*, 2004).

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques (Yao *et al.*, 2004), qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Rice-Evans et Packer, 1998).

Ces molécules ont toutes le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés selon une configuration C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, (Yao *et al.*, 2004), caractérisée par un enchaînement de deux noyaux aromatiques A et B liés à une unité de trois carbones (C) avec une grande diversité structurale (Walsh, 2003 ; Erdman *et al.*, 2007 ; Alothmane *et al.*, 2009), elles sont considérées comme des pigments jaunes quasi universels des végétaux.

Actuellement, environ 4000 composés flavoniques sont connus (Marouf, 2000 ; Edenharder et Grünhage, 2003 ; Alothmane *et al.*, 2009).



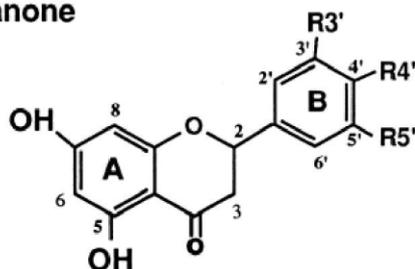
Dans la nature, les flavonoïdes sont généralement glycosylés, les sucres ainsi que les groupes hydroxyles augmentent leur solubilité dans l'eau, d'autres substitutions tels que les méthyles et les isopentyles, rendent les flavonoïdes lipophiles (Crozier *et al.*, 2006).



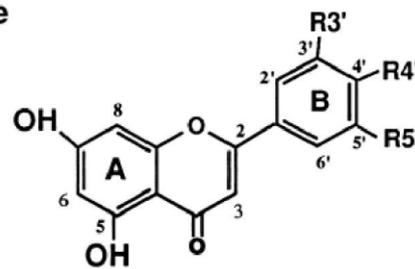
### III.2.2. Classification

Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes, qui sont déterminées par l'état d'oxydation de l'unité de liaison (C), et la position du noyau benzénique (B) (Brutneton, 1993 ; Narayana *et al.*, 2001), tandis que les composés de la même classe sont déterminés par le point d'hydroxylation, ou d'autre substitution du noyau A ou B (OH, OCH<sub>3</sub> et/ou glycosyl) (Verpoorte et Alfermann, 2000 ; Havsteen, 2002 ; Edenharter et Grünhage, 2003).

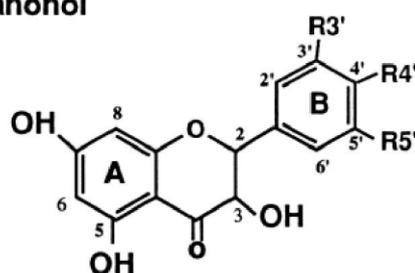
flavanone



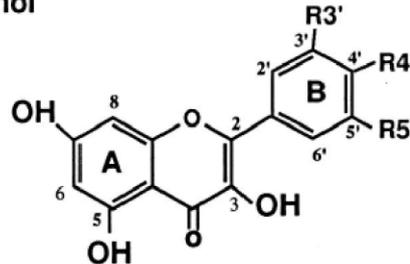
flavone



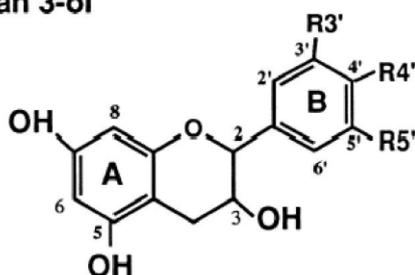
flavanonol



flavonol



flavan 3-ol



isoflavone

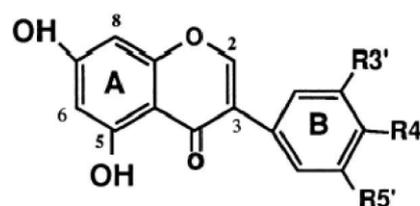


Figure 9 : Les différentes classes des flavonoïdes (Gamet-Payrastré, 1999).



### III.2.2. Activités et propriétés biologiques

#### III.2.2.1. Activité antioxydante

Plusieurs études ont souligné que les flavonoïdes de différentes sources botaniques agissent comme puissants antioxydants encore plus que la vitamine C (Alothmane *et al.*, 2009), ces composés peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes (Hodek *et al.*, 2002), soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires, soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres comme la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Dicarlo *et al.*, 1999 ; Sarni et Cheynier, 2006).

#### III.2.2.2. Activité anti-inflammatoire et l'effet sur le système immunitaire

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (Huck *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2008), et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Raffaelli *et al.*, 1997). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Loo *et al.*, 1989 ; Waridel *et al.*, 2001). Certains d'entre eux comme : la quercétine, la myricétine, l'apigénine et la chrysin ont des effets anti-inflammatoires par l'action inhibitrice des enzymes responsables du métabolisme de l'acide arachidonique (Tringali, 2001), tout en inhibant la lipooxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase (Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004).

#### III.2.2.3. Propriété antivirale et antibactérienne

Les flavonoïdes se sont montrés comme de bons inhibiteurs de la « transcriptase reverse ». Cependant, leur impact semble plus fort sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte que sur la transcriptase reverse virale (Langewald et Schmutterer, 1992 ; Wilps *et al.*, 1992).

Autres chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du VIH (la Gp 120), empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Tail, 1998).



### III.2.2.4. Propriété anti-cancérogène

Des études mettent en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs des tumeurs (Kato *et al.*, 1983). L'action antitumorale de la quercétine par exemple pourrait s'expliquer par son interaction avec le complexe calcium-calmoduline, qui jouerait aussi un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux promoteurs de tumeur (Nishino *et al.*, 1996).

Les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en intermédiaires mutagènes (Obermeier *et al.*, 1995).

### III.2.2.5. Autres activités

Les flavonoïdes jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (en inhibant l'aldose réductase), de la goutte (en inhibant la xanthine oxydase), de l'hypertension (la quercétine), des thromboses (les flavonols) et des allergies (Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004).

L'effet antiallergique sur la production de l'histamine, par l'inhibition des enzymes (l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Calcium-dépendante) responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles (Tringali, 2001).

D'autres comme la rutine et le kaempférol ont montré une action inhibitrice sur le PAF (Platelet Activating Factor), qui est un agent ulcérogène potentiel (Tringali, 2001).

La Tangéretine, la Rutine et l'hespéridine augmentent la résistance des vaisseaux sanguins et agissent sur la fluidité du sang (Oakes *et al.*, 2001).

## III.3. Les tanins

### III.3.1. Définition

Le mot Tanin est un terme provenant d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour tanner les peaux d'animaux (Hopkins, 2003). Ce sont des métabolites hydrosolubles de masse molaire entre 500-2000D, toutes les plantes en contiennent à des degrés différents (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Bruneton, 1999).

Le rôle biologique des tanins dans la plante est lié à sa propre protection contre les affections, les insectes et les animaux herbivores (Khanbabaee et Ree, 2001), en plus de la protection contre les attaques fongiques et bactériennes.

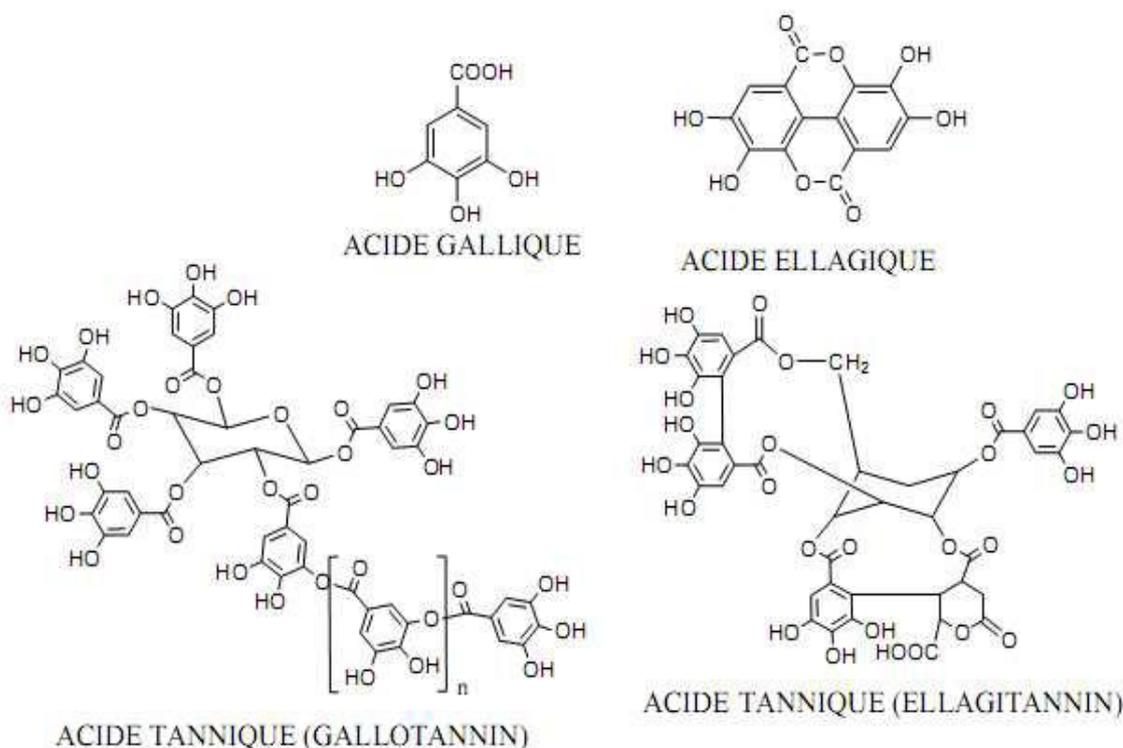


Les tanins sont présents dans une variété de plantes utilisées dans l'alimentation notamment les céréales et les légumineuses (Peronny, 2005).

### III.3.2. Classification

On distingue deux grands groupes de tanins, différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition (Haslam, 1989).

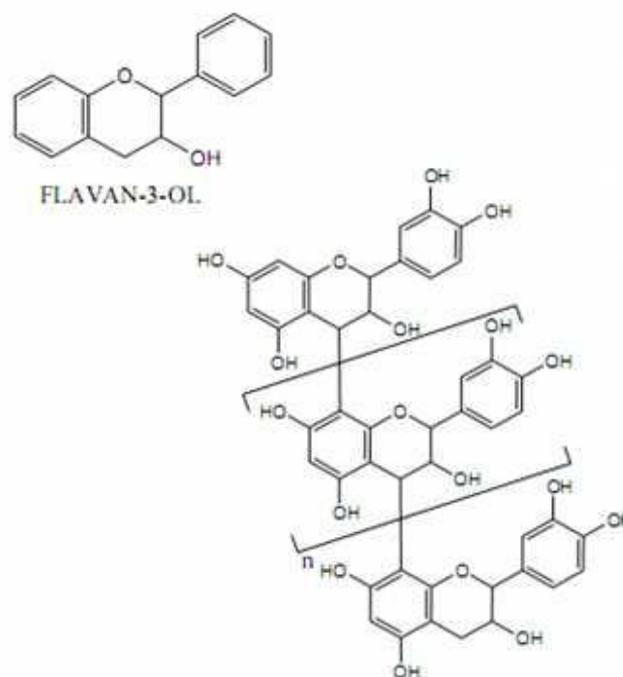
- **Les tanins hydrolysables** : ce sont des esters de glucose et d'acide gallique, caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique, ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide : l'acide ellagique (Guignard, 2000).



**Figure 10** : Structure d'un tanin hydrolysable (Peronny, 2005).

- **Les tanins condensés** : ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3ol, dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères (Awika et Rooney, 2004). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (Guignard, 2000 ; Hopkins, 2003).





**Figure 11** : Structure d'un tannin condensé (Peronny, 2005).

### III.3.3. Propriétés biologiques

Les tanins sont considérés comme des anti-nutriments grâce aux divers effets nuisibles à savoir la digestion réduite des aliments, la faible biodisponibilité des micronutriments et les dommages du foie (Chung *et al.*, 1998).

Ils sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices, cicatrisantes et anti-diarrhéiques (Hennebelle *et al.*, 2004).

Ce sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produites au cours de la peroxydation, des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Smythies, 1998).

Les tanins catéchiques ont un pouvoir antioxydant très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou tri hydroxyles sur le cycle B et les groupes méta-5,7-dihydroxyles sur le cycle A (Rahman *et al.*, 2006).

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (Smythies, 1998), permettent aussi de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Smythies, 1998 ; Bruneton, 1999).



## **2<sup>ème</sup> Partie : Matériel et Méthodes d'Analyse**

# Chapitre I : Étude Phytochimique

### I.1. Matériel

#### I.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de la partie enterrée du *Zizyphus lotus*. Les racines du jujubier ont été récoltées le 27 mars 2017 de la région de Mila à coté de Radjas.

Après récupération de la plante, les racines ont été bien nettoyées et les écorces enlevées par la suite. Le séchage a été effectué naturellement à l'abri de la lumière et de l'humidité, à une température ambiante (environ 24°C), sur du papier durant 15 jours, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Le matériel végétal a été broyé dans un moulin électrique en une poudre très fine, pour augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant et faciliter l'extraction. Par la suite la poudre a été conservée dans un flacon à l'abri de la lumière.



**Figure 12** : Les racines du *Zizyphus lotus* (Mars 2017).

#### I.1.2. Détermination du rendement

Le rendement d'extraction a été calculé par la formule donnée par Mahmoudi *et al.*, 2012 qui a été modifié :  $R = M_{ext} / M_{éch} \times 100$ . Où R est le rendement en gramme,  $M_{ext}$  est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en gramme, et  $M_{éch}$  la masse sèche de l'échantillon végétal en gramme.

### I.2. Méthodes d'analyse

#### I.2.1. Extraction par macération à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus*

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante (Lagnika, 2005).

Les extraits utilisés pour la réalisation de cette étude sont en nombre de deux :

### I.2.1.1. Extrait aqueux

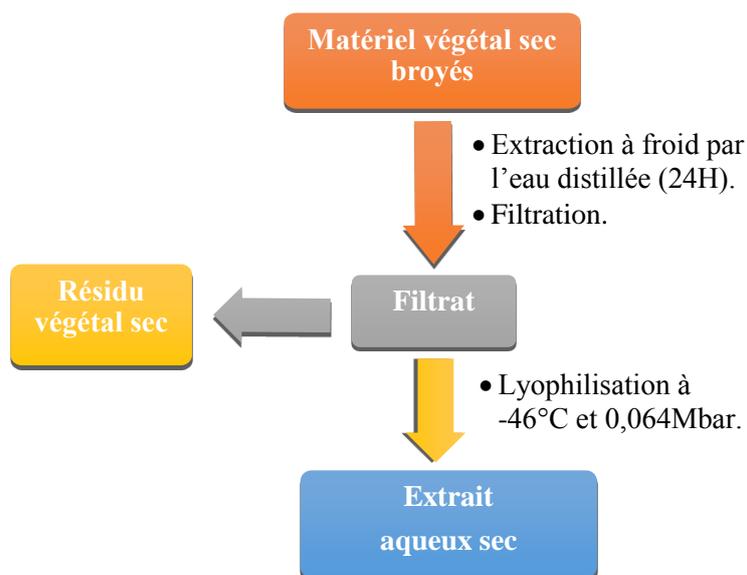
Selon la méthode de Bougandoura et Bendimerad (2012) modifiée, 50g de la poudre végétale (écorces des racines du *Z. lotus*) a été mise à une extraction par macération avec 500ml d'eau distillée, pendant 24H à température ambiante (environ 20°C), l'ensemble est filtré sur du papier filtre afin de séparer le marc du filtrat. L'extrait aqueux a été lyophilisé pour le réduire en poudre.

#### ✚ La lyophilisation

Un procédé de conservation d'une substance, d'un corps, et notamment de produits alimentaires et pharmaceutiques, consistant en une congélation rapide et une déshydratation presque totale du produit concerné, qui est ensuite conservé sous vide à température ambiante et retrouve ses qualités et propriétés premières par simple addition d'eau. La lyophilisation est une combinaison du froid et du vide. Grâce au froid, on peut séparer des substances qui sont stables dans les conditions normales [Site6].



**Figure 13** : Lyophilisateur de l'Université des Frères Mentourie Constantine1 (Mai 2017).



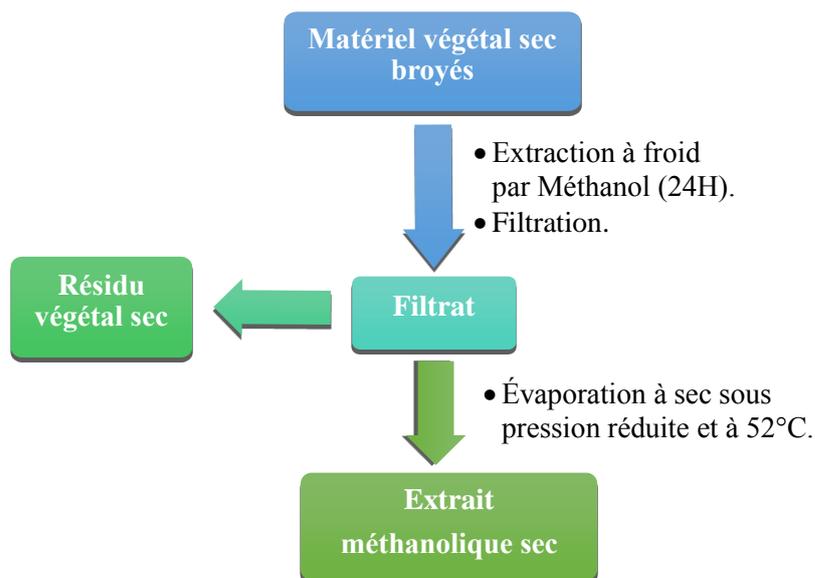
**Figure 14 :** Différentes étapes de préparation de l'extrait aqueux.

### I.2.1.2. Extrait méthanolique

Une prise d'essai de 37,5g de la matière végétale (la poudre fine des écorces des racines du *Z. lotus*) a été mise à macérer dans 500ml de méthanol absolu pendant 24H à température ambiante. Après filtration du mélange, l'extrait a été évaporé à sec sous pression réduite à et à 52°C grâce à un évaporateur rotatif pour obtenir un extrait sec (Bougandoura et Bendimerad, 2012).



**Figure 15 :** Évaporateur rotatif (Avril 2017).



**Figure 16 :** Différentes étapes de préparation de l'extrait méthanolique.

### I.2.2 Analyses des extraits du *Zizyphus lotus*

#### I.2.2.1. Analyse qualitative

##### I.2.2.1.1. Tests préliminaires

###### I.2.2.1.1.1. Caractérisation des composés phénoliques

0,1g de chaque extrait a été dissout dans 3ml de solvant (chaque extrait est dissout dans son solvant d'origine) et 5 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  à 2% y ont été ajoutées. La présence des composés phénoliques a été marquée par l'apparition de la couleur bleu-verdâtre (Rosine et Momo, 2009).

###### I.2.2.1.1.2. Caractérisation des Flavonoïdes

Le test consiste à ajouter à 3ml de chaque extrait (Aq et Met) à une concentration de 2mg/ml quelques gouttes d'acide chlorhydrique (HCl), puis quelques morceaux du magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ). L'apparition d'une couleur orange implique la présence des flavonoïdes (Ciulel, 1982 ; Karumi *et al.*, 2004).

###### I.2.2.1.1.3. Caractérisation des Tanins condensés (TCs)

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de chaque extrait, 1ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  à 1%. Une coloration bleu-noirâtre indique la présence des tanins galliques, et une coloration vert-noirâtre, la présence des tanins catéchiques (Dohou *et al.*, 2003 ; Diallo *et al.*, 2004).

### I.2.2.1.1.4. Différentiation des tanins

Si on a un mélange des deux types des tanins, 8ml d'une solution de formaldéhyde-chlorhydrique (appeler réactif de Stiasny : formaldéhyde + HCl concentré (2/1) (v/v)) est additionné à 15ml de chaque extrait. L'ensemble est chauffé au bain-marie jusqu'à ébullition pendant 30min. On remarque la formation d'un précipité (présence des tanins condensés) que l'on peut filtrer.

Le filtrat est neutralisé avec l'acétate de sodium jusqu'à saturation, puis quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> à 1% sont ajoutées. L'apparition de la couleur bleu-noirâtre indique la présence des tanins gallique (Trease et Evance, 1987 ; Mamadou, 2002).

### I.2.2.1.1.5. Caractérisations des saponines

4mg de l'extrait aqueux ont été introduits dans un tube à essai contenant 8ml d'eau distillée, l'ensemble a été chauffé pendant 5min. Après refroidissement, 5ml ont été introduits dans un second tube à essai et agités énergiquement pendant 1min. Après 15min de repos, l'épaisseur de la mousse a été mesurée à l'aide d'une règle graduée. Une hauteur de mousse d'au moins un centimètre indique la présence des saponines (Rosine et Momo, 2009).

### I.2.2.1.2. Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation des composés qui permet d'analyser la complexité d'un mélange. Cette technique a été utilisée pour visualiser la séparation des molécules des deux extraits (Abedini, 2013).

**Principe :** La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interactions et de polarité. Un mélange de composés est placé sur un support solide (phase stationnaire) plongé dans un solvant (phase mobile) qui se déplace par capillarité le long de la phase stationnaire. La phase mobile va entraîner les composés qui migreront à une hauteur variant en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. On peut ainsi caractériser les composés selon leur R<sub>f</sub> (Abedini, 2013).

### Mode opératoire

- **A / Préparation de la phase mobile :** La cuve de migration est partiellement remplie du mélange de solvant (phase mobile) afin qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant ce qui facilite et améliore la migration. La phase mobile est constituée d'un mélange de solvants. Différents systèmes solvants ont été essayés pour définir celui qui donne une meilleure séparation.

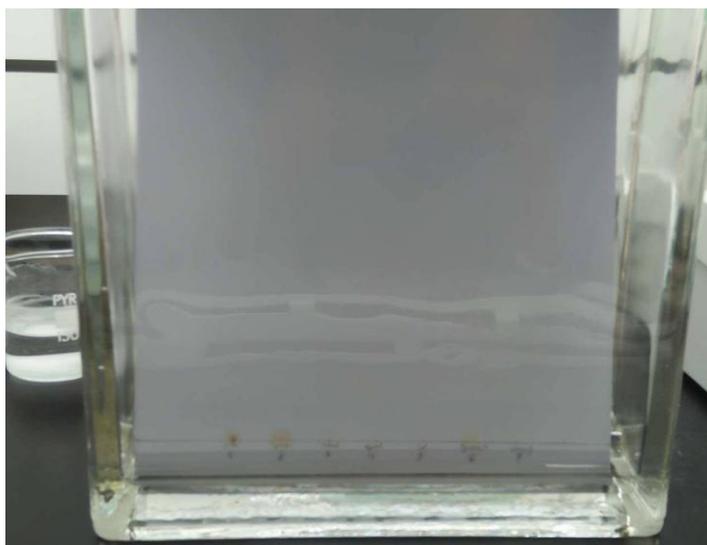
**Tableau 3 :** Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM.

	Systèmes solvants	Proportions	Références
<b>Les systèmes solvants Essayés</b>	Méthanol / Eau	(50/50) (v/v)	/
	Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau	(8/2/1) (v/v/v)	(Abedini, 2013)
	Butanol/Acide acétique/Eau	(60/20/20) (v/v/v)	(Botosoa, 2010)
	Butanol/Acide acétique/Eau	(60/15/35) (v/v/v)	(Diallo <i>et al.</i> , 2004)
	Butanol / Ethanol /Eau	(12/30/50) (v/v/v)	(Jang <i>et al.</i> , 2013)
<b>Le système choisi</b>	<b>Butanol/Acide acétique/Eau</b>	<b>(60/20/20) (v/v/v)</b>	<b>(Botosoa, 2010)</b>

Selon la méthode de Diallo *et al.*, (2004) et Botosoa (2010) avec quelques modifications, l'analyse des deux extraits du *Z. lotus* a été réalisée par un système de séparation BAW (Butanol/Acide acétique/Eau) avec des proportions de (60/20/20) (v/v/v).

- **B / la phase stationnaire :** La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice sur des plaques en aluminium.
- **C / Le dépôt des échantillons :** Les plaques sont découpées aux dimensions voulues. Les deux extraits ainsi que les standards ont été dissous dans du méthanol. Le dépôt de 10µl de chaque extrait (20mg/ml) et des standards : Quercétine, Catéchine, Epicatéchine, Naringénine, Acide Gallique (1.25mg/ml) se fait avec une micro-seringue d'une façon perpendiculaire et linéaire, à 1,5cm du bord inférieur de la plaque, et à 1,3cm à partir des bords latéraux, avec 1cm d'espacement, ensuite les plaques sont séchées à l'étuve à 100°C pendant 5min.

- **D / Développement des plaques** : Chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque (chromatographie ascendante) (Sine, 2003).
- **E / Révélation du chromatogramme** : Les plaques sont bien séchées, si les constituants sont colorés, ils seront directement visibles sur la plaque, sinon la révélation peut se faire sous UV ou bien par des méthodes chimiques :
  - Soit par visualisation des substances ayant migré sous lumière ultraviolette à 254nm et à 366nm. Les constituants apparaissent sous forme de taches sombres et fluorescentes.
  - Soit par pulvérisation de la plaque avec le réactif d'anisaldéhyde sulfurique (Éthanol/Aldéhyde anisique/Acide sulfurique (90/1/10) (v/v/v/)) qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler après chauffage à 100°C pendant 5min.
  - Soit par plonger la plaque dans une solution de DPPH à 2% (m/v) dans le méthanol.



**Figure 17** : Plaque CCM dans une cuve à chromatographie (Mai 2017).

On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal  $R_f$  :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et le centre de la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et le front du solvant}}$$

### I.2.2.2. Analyse quantitative et dosages biochimiques

Des déterminations quantitatives des principaux groupes de métabolites secondaires : les polyphénols totaux, les flavonoïdes et les tanins condensés ont été effectuées sur les deux extraits du *Zizyphus lotus*. Le choix du dosage de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés biologiques de la plante lui sont attribués (Boizot *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2006).

#### I.2.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux (PPT) par colorimétrie

Afin de caractériser les différents extraits préparés à partir des écorces des racines du *Z. lotus*, un dosage des polyphénols totaux a été effectué.

##### ➤ A / Principe :

Les polyphénols totaux dans les deux extraits ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode colorimétrique du Folin-Ciocalteu (Ragaee *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2006 ; Anthony, 2010). Cet acide de couleur jaune est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène  $W_8O_{23}$  et de molybdène  $Mo_8O_3$  (Ribéreau, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximale est à 765nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (Ghazi et Sahraoui, 2005 ; Boizot et Charpentier, 2006).

##### ➤ B / Mode opératoire :

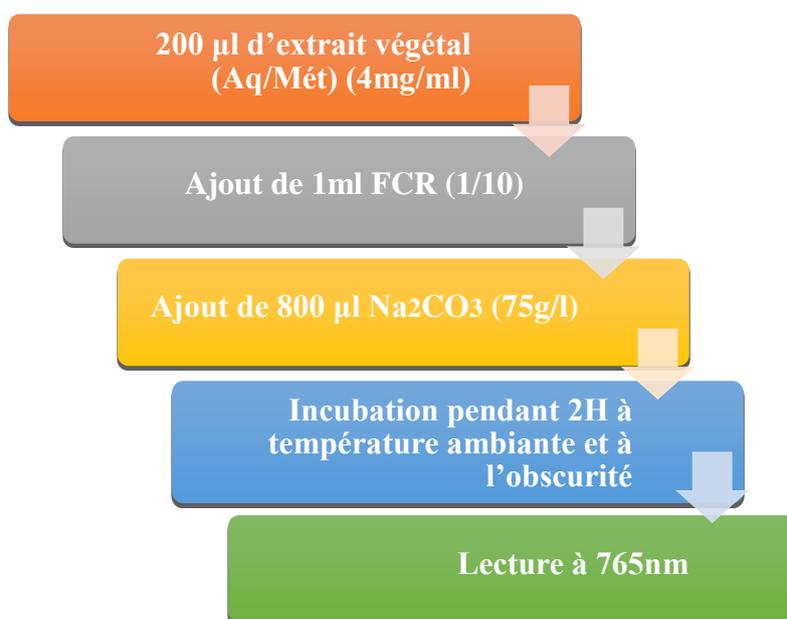
#### Dosage :

Les polyphénols totaux (PPT) ont été déterminés, suivant le protocole appliqué par Li et ces collaborateurs en 2007 ; Normala et Mardhiah en 2010 avec quelques modifications : 200µl d'extrait végétal aqueux ou méthanolique (4mg/ml) ont été pipetés dans un tube à essai, mélangé avec 1ml de réactif de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois dans de l'eau distillée. Après 4min, 800µl de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) avec une concentration de 75g/l sont ajoutés et le mélange a été vortexé.

Après une incubation du mélange réactionnel pendant 2 heures de temps à température ambiante et à l'obscurité, L'absorbance est mesurée à 765nm par un spectrophotomètre UV-VIS, toutes les mesures ayant été répétées 2 fois.

### Préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique :

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0,25-200 $\mu\text{g/ml}$ ), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par un milligramme poids sec ( $\mu\text{g EAG/mg}$  d'extrait) (Normala et Mardhiah, 2010).



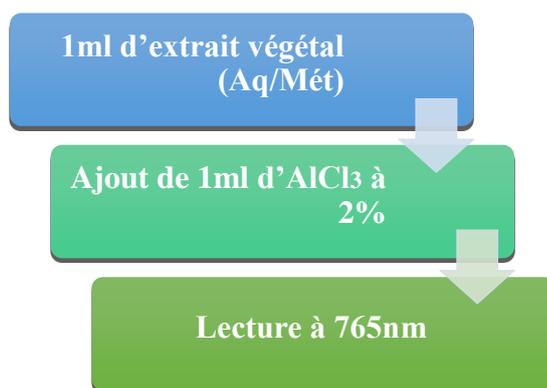
**Figure 18** : Différentes étapes du dosage des polyphénols totaux (PPT) des deux extraits aqueux et méthanolique.

#### I.2.2.2.2. Dosage des Flavonoïdes (FV) par le trichlorure d'aluminium

La détermination de la teneur en flavonoïdes des deux extraits (Aq et Mét) a été effectuée par la méthode de trichlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  (Bahorum, 1997 ; Djeridane *et al.*, 2006 ; Ayoola *et al.*, 2008 ; Mbaebie, 2012) avec des modifications : Le chlorure d'aluminium forme des complexes jaunâtres avec les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

Brièvement, 1ml d'extrait (chaque extrait est dilué dans son solvant d'origine), est ajouté à 1ml d' $\text{AlCl}_3$  (Solution méthanolique à 2%). Après 10min de réaction, l'absorbance est lue à 430nm par un spectrophotomètre UV-VIS.

Les concentrations des flavonoïdes sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par un milligramme d'extrait sec ( $\mu\text{g EQ/mg}$  d'extrait).



**Figure 19** : Différentes étapes du dosage des flavonoïdes (FV) des deux extraits aqueux et méthanolique.

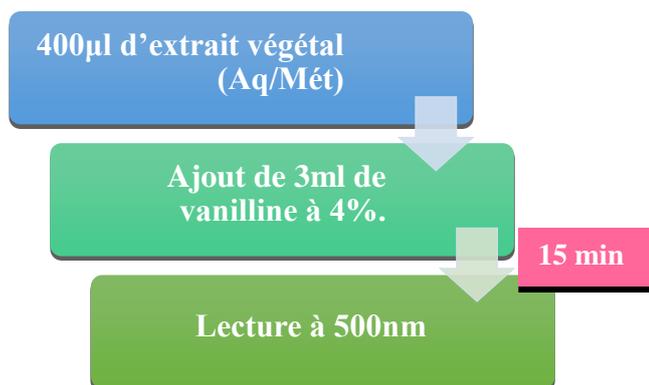
### I.2.2.2.3. Dosage des tanins condensés (TCs)

Dans les plantes, les TCs sont présents sous différentes formes : libres ou liés, c'est à dire ceux fixés aux protéines ou aux fibres de la plante (Schofield *et al.*, 2001). L'existence de ces deux formes rend le dosage des TCs plus délicat (Brunet, 2008). En général, les TCs sont majoritairement présents sous forme libre (Terrill *et al.*, 1992). Cependant les conditions de stockage, de séchage et d'extraction des échantillons peuvent influencer la proportion de TCs liés/libres (Schofield *et al.*, 2001).

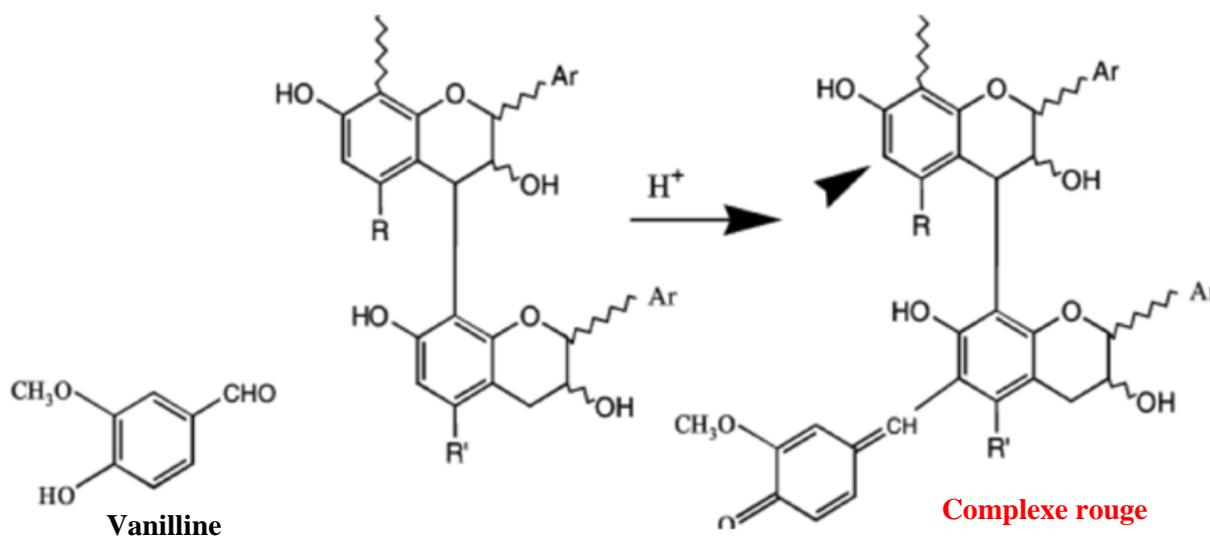
Le dosage des tanins condensés dans les deux extraits du *Z. lotus* est effectué par la vanilline selon la méthode de Heimler *et al.*, (2006). Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de la vanilline sur le groupement flavonoïde terminal (le carbone 6 du cycle A de la catéchine) et la formation d'un complexe rouge qui absorbe à 500nm (Makkar, 2000 ; Schofield *et al.*, 2001). Cependant cette réaction n'est pas spécifique aux TCs mais de manière générale aux flavanols (Hagerman, 2002).

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

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



**Figure 20 :** Différentes étapes du dosage des tanins condensés (TCs) des deux extraits aqueux et méthanolique.



**Figure 21 :** La réaction entre la vanilline est les tanins condensés (Schofield et al., 2001).

# Chapitre II : Étude des Activités Biologiques

## II.1. Activité antimicrobienne

### II.1.1. Souches microbiennes expérimentées

- ✚ ***Staphylococcus aureus*** : Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées, et dans certains cas extrêmes de septicémies chez des sujets ayant subi une greffe ou avec une prothèse cardiaque (Delphine, 2008).
- ✚ ***Bacillus subtilis*** : Largement présente dans la nature, elle fait également partie de la flore intestinale microbienne, et est généralement sans danger dans les bonnes conditions de manipulation, et peut être utilisé sans aucun problème dans les laboratoires d'analyse (Danja, 2016).
- ✚ ***Escherichia coli*** : Une bactérie caractérisée par une sporulation non facultative anaérobie, elle se trouve dans l'intestin et les selles des animaux et des reptiles à sangs chauds et le microbiote intestinal (Tenailon, 2010). Néanmoins, certaines souches d'*E. coli* ont été répertoriées comme pathogènes pour l'Homme car responsables d'affections variées allant d'une simple diarrhée à des infections systémiques parfois mortelles (Dunière *et al.*, 2012).
- ✚ ***Pseudomonas aeruginosa*** : C'est l'agent le plus pathogène courant provoquant une infection chronique (Pressler, 2011).

**Tableau 4** : Quelques critères des souches bactériennes expérimentées.

Souche bactérienne	Gram	ATCC	Durée d'incubation	Température d'incubation	Diamètre après 24h à 37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	6538	18-24H	36 ± 1°C	≥ 1mm
<i>Bacillus subtilis</i>	+	6633	18-24H	36 ± 1°C	≥ 3mm
<i>Escherichia coli</i>	-	8739	18-24H	36 ± 1°C	≥ 2mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	9027	18-24H	36 ± 1°C	≥ 2mm



### II.1.2. Test antimicrobien

Le test de susceptibilité a été effectué selon la méthode de diffusion des disques décrite par (Dulger et Gonuz, 2004 ; Parekh et Chanda, 2007 ; Rota *et al*, 2008) et autres.

L'Objectif de ce test est de déterminer parmi les extraits préparés celui qui a la plus grande activité inhibitrice des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.

L'activité antimicrobienne des extraits Mét et Aq était testée *in vitro* par la méthode de diffusion des disques en milieu solide (Osato, 2009 ; Liao., *et al* 2010). Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application de disques imprégnés de principes actifs sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. La présence de l'activité antimicrobienne, se manifeste par l'apparition d'une zone circulaire transparente autour du disque qui correspond à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible.

#### Mode opératoire

- **Préparation de l'inoculum :**

Cultiver les quatre souches bactériennes séparément dans des boites de pétri contenant un milieu de TSA (milieu gélosé de peptone de caséine et de soja) à une température comprise entre 30-37°C pendant une durée d'incubation appropriée pour chaque souche, entre 24-48H pour *E. coli* et *S. aureus*, 3-5 jours pour *B. subtilis* et *P. aeruginosa*. Transférer avec une anse de platine des colonies bien isolées dans des tubes stérile contenant un bouillon non sélectif TSE (solution tampon peptonée au chlorure de sodium à pH 7,00).

La lecture de la suspension se fait à l'aide un densicheck pour avoir une turbidité voisine à 0,5McFarland, qui correspond à une concentration de  $10^8$  UFC/ml. Ajuster la suspension en ajoutant du TSE si la valeur est supérieure à la limite minimale ou en ajoutant des colonies si elle est inférieure à la limite maximale.

L'inoculum doit être utilisé dans les 15min qui suivent sa préparation à la température ambiante, ou dans les deux heures s'il est conservé entre 2 et 8°C (Pharmacopée Européenne 8.0).

- **Préparation du milieu de culture :**

Le milieu de culture peut être constitué de deux couches :



Couler une première couche de 2mm d'épaisseur (15 à 20ml) répartie uniformément dans des boîtes et laisser solidifier. Ensemencer un volume de 100ml de milieu MH avec 1ml de suspension bactérienne préalablement préparé et bien mélanger, puis couler une deuxième couche d'environ 4ml de milieu ensemencé en une couche uniforme et lisse, puis laisser solidifier environ 30min avant leur emploi (Pharmacopée Européenne 8.0).

- **Préparation des dilutions :**

Les extraits ainsi que l'antibiotique sont préparés à différentes concentrations, on a une solution mère de 6mg/ml à partir de laquelle on fait des dilutions : 4,5mg/ml ; 3mg/ml ; 2mg/ml et 1mg/ml qui sont dissoutes dans le DMSO pour l'extrait méthanolique, et dans de l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux.

L'antibiotique « Spiramycine » a été préparé dans les mêmes conditions, la solution mère est de 0,1mg/ml et les dilutions : 0,075mg/ml ; 0,05mg/ml ; 0,025mg/ml ; 0,012mg/ml et 0,005mg/ml dissoutes également dans le DMSO.

- **Préparation des disques :**

Des disques (patches) de 6mm de diamètre ont été découpés sur du papier Wattman n°1 puis autoclavés à 120°C pendant 15min. À l'aide d'une pince stérile et sous une hôte bien propre et stérilisée, les disques ont été déposés sur la surface du milieu ensemencé, et rapidement à l'aide d'une micropipette les disques sont chargés par 10µl de chaque concentration préparée précédemment.

- **Incubation :**

L'incubation se fait à 37°C pendant 18-24H (Osato, 2009 modifier) et (Choi *et al.*, 2006). Une période de diffusion de 1-4H à température ambiante peut être nécessaire afin de réduire les effets dus au décalage de temps entre l'application des solutions sur les disques (Pharmacopée européenne 8.0). Les tests doivent être répétés trois fois.



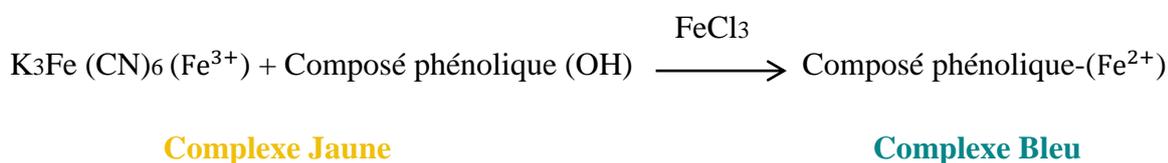
## II.2. Activité antioxydante

### II.2.1. Teste du pouvoir réducteur du fer par la méthode de FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant power)

- **Principe**

Le pouvoir réducteur du fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dans les deux extraits a été déterminé selon la méthode décrite par Oyaiz en 1986 et Bougandoura en 2013 (modifiées).

La méthode de la réduction du fer est basée sur la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en sel de fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par les antioxydants qui donnent la couleur bleu (Ou *et al.*, 2001).



- **Dosage**

Un millilitre de chaque extrait (Aq et Mét) à différentes concentrations (de 0,5 à 10mg/ml) est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20min. Ensuite, 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. 2,5ml du mélange est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  à 0,1%.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS).

Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant : l'acide ascorbique et l'acide gallique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton et Rossi, 1965 ; Ghaisas *et al.*, 2008).



# Chapitre I : Étude Phytochimique

### I.1. Extraction à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus*

#### I.1.1. Extrait aqueux et méthanolique

Selon la méthode de Bougandoura et Bendimerad (2012) modifiée, les deux extraits (Aq et Mét) ont été préparés à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus*. C'est une méthode d'extraction par macération dans des solvants polaires : l'eau et le méthanol. Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspect différents.

**Tableau 5** : La couleur et l'aspect des deux extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines de *Zizyphus lotus*.

Extrait	Aspect	Couleur
Aqueux	Poudre	Marron clair
Méthanolique	Pâteux	Marron foncé



**Figure 22** : L'extrait aqueux après lyophilisation.



**Figure 23** : L'extrait méthanolique après évaporation sous vide.

#### I.1.2. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est exprimé en gramme de masse d'extrait par rapport à cent gramme de la plante fraîche (Mahmoudi *et al.*, 2012 modifier), le rendement le plus élevé a été observé dans l'extrait méthanolique, par rapport à l'extrait aqueux qui est moins élevé.



**Tableau 6 :** Le rendement des deux extraits aqueux et méthanolique des écorces des racines du *Zizyphus lotus* (g/100g de plante fraîche).

Extrait	Rendement (g/100g de plante fraîche)
Aqueux	8,2794 g/100g.
Méthanolique	21,8669g/100g.

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en métabolites secondaires, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee et *al.*, 2003).

## I.2. Analyse des deux extraits du *Zizyphus lotus*

### I.2.1. Analyse qualitative

#### I.2.1.1. Tests préliminaires

Les résultats de la mise en évidence de quelques métabolites secondaires dans les deux extraits aqueux et méthanolique : des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins et des saponines se traduisent dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 7 :** Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait aqueux du *Zizyphus lotus*.

Métabolites testés	Remarques	Résultats
Composés phénoliques	Couleur bleu verdâtre	+++
Flavonoïdes	Couleur orange foncé	++
Saponines	Hauteur de la mousse = 1,5cm	+++
Tanins	Couleur bleu verdâtre	+++
Tanins condensés	Formation de précipité	++
Tanins hydrolysables	Couleur bleu- noire	-

-Absence, + Présence, +++ présence plus importante.



**Tableau 8 :** Résultats des tests préliminaires de quelques métabolites secondaires de l'extrait méthanolique du *Zizyphus lotus*.

Métabolites testés	Remarques	Résultats
<b>Composés phénoliques</b>	Couleur bleu verdâtre	+++
<b>Flavonoïdes</b>	Couleur orange foncé	++
<b>Saponines</b>	/	/
<b>Tanins</b>	Couleur bleu verdâtre	+++
<b>Tanins condensés</b>	Formation de précipité	++
<b>Tanins hydrolysables</b>	Couleur bleu- noire	-

-Absence, + Présence, +++ présence plus importante.

La macération par deux solvants différents à polarité voisine, permet de séparer les composants qui se trouvent dans les écorces des racines de notre plante, selon leur degré de solubilité dans le solvant approprié. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante, 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 (Hagerman et *al.*, 2000).

Les essais phytochimiques réalisés sur les deux extraits (Aq et Mét) ont révélé la présence des flavonoïdes de type flavones caractérisés par une couleur oronge. L'apparition de la couleur bleu-verdâtre reflète la présence des composés phénoliques et des tanins condensés dans les deux extraits via le test de FeCl<sub>3</sub>.

Pour la séparation entre les deux types des tanins (tanins condensés et tanins hydrolysables), un test par le réactif de Stiasny a été réalisé, dont les résultats confirment la présence des tanins condensés par formation d'un précipité, et le manque des tanins hydrolysables par absence de la couleur bleu-noirâtre dans les deux extraits.

La présence d'une mousse avec une hauteur supérieur à 1cm (1,5) qui persiste même après une demie heure, indique une présence assez importante des saponines dans la plante.

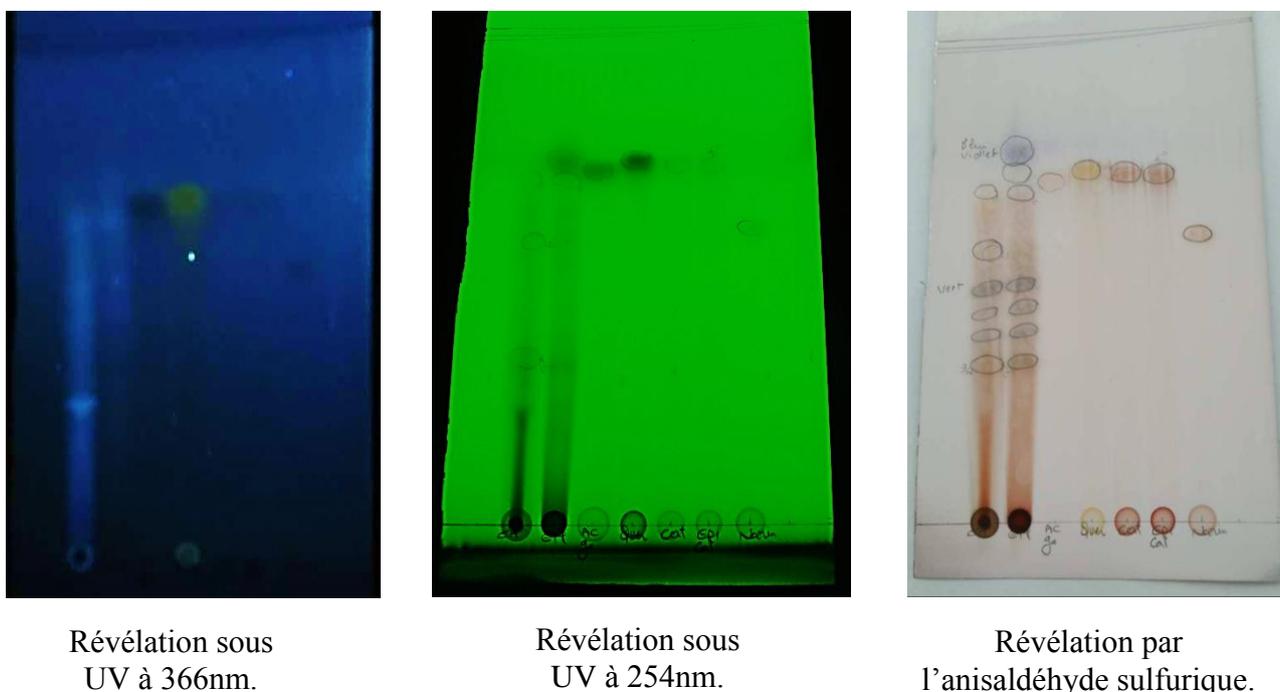
Tous ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Borgi et ces collaborateurs en 2007, où l'étude phytochimique faite sur les extraits aqueux et méthanolique des écorces des racines, a donné des résultats positifs pour les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les saponines (dans l'extrait Aq), et des résultats négatifs pour les tannins hydrolysables.



### I.2.1.2. Chromatographie analytique sur couche mince

Pour avoir une empreinte polyphénoliques de nos deux extraits, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant un système solvant moyennement polaire (BAW) Butanol/Acide acétique/Eau (60/20/20) (v/v/v) selon Botosoa (2010). Sous lumière UV à 254nm et à 366nm, et après une révélation chimique par l'ansaldehyde sulfurique, et le DPPH, les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées. Les standards utilisés sont des composés phénoliques : la Naringénine (Nrg), la quercétine (Que), la catéchine (Cat) et l'épicatéchine (Epcat) qui sont des flavonoïdes, et l'acide gallique (Ag) qui est un acide phénolique.

A / Révélation physique à 366nm et à 254nm, et chimique par l'ansaldehyde sulfurique :



**Figure 24 :** Chromatographie sur couche mince des extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus* révéler sous UV à 366nm et 254nm, et par l'ansaldéhyde sulfurique (de gauche à droite : **E.Aq; E.Mét; Ag; Que; Cat; Epcat; Nrg**).

Une mesure des Rapports frontaux a été effectuée et se présente dans le tableau ci-dessous :



**Tableau 9 :** Les Rapports frontaux et les couleurs après révélation physique (366nm/254nm), et chimique par l'anisaldéhyde sulfurique.

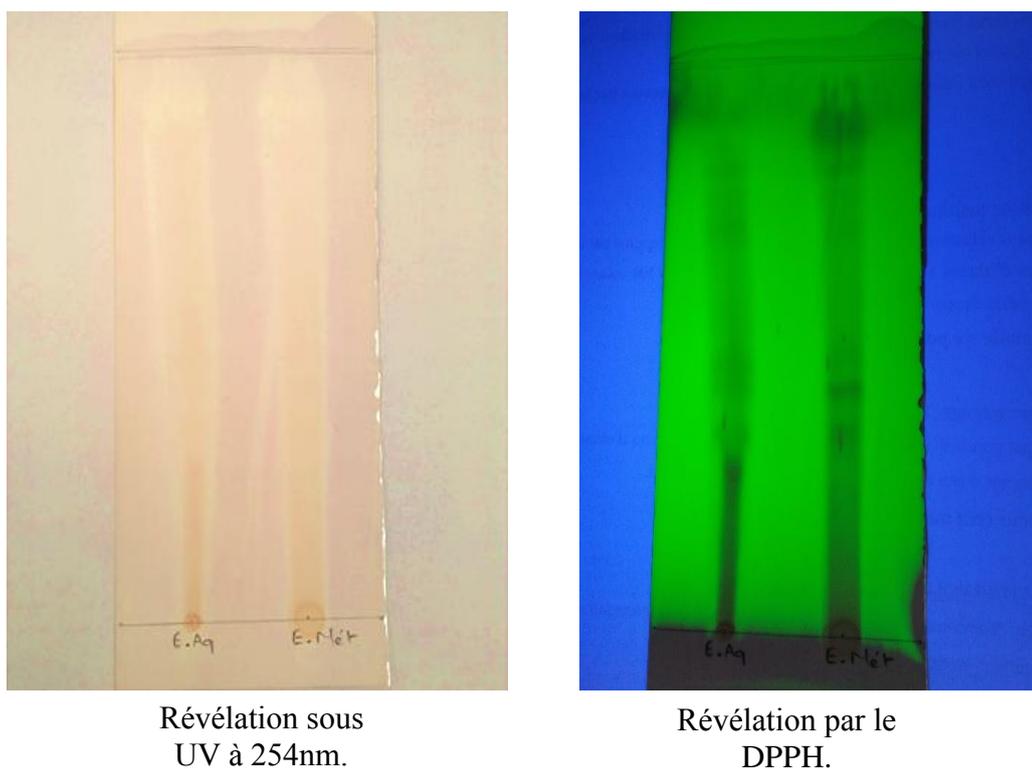
Standard et Extrait	Rf	Couleur après révélation		
		Spot coloré sous UV à 366 nm	Spot coloré sous UV à 254 nm	Spot coloré par l'anisaldéhyde sulfurique
<b>Acide Gallique</b>	0,714	Trop sombre	Sombre	Orange
<b>Quercétine</b>	0,717	Jaune	Trop sombre	Jaune
<b>Naringenine</b>	0,550	Sombre	Sombre	Marron
<b>Catéchine</b>	0,705	Sombre	Sombre	Orange
<b>Epicatéchine</b>	0,698	Sombre	Sombre	Orange
<b>Extrait Aqueux</b>	0,309	Bleu fluorescent	Peu sombre	Vert
	0,373	/	/	Bleu-verdâtre
	0,415	/	/	Bleu-verdâtre
	0,471	/	/	Bleu-verdâtre
	0,552	Vert fluorescent	/	Marron
	0,696	Vert fluorescent	/	/
<b>Extrait Méthanolique</b>	0,312	/	Peu sombre	Vert
	0,375	/	/	Bleu-verdâtre
	0,423	/	/	Bleu-verdâtre
	0,472	/	/	Bleu-verdâtre
	0,548	Bleu fluorescent	/	Marron
	0,695	/	/	Marron
	0,716	Bleu fluorescent	/	/
	0,763	Bleu fluorescent	Sombre	Bleu-violet



Après révélation physique et chimique par l'anisaldéhyde du 1<sup>er</sup> chromatogramme, deux tâches sont détectées pour l'extrait Aq : la naringénine (0,552) et l'épicatéchine (0,696), et trois taches pour l'extrait Mét : la quercitrine (0,716), l'épicatéchine (0,695) et la naringénine (0,548).

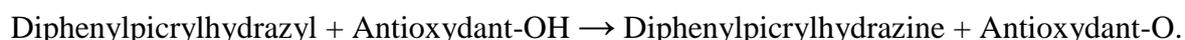
Les couleurs des spots et leurs Rf, nous ont permis de révéler la présence des flavonoïdes de types flavonols (quercétine, catéchine et épicatéchine), et de type flavanone (naringénine).

### B / Révélation chimique et physique (254nm) par le DPPH :



**Figure 25 :** Chromatographie sur couche mince des extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines *du Zizyphus lotus* révéler par le DPPH et sous UV à 254nm (de gauche à droite **E.Aq ; E.Mét**).

Après révélation chimique du 2<sup>ème</sup> chromatogramme par le DPPH, on remarque la disparition de la couleur violette de ce dernier et l'apparition de la couleur jaune fluorescente, ce qui indique la présence des composés phénolique (composés bioactifs).



**Complexe violet**

**Complexe Jaune fluorescent**



**Tableau 10** : Les Rapports frontaux et les couleurs après révélation chimique et physique à 254nm par le DPPH.

Les Extrait	Rf	Couleur après révélation	
		Spot coloré sous UV à 254nm.	Spot coloré par le DPPH.
Extrait aqueux	0,287	Sombre	Jaune fluorescent
	0,328	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,412	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,458	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,694	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,751	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,809	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,893	Peu sombre	Jaune fluorescent
Extrait méthanolique	0,228	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,458	Sombre	Jaune fluorescent
	0,694	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,751	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,809	Peu sombre	Jaune fluorescent
	0,893	Sombre	Jaune fluorescent

### I.2.2. Analyse quantitative et dosages biochimiques

Un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes ainsi que des tanins condensés a été effectué afin de caractériser la teneur des extraits aqueux et méthanolique préparés à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus*.

Le contenu en polyphénols totaux a été déterminé par la méthode du Folin ciocalteu (Ragae *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2006 ; Anthony, 2010), où l'acide gallique a été utilisé comme standard (765nm). Pour les flavonoïdes, le dosage a été réalisé selon la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorum, 1997 ; Djeridane *et al.*, 2006 ; Ayoola *et al.*, 2008 ; Mbaebie, 2012), en utilisant



la quercétine comme standard (430nm). Les tanins condensés ont été quantifiés selon la méthode de Heimler et ses assistants en 2006 par la vanilline en utilisant la catéchine comme standard (500nm).

Les résultats sont représentés dans le (**tableau : 11**), les diagrammes, et les gammes d'étalonnage dans les (**figures : 26 ; 27 ; 28 ; 29 ; 30**).

**Tableau 11** : La teneur en composés phénoliques des deux extraits aqueux et méthanolique.

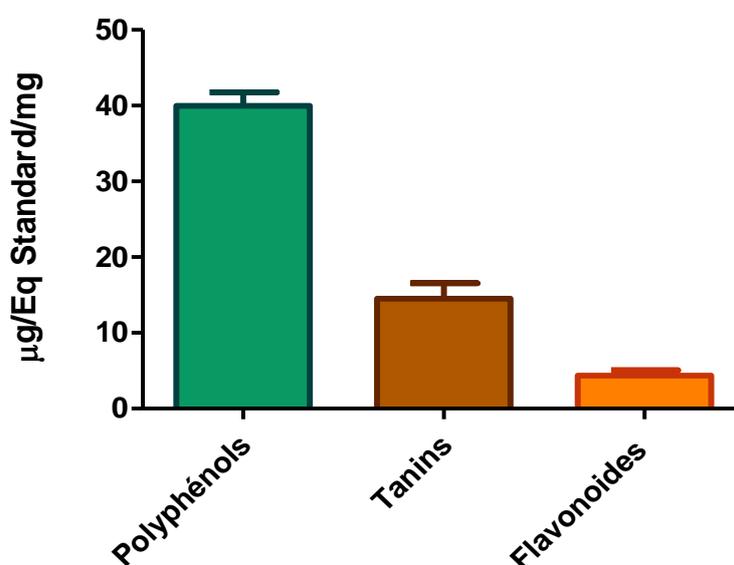
Extrait	Polyphénols (a)	Tannins(b)	Flavonoïdes(c)
Extrait aqueux	39,9667±2,5554	14,5105 ± 2.755	4,3719 ± 0,9226
Extrait méthanolique	26,989 ± 2,0168	21,9233 ± 1,5739	3,2608 ± 1,3140

(a) µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

(b) µg d'équivalent de catéchine par milligramme d'extrait.

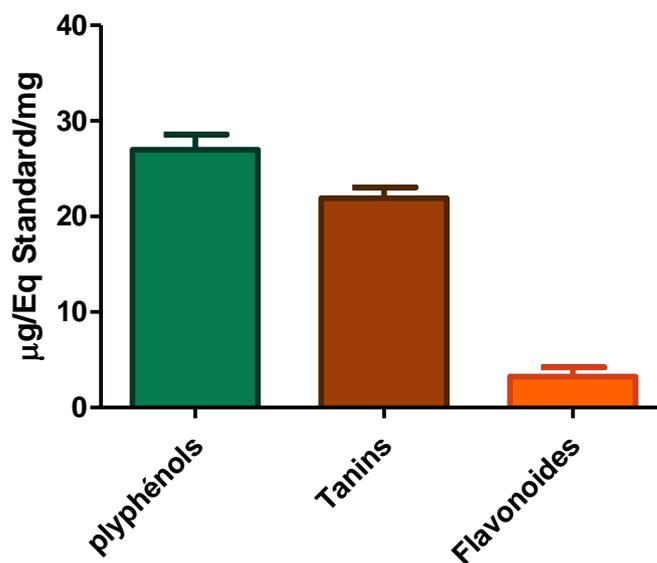
(c) µg d'équivalent de quercitrine par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.



**Figure 26** : La teneur en polyphénols, en tanins et en flavonoïdes (g/Eq Standard/mg) dans l'extrait aqueux.





**Figure 27** : La teneur en polyphénols, en tanins et en flavonoïdes (g/Eq Standard/mg) dans l'extrait méthanolique.

Les résultats obtenus montrent une présence des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés dans les extraits étudiés, et d'après ces résultats, une variabilité des teneurs en est constatée : celle des polyphénols est plus élevée pour l'extrait aqueux (39,966 EAG/mg  $\pm$  2,555) et plus faible pour l'extrait méthanolique (26,989 EAG/mg  $\pm$  2,016), par contre celle des tanins condensés est plus élevée pour l'extrait méthanolique (21,923 ECT/mg  $\pm$  1,573) que pour l'extrait aqueux (14,510 ECT/mg  $\pm$  2,755), et enfin les flavonoïdes ont montré des valeurs voisines (4,371 EQ/mg  $\pm$  0,922) avec l'extrait aqueux et (3,260 EQ/mg  $\pm$  1,314) avec l'extrait méthanolique.

Donc, on peut dire qu'il y a une différence très hautement significative pour les polyphénols dans les deux extraits ( $p \leq 0,0007$ ), et une différence significative pour les tanins dans les deux extraits ( $p \leq 0,0055$ ), par contre pour les flavonoïdes, il n'y a pas de différence ( $p \leq 0,1778$ ).

En effet, les teneurs rapportées par Bakchiche et *al.*, en 2013 sur le dosage des composés phénoliques dans d'autres parties du *Zizyphus lotus*, ont démontrés que les écorces des racines apparaissent plus riches en polyphénols.



Ces variations peuvent s'expliquer par le fait que la quantité des composés phénoliques des extraits de la plante étudiée dépend essentiellement : de son origine (Ebrahimzadeh *et al*, 2008), de la variété, de la saison de culture, de la saison de récolte, des conditions climatiques et environnementales, de la localisation géographique, des différentes maladies qui peuvent affecter la plante, de la maturité de la plante (Park et Cha, 2003) et de la durée de conservation (İzğüven *et al*, 1998).

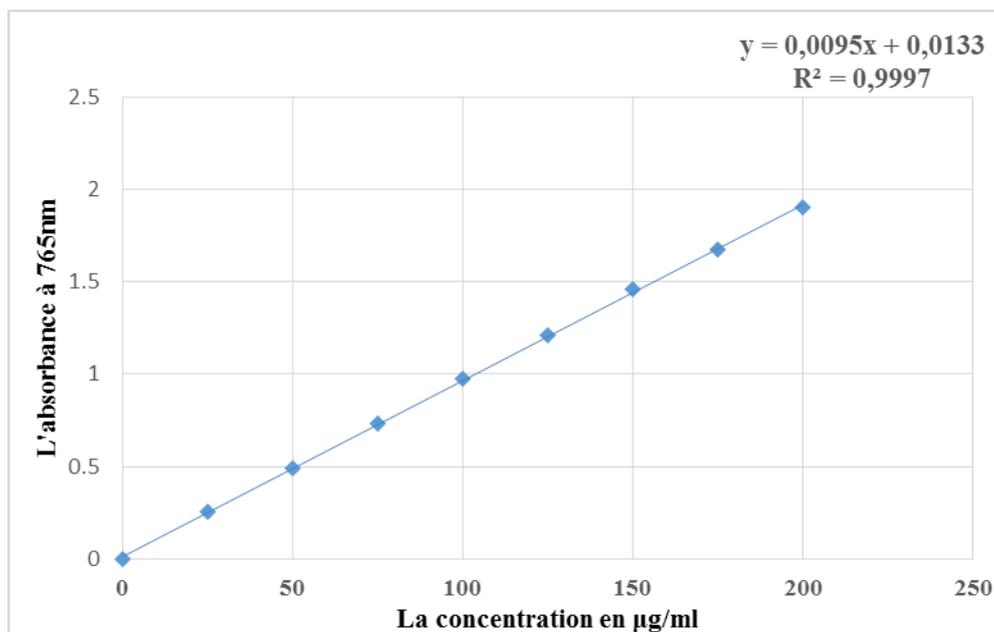


Figure 28 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne  $\pm$  SD de deux essais).

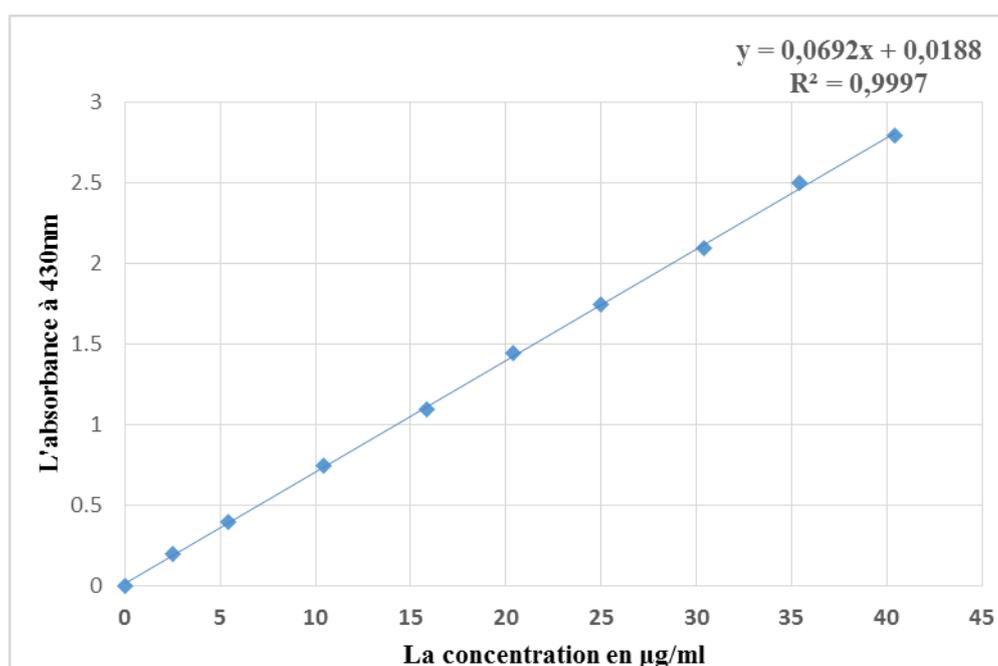
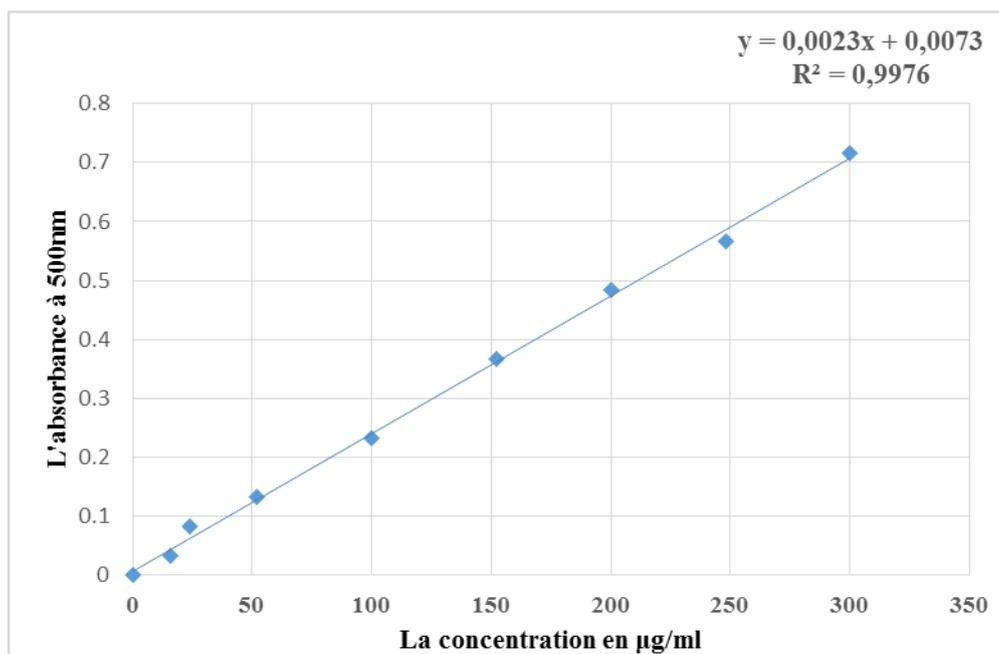


Figure 29 : Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne  $\pm$  SD de deux essais).





**Figure 30** : Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne  $\pm$  SD de deux essais).



# Chapitre II : Étude des Activités Biologiques

### II.1. Activité antimicrobienne

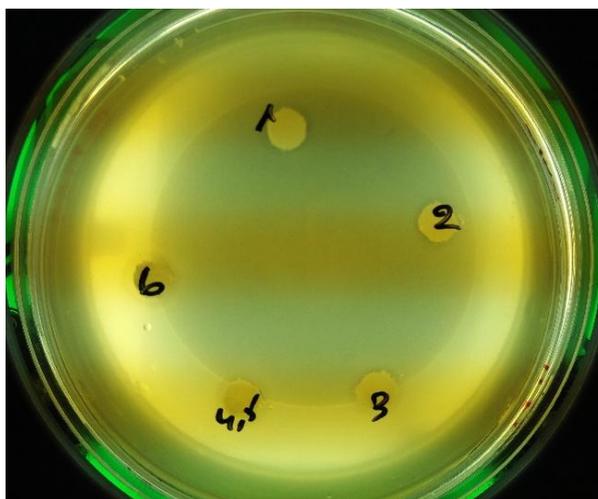
Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien de nos deux extraits préparés à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

Cette activité est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques contenant les échantillons à tester (E.Aq, E.Mét et ATB) vis-à-vis de deux souches bactériennes Gram positives (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) et deux autres Gram négatives (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) après 24H d'incubation à une température adéquate de 37°C. Les résultats qui se présentent ci-après montrent que les extraits ont des activités antimicrobiennes de degrés variables contre les souches des différents micro-organismes testés.

La lecture des zones d'inhibition se fait au dos des géloses sur un fond noir éclairé par une lumière réfléchie, puis la mesure des diamètres d'inhibition en millimètre se fait au moyen d'un pied à coulisse.

Les résultats conquis se présentent dans les figures et les tableaux qui suivent :

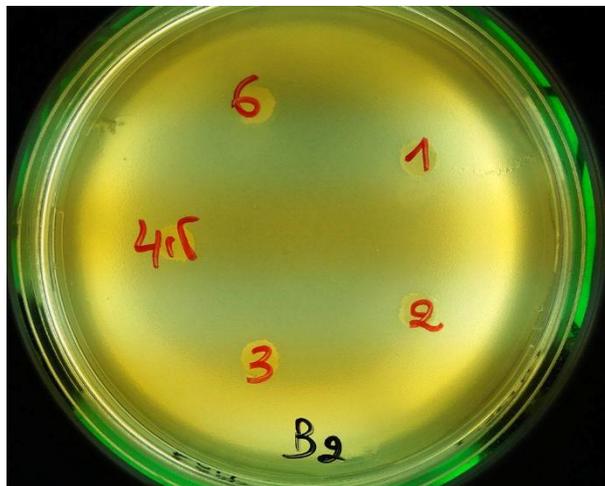
#### II.1.1 Les résultats de l'extrait méthanolique



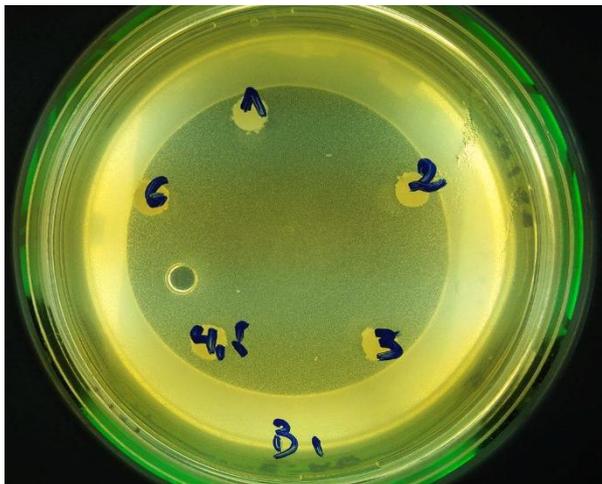
**Figure 31** : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique sur *Staphylococcus aureus*.



**Figure 32 :** Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique sur *Escherichia coli*.



**Figure 33 :** Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique sur *Pseudomonas aeruginosa*.

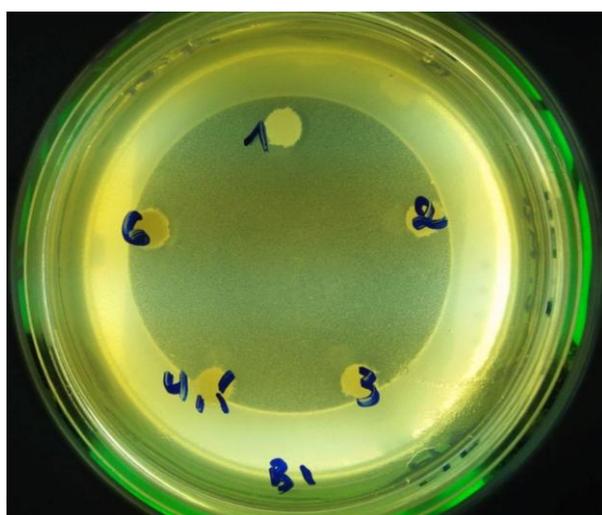


**Figure 34:** Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique sur *Bacillus subtilis*.

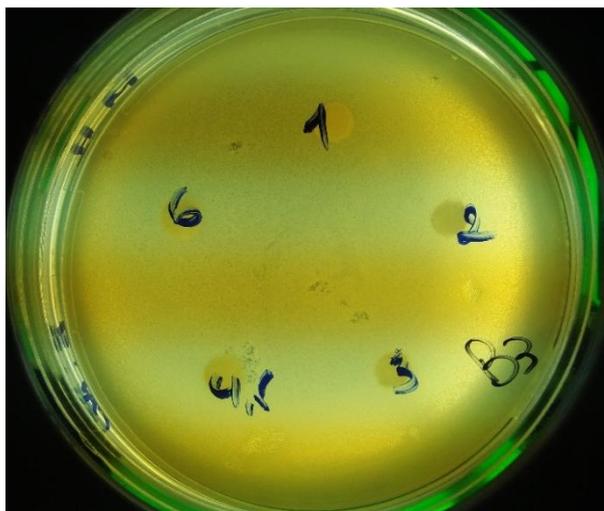
**Tableau 12 :** Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait méthanolique.

Concentration (mg/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
1	8,33 ± 0,07	7,33 ± 0,14	0,00	0,00
2	8,70 ± 0,07	7,70 ± 0,07	0,00	0,00
3	9,36 ± 0,20	8,16 ± 0,00	7,26 ± 0,35	0,78 ± 0,00
4,5	10,10 ± 0,30	8,50 ± 0,21	7,70 ± 0,28	0,83 ± 0,07
6	10,80 ± 0,80	9,00 ± 0,00	8,30 ± 0,07	0,88 ± 0,14

### II.1.2 Les résultats de l'extrait aqueux



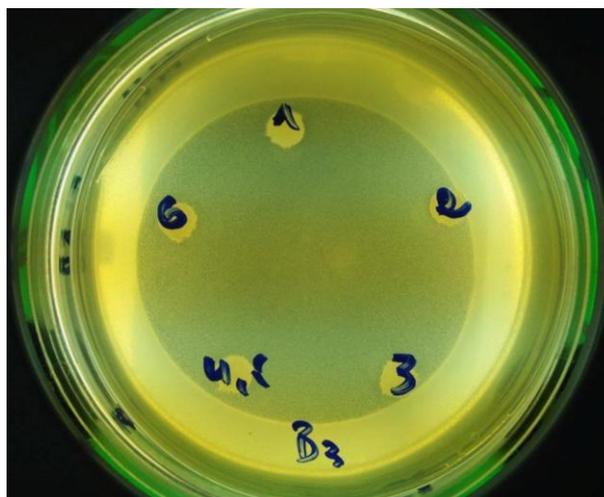
**Figure 35 :** Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait aqueux sur *Staphylococcus aureus*.



**Figure 36** : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait aqueux sur *Escherichia coli*.



**Figure 37** : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait aqueux sur *Pseudomonas aeruginosa*.



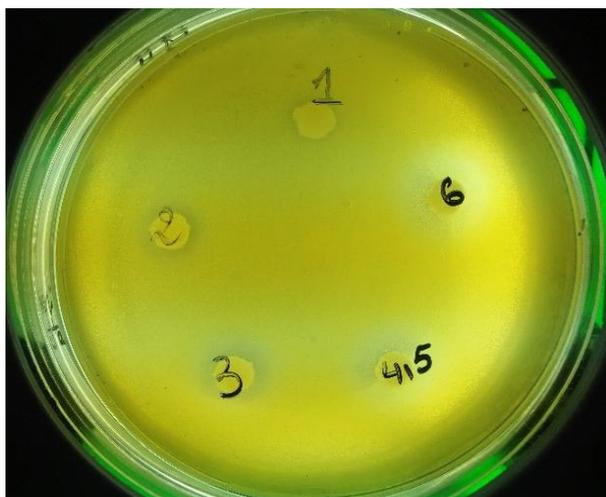
**Figure 38** : Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'extrait aqueux sur *Bacillus subtilis*.

**Tableau 13 :** Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (mm) obtenus par différentes concentrations dans l'extrait aqueux.

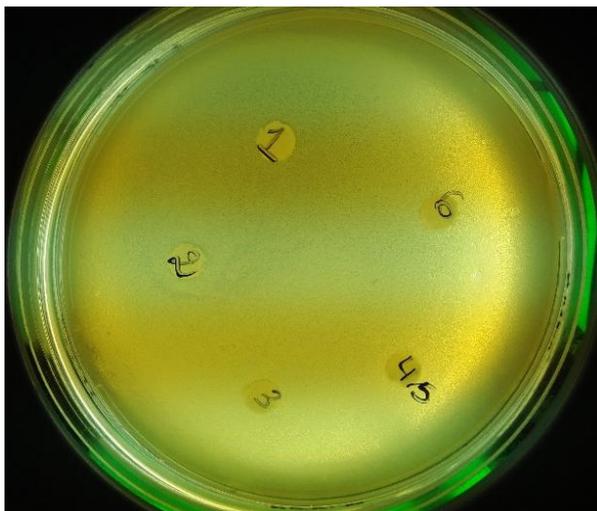
Concentration (mg/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
1	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00
4,5	6,36 ± 0,07	7,06 ± 0,00	0,00	6,46 ± 0,07
6	6,96 ± 0,00	7,60 ± 0,20	0,00	7,23 ± 0,07

Les résultats récoltés à partir des deux extraits (Aq et Mét) ont été comparés à ceux d'un antibiotique (la Spiramycine) :

### II.1.3 Les résultats de l'antibiotique



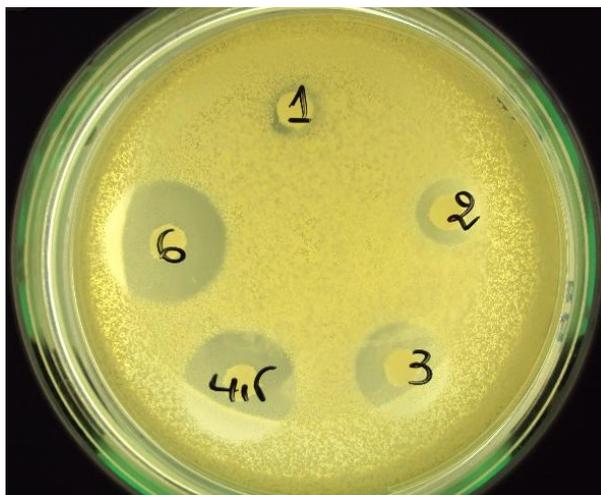
**Figure 39 :** Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique sur *Staphylococcus aureus*.



**Figure 40 :** Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique sur *Escherichia coli*.



**Figure 41 :** Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique sur *Pseudomonas aeruginosa*.

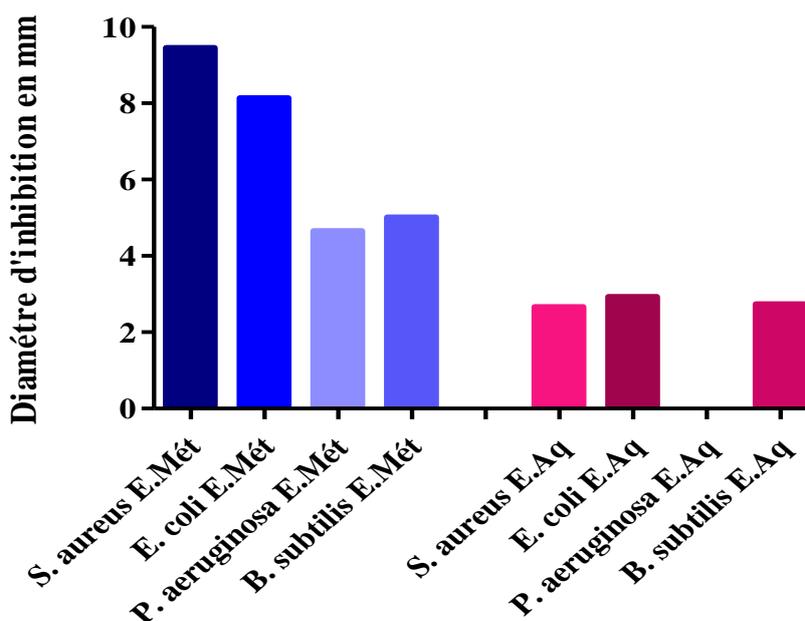


**Figure 42 :** Photo représentative des zones d'inhibition (mm) de l'antibiotique sur *Bacillus subtilis*.

**Tableau 14 :** Diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne (mm) obtenus par différentes concentrations dans l'antibiotique.

Concentration (mg/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
0,0125	8,23 ± 0,07	0,00	0,00	12,56 ± 0,00
0,025	9,03 ± 0,07	0,00	0,00	15,03 ± 0,14
0,050	10,60 ± 0,14	0,00	0,00	16,16 ± 0,07
0,075	13,10 ± 0,07	0,00	0,00	18,46 ± 0,07
0,100	18,26 ± 0,21	0,00	0,00	20,30 ± 0,00

Les plantes contiennent de nombreux composés dotés d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes...etc. (Rojas et al., 1992), le pouvoir antimicrobien des extraits de plante est tributaire de leurs compositions biochimiques.



**les souches bactériennes**

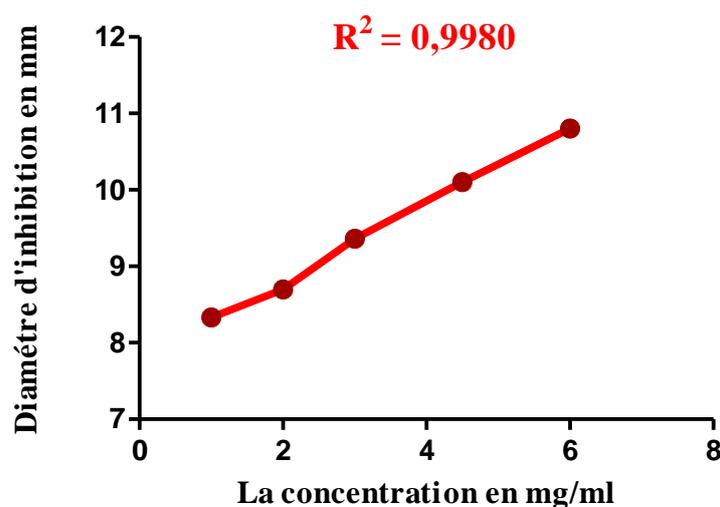
**Figure 43 :** Les différents diamètres d'inhibition des extraits sur les quatre souches bactériennes testés.



Les deux extraits se révèlent actifs avec un degré différent, et cela est lié à la présence des substances actifs (polyphénols E.Aq  $39,966 \pm 2,555$ , E.Mét  $26,989 \pm 2,016$ ), ce qui est confirmé par (Aziz *et al.*, 1998) qui a démontré que l'activité antibactérienne du *Zizyphus lotus* semble être médiée par la teneur en composées phénoliques. D'autres études sur les alcaloïdes ont montré qu'un alcaloïde de cette espèce présente une activité antimicrobienne significative (Ghedira., 1995).

D'après nos résultats, on observe que les grandes zones d'inhibition apparaissent avec l'extrait méthanolique sur *Staphylococcus aureus* (8,33-10,80mm) et *Esherichia coli* (7,33-9,00mm), et pour les deux autres souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, les zones d'inhibition n'apparaissent qu'aux concentrations de 3 ; 4,5 et 6mg/ml. Pour l'extrait aqueux, il y a une inhibition uniquement aux fortes concentrations (4,5 et 6mg/ml) contre trois souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli* et *Bacillus subtilis* (une faible activité), et *Pseudomonas aeruginosa* montre un résultat négatif (pas d'inhibition), ce qui confirme le spectre étroit de l'activité de cet extrait. Donc il y a une activité antimicrobienne à concentration dépendante dans les deux extraits avec une différence hautement significative ( $p \leq 0,0013$ ).

Il en ressort de cette analyse que chaque composé agit différemment sur les microorganismes. C'est-à-dire, qu'un composé peut avoir une action très importante sur un germe (la sensibilité de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* avec l'extrait méthanolique) ou une action moindre, voire même nulle sur un autre (la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* avec l'extrait aqueux).

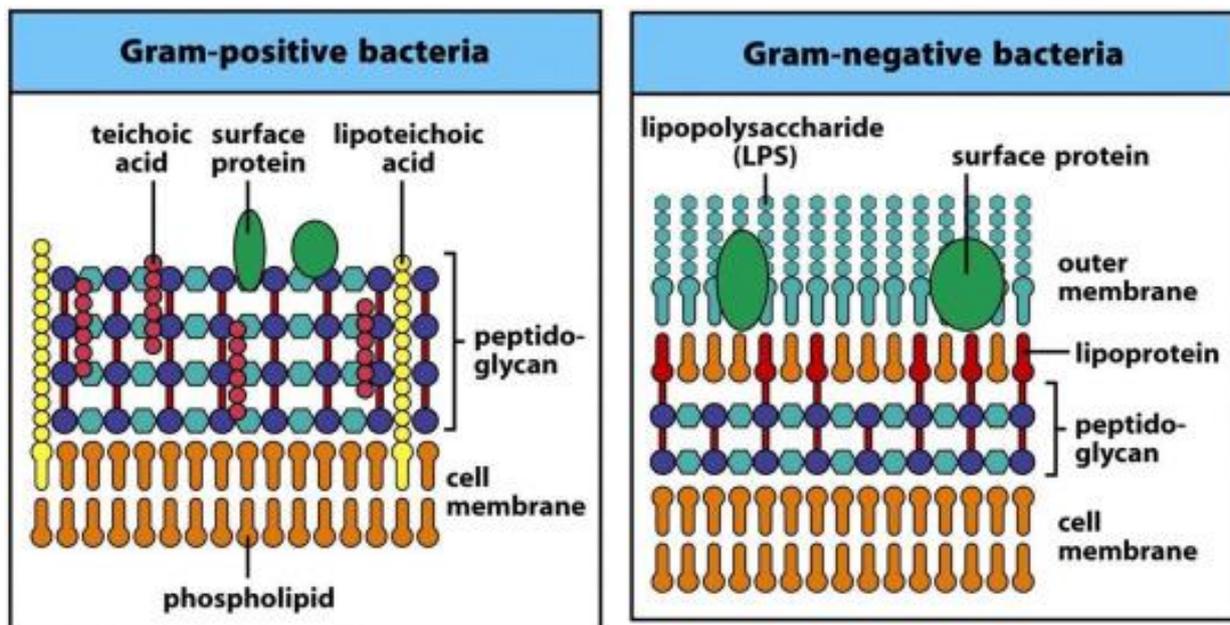


**Figure 44** : Les diamètres d'inhibitions obtenues par l'extrait méthanolique contre *Staphylococcus aureus*.



L'effet inhibiteur le plus puissant est obtenu par l'extrait méthanolique avec *Staphylococcus aureus* (Gram+), où la grande zone d'inhibition est de 10,80mm avec une concentration de 6mg/ml. De ce fait, on peut dire qu'il y a une corrélation très hautement significative entre la concentration et le diamètre d'inhibition ( $p \leq 0.0001$ ).

Il apparaît que *Staphylococcus aureus* (Gram+) est la bactérie la plus sensible par comparaison avec les autres souches (Gram-), ceci peut être attribué à la différence de la structure entre les bactéries à Gram positives et ceux à Gram négatives. La paroi cellulaire des bactéries à Gram positives est constituée d'une seule couche, alors que la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatives a une structure multicouche liée par une membrane cellulaire externe (Ali-Shtayeh *et al.*, 1998).



**Figure 45 :** La différence entre les parois bactéries à Gram+ et des bactéries à Gam- [Site7].



Les zones d'inhibition obtenue par l'antibiotique (Spiramycine) sont seulement apparues avec *S. aureus* et *B. subtilis* (Gram+), avec des diamètres différents.

Les résultats obtenus par l'antibiotique avec *Staphylococcus aureus* sont presque les mêmes obtenus par l'extrait métanolique, mais avec des concentrations plus grandes. À une concentration de 0,0125mg/ml d'antibiotique, nous avons obtenu une zone d'inhibition de  $8,23\text{mm} \pm 0,07$ , et presque le même diamètre apparaît avec l'extrait méthanolique :  $8,33\text{mm} \pm 0,07$  à une concentration de 1mg/ml.

L'activité antimicrobienne de l'antibiotique est toujours plus supérieure même à de faibles concentrations par rapport à l'extrait méthanolique et aqueux (2 fois plus par rapport à l'E.Mét et 3 fois plus par rapport à l'E.Aq) qui se présentent à des concentrations plus importantes.

L'activité antibactérienne peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes, qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, soit par la chélation des ions métalliques (tels que le fer) et l'emprisonnement des substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al*, 2005).



## II.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des deux extraits méthanolique et aqueux de *Zizyphus lotus* a été évaluée *in vitro* selon la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible (Benzie et Strain, 1996). Il est universel et peut être appliqué aussi bien chez les plantes que les plasmas, et dans les extraits organiques et aqueux (Li *et al.*, 2008)

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de  $Fe^{+3}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en ( $Fe^{+2}$ ). La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotomètre UV-VIS à 700nm (Chung *et al.*, 2002).

En d'autres termes, le système  $FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$  confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi-quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction Redox (Amarowicz *et al.*, 2004).

Le changement de la couleur des solutions du jaune vers un bleu vert confirme que les deux extraits ont un pouvoir réducteur du fer, donc ils ont une activité antioxydante mais avec une différence hautement significative ( $p \leq 0,0035$ )

### II.2.1 Les résultats des deux extraits

**Tableau 15** : La réduction du fer des deux extraits.

[C] (mg/ml)	D.O Extrait aqueux	D.O Extrait méthanolique
<b>0,50</b>	0,275	0,106
<b>1,25</b>	0,444	0,244
<b>2,50</b>	0,589	0,452
<b>5,00</b>	0,983	0,808
<b>7,50</b>	1,563	1,098
<b>9,00</b>	1,875	1,178
<b>10,00</b>	1,550	0,927



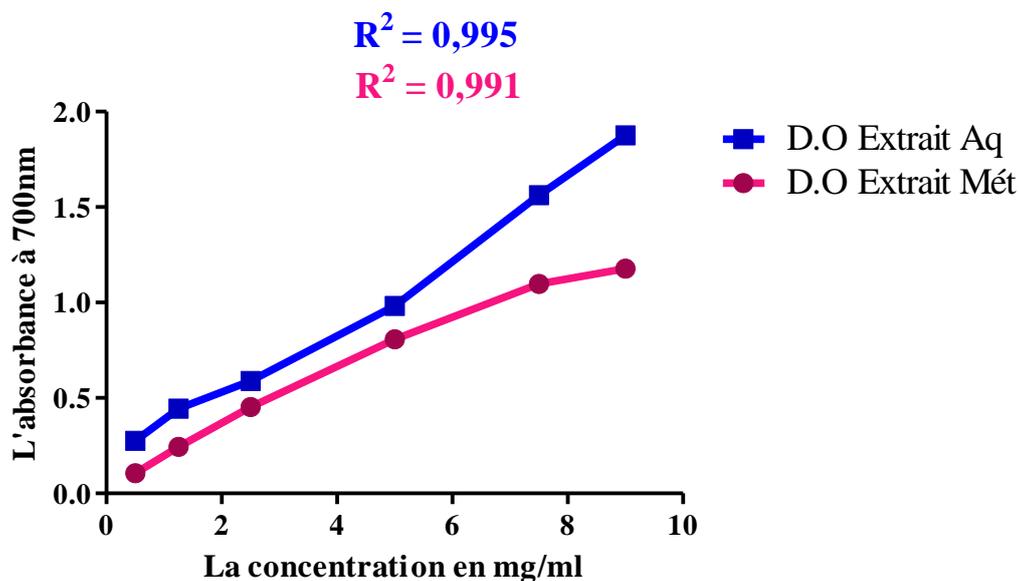


Figure 46 : L'évolution de la réduction du fer des deux extraits.

Le pouvoir réducteur des extraits du *Zizyphus lotus* est probablement dû à la présence des groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme réducteurs et inactivateurs des oxydants (Siddhuraju et Becker, 2007).

L'extrait méthanolique se révèle moins actif que l'extrait aqueux, ces résultats peuvent être expliqués par la richesse de ce dernier en polyphénols ( $39,9667 \pm 2,5554$ ) et en flavonoïdes ( $4,3719 \pm 0,9226$ ) comparé à l'extrait méthanolique (polyphénols  $26,989 \pm 2,0168$  et flavonoïdes  $3,2608 \pm 1,3140$ ). Ces mêmes résultats sont aussi confirmés par la CCM au cours de la révélation chimique par le DPPH, où on peut observer la disparition de la couleur violette du DPPH et l'apparition d'une couleur jaune fluorescente sur un fond violet pour les deux extraits, sachant qu'il y a plus de molécules et plus de couleur dans l'extrait aqueux que méthanolique, cette couleur pourrait s'expliquer par la présence des substances qui disposent d'une activité antioxydante importante.

L'activité antioxydante des deux extraits de la plante étudiée, est une activité à concentration dépendante avec une corrélation très hautement significative ( $p \leq 0.0001$ ).



Le contrôle positif est représenté par des solutions de deux antioxydants standards : l'acide ascorbique et l'acide gallique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

### II.2.1 Les résultats des deux standards

Tableau 16 : La réduction du fer des deux standards.

[C] (mg/ml)	D.O Acide Gallique	D.O Acide Ascorbique
0.005	0,114	0,038
0.012	0,326	0,113
0.025	0,640	0,261
0.05	0,965	0,448
0.075	1,211	0,638
0.09	1,660	0,626
0.1	1,873	0,647

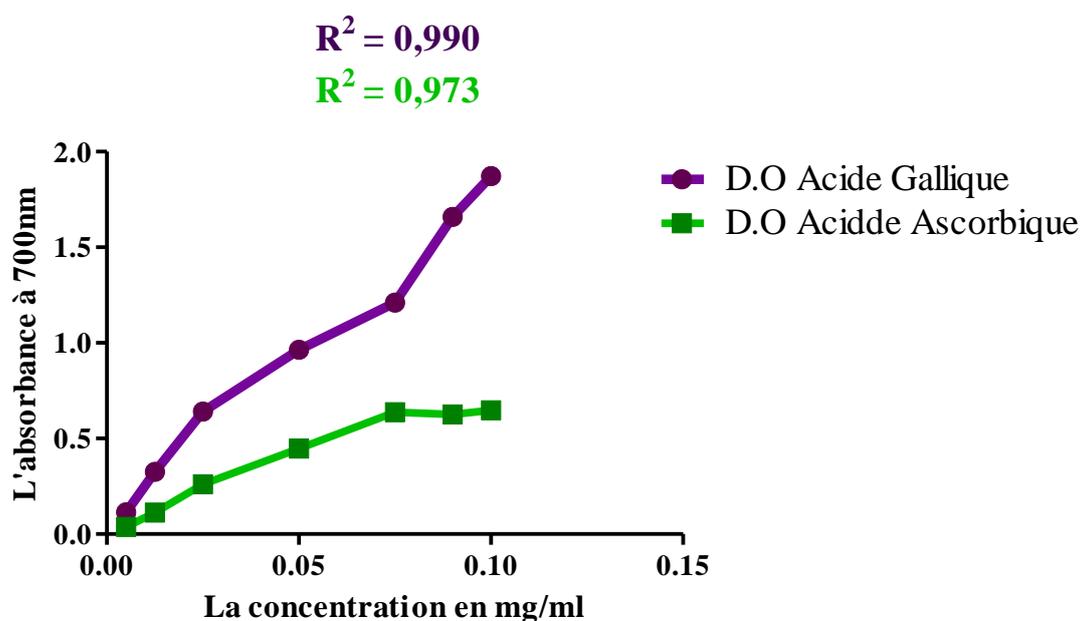


Figure 47 : L'évolution de la réduction du fer des deux standards.



D'après le profil de la figure présentée ci-dessus, il est évident que les deux standards exercent une activité antioxydante mais avec une différence très hautement significative ( $p \leq 0,0001$ ).

L'acide gallique présente une activité plus forte que l'acide ascorbique, ces résultats sont en accord avec les travaux de Alothmane *et al.*, en 2009, qui ont montré que les composés phénoliques et principalement les flavonoïdes des différentes sources botaniques, agissent comme puissant antioxydants encore plus que la vitamine C (Acide ascorbique).

L'activité antioxydante des deux standards à des faibles concentrations est toujours plus supérieure par rapport à l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux qui se présentent à des concentrations plus importantes.



## **Conclusion et Perspectives**

L'Algérie dispose d'une diversité floristique exceptionnelle, plusieurs espèces sont utilisées en pharmacopée traditionnelle comme remède pour soigner les différentes maladies et les infections.

L'étude des activités biologiques *in vitro* des deux extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus*, nous a permis d'extraire des résultats curieux.

Les analyses qualitatives effectuées ont mis en évidence la présence des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tanins et des saponines dans ces extraits, et la chromatographie sur couche mince analytique sur gel de silice, a démontré après révélation physique et chimique la présence d'une multitude de variétés de composés phénoliques : la quercitrine, l'épicatéchine et la naringénine dans l'extrait méthanolique, l'épicatéchine et la naringénine dans l'extrait aqueux.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des phénols totaux en adoptant la méthode de Folin ciocalteu révèle que nos deux extraits contiennent principalement des polyphénols à des concentrations dominantes. De même nous avons dosé les tanins par la méthode de la vanilline, et les flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$  se qui nous mène à remarquer leur présence dans les deux extraits en proportions différentes.

Il ressort de ces analyses que l'extrait aqueux est le plus riche en polyphénols et flavonoïdes, par contre, l'extrait méthanolique est le plus riche en tanins.

La technique utilisée pour étudier l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique et aqueux est la méthode de FRAP qui a révélé que les deux extraits ont une activité antioxydante différentes, sachant que l'extrait aqueux est le plus actif. Ces mêmes résultats sont obtenus par la révélation chimique par le DPPH.

Le test de l'activité antimicrobienne des extraits, par la méthode de diffusion en milieu gélosé, a montré que les deux extraits testés sont actifs vis-à-vis de certaines souches bactériennes. Cependant, il est à noter que les bactéries les plus sensibles aux composés actifs étaient du genre *Staphylococcus* et *Escherichia*.

Les plantes ont évolué au fil du temps et montrent une bonne résistance contre l'invasion bactérienne. Elles constituent une source potentielle pour renforcer la lutte de l'homme contre les bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques, ce qui constitue un problème majeur de santé publique.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in-vitro* ne constitue qu'une petite partie de la recherche des substances et sources naturelles biologiquement actives, nous envisageons comme perspective d'utiliser des méthodes modernes pour l'extraction des principes actifs, et de valoriser leur présence par des techniques précises comme la CPG-SM, la RMN et l'HPLC.

# Références Bibliographiques

## Références Bibliographiques

### Bibliographie

#### A

**Abdoul-Azize S., Bendahmane M., Hichami A, Dramane G., Simonin AM., et al.** (2013). Effects of *Zizyphus lotus* L. (Desf). Polyphenols on Jurkat cell signaling and proliferation. *Int Immunopharmacol*, **15** : 364-371.

**Abedini. A.** (2013). Évaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat. Université du Droit et de la Santé, Lille II. HAL. 2014. p 84- 85.

**Adzu B., Amos S., Amizan M. B., et Gamaniel K.** (2003). Evaluation of the antidiarrhoeal effects of *Zizyphus spina-christi* stem bark in rats. *Acta Tropica*. doi: 10.1016/S0001-706X (03)00114-1, **87** (2): 245-250.

**Ahmad B ., Khan I ., Bashir S ., Azam S ., et Hussain F.**(2011). Screening of *Zizyphus jujuba* for antibacterial, phytotoxic and haemagglutination activities. *Afr J Biotechnol*, **10** : 2514-2519.

**Akowuah G.A., Zhari I., Norhayati I., Sadikun A., et Khamsah S. M.** (2004). Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxyl-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. *Food Chemistry*, **87** : 559-566.

**Ali-Shtayeh M. S., Yagmour R. M. R., Faidi Y. R., Salem K., et Al-Nuri M. A.** (1998). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethno Pharmacology*, **60** : 265-271.

**Alothman M., Bhat R., et Karim A. A.** (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, **115** : 785-788.

**Amarowicz R., Pegg R. B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., et Weil J. A.** (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, **84** : 551-562.

**Ambasta S.P.** (1986). Useful plants of India. *Publications and information directorate, New Delhi, India CSIR*, p 703.

**Anand K. K., Singh B., Chand D., Chandan B. K., et Gupta V.** (1989). Effect of *Zizyphus, sativa* leaves on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, **27** : 121-127.

**Anthony O., Nada E., Youssef E., Paulette B. M, Toufic J. R., et Richard G. M.** (2010). Identification et Caractérisation de Composes Phénoliques extraits du Raisin Chateau ksara. *Lebanese Science Journal*, **11** (2) : 119-122.

**Arnal-Schnebelen B.** (2004). La place de la phytothérapie dans l'arsenal des traitements mis en œuvre par les médecins généralistes. Paris : Pierre Fabre.

**Aspenström-Fagerlun B., Tallkvist J., Ilbäck N. G., et Glynn A. W.** (2015). Oleic acid increases intestinal absorption of the BCRP/ABCG2 substrate, mitoxantrone, in mice. doi :10.1016/j.toxlet.2015.06.009. *Toxicology Letters*, **237** (2): 133-139.

**Aug-chevalier.** (1939). *Zizyphus* de l'ancien monde et l'utilisation de leur fruits. *Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale*. Année 1947, **27** (301) : 470-483.

**Awika J. M., et Rooney L. W.** (2004). Sorghum phytochemicals and their impact on human health. *Phytochemistry*, **65** : 1199-1221.

**Ayoola G. A., Ipav S. S., Solidiya M. O., Adepoju-Bello A. A., Coker H. A. B. et Odugbemi T. O.** (2008). Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of *Allanblackia floribunda* oliv (Guttiferae). *International journal of health research*, **1** (2): 81-93.

**Aziz N. H., Farag S. E., Mousa L. A. A., et Abo-Zaid M. A.** (1998). Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*, **93** (374) : 43-54.

## B

**Baba Aissa F.** (1999). Encyclopédie des plantes utiles, flores d'Algérie et du Maghreb. Edition Librairie Moderne. Alger. Rouiba. *Copyright librairie*. p 368.

**Bach S., Piotton S., Vilarino R. et Waelti F.** (2006). Les médecines parallèles. Immersion en communauté. p 13.

**Bahorum T.** (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne. Une source d'approvisionnement potentielle Food and Agricultural Research council Mauritian. p 83-94.

- Bakchiche B., Gherib A., Smail A., Cutodia G et Graca M.** (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46 : 85-96.
- Bakhtaoui F.Z., Lakmichi H., Megraud F., Chait A., et Gadhi C.E. A.** (2014). Gastro-protective, anti-*Helicobacter pylori* and, antioxidant properties of Moroccan *Zizyphus lotus* L. doi: 10.7324/japs.2014.40115. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4 (10) : 81-87.
- Bellakhdar J., Claisse R., Fleurentin J. et Younos C.** (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 35 : 123-143.
- Belyagoubi N., et Benhammou N.** (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat en biologie, université Aboubakr Belkaïd. Tlemcen. p 12.
- Ben ziane et Yousfi.** (2001). Activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Pistacia atlantica* Desf. *Contribution à l'étude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Djelfa*.
- Benammar C., Baghdad C., Belarbi M., Subramaniam S., Hichami A., et Khan N. A.** (2014). Antidiabetic and antioxidant activities of *Zizyphus lotus* L aqueous extracts in Wistar rats. doi: 10.4172/2155-9600.S8-004. *Journal of Nutrition & Food Sciences*.
- Benammar C., Hichami A., Yessoufou A., Simonin A.M., Belarbi M., et al.** (2010). *Zizyphus lotus* L (Desf) modulates antioxidant activity and human T-cell proliferation. *BMC Complement Altern Med*, 10 : 54.
- Benzie I.F.F., et Strain J. J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239 : 70-76. *Revue « Nature & Technologie »*. B- Sciences Agronomiques et Biologiques, Juin 2013. 9 : 19.
- Besançon.** (2012). Progrès en dermato-allergologie. Groupe d'étude et de recherche en dermato-allergologie. Edition John libbey eurotext. p 111.
- Beta T., Nam S., Dexter J. E., et Sapirstein H. D.** (2005). Phenolic content and antioxydants Activity of Pearledwheat and Roller-Milled. Fractions. *Cereal chem*, 82 (4) : 390-393.
- Boizot N., et Charpontier J. P.** (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*. p 79-82.
- Bonnet J.** (2001). Larousse des arbres. *Dictionnaire des arbres et des arbustes*. p 512.

**Borgi W., et Chouchane N.** (2009). Anti-spasmodic effects of *Zizyphus lotus* (L) Desf. Extracts on isolated rat duodenum. doi: 10.1016/j.jep.2009.09.022. *Journal of Ethnopharmacology*, **126** (3): 571-573.

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

**Borgi W., Recio M. C., Ríos J. L., et Chouchane N.** (2008). Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L) Lam. *South Afr J Bot*, **74** : 320-324.

**Borsato M. L. C., et Souza G. E. P.** (2000). Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora aericoides*. *Phytochemistry*.

**Botosoa J. A.** (2010). Purification et caractérisation chimique et biologique partielles des principes actifs des extraits de feuilles de *Pechia madagascariensis* (apocynaceae). Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme d'Études Approfondies (DEA) Université d'Antananarivo. *Mémoire en ligne*. p 13.

**Bougandoura N., et Bendimerad N.** (2012). Effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp.* (Nepeta) briq. *Revue des Bio Ressources*, **2** :1-7.

**Bougandoura N., et Bendimerad N.** (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technologie*, (9) : 15.

**Brouillard R., Figvire P., El habiri M., et Dangles O.** (1997). Molecular interaction of phenolic compounds in relation to the color of fruit and vegetables. In : **Sarni-Manchado P., et Cheynier V.** (2006). les polyphénols en agroalimentaire. Edition TEC et DOC.

**Brunet S., Jackson F., et Hoste H.** (2008). Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal for Parasitology*, **38** : 783-790.

**Bruneton J.** (1999). Flavonoïdes, Pharmacognosie, Phytochimie. *Plantes médicinales*. 3eme Edition : TEC et DOC. Paris. p 310-340.

**Bruneton J.** (1993). Pharmacognosie phytochimie. *Plantes médicinales* .2ème édition.

**Caroline G et Michel P.** (2013). Guide de poche de phytothérapie acné, migraine, ballonnements... Soignez-vous avec les plantes. Edition Quotidien malin. p 13-21.

## C

**Cavalier C., Dupriez C., Huret J. M., Louisar L., Nebon D., Mence L., et al.** (2015). La phytothérapie ou « l'art de soigner par les plantes... ». La Phytothérapie parmi les autres moyens thérapeutiques. Unité d'enseignement 2.11 semestre 5 « pharmacologie et thérapeutiques ». p 12.

**Chabrier J. Y.** (2010). Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Université Henri Poincaré, Nancy 1 faculté de pharmacie Année universitaire 2009-2010. p 107.

**Chehema A.** (2006). Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Laboratoire de protection des écosystèmes en zone arides et semiarides, Univ. Kasdi Merbah, Ouargla. 140 p.

**Chen H. Q., Jin Z. Y., Wang X. J., Xu X. M., Deng L., et Zhao J. W.** (2008). Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation induced in jury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience Letters*, **448** (2): 175-9.

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

**Chung K., Wong T. Y., Wei C., Huang Y., et Lin Y.** (1998). Tannins and hman health. *Crit.Rev. Food Sci. Nutr*, **38** : 421-464.

**Chung Y. C., Chang C. T., Chao W. W., Lin C. F., et Chou S. T.** (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (24): 54-2458.

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

**Colette C.** (2007). Aromathérapie et les huiles essentielles. Edition Masso/Réflexo. p 3.

**Cordell G.A., et Colvard M.D.** (2005). Some thoughts on the futures of ethno-pharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*, **100**: 5-14.

**Cowan M. M.** (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Re*, **12** (4): 564-582.

**Crozie A., Clifford., M. N., et Ashihara H.** (2006). Plant Secondary Metabolites. *Occurrence*, p 1175-6.

## D

**Daayf F., et Lattanzid V.** (2008). Recent Advances in Polyphenol Research 1. Edition WILEY BLACKWELL. p 1-24.

**Danja S., Jonas G., Nathalie W., et Katharina O.** (2016). *Bacillus subtilis*. iGEM team: Bonn – Freiburg.

**Debuigne G.** (1974). Larousse des plantes qui guérissent, Edition Larousse.

**Delphine L.** (2008). Etude pharmacochimique et chimiotaxonomique d'éponges du genre *Dysidea*. Mémoire master. Ecole de Chimie Physique et Electronique de Lyon. p 68.

**Di carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., et Capasso F.** (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review Life Science*, **65** : 337-353.

**Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., et al.** (2004) Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *CR Chimie*, **7** : 1073–80.

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

**Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., et Vidal N.** (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *J. Food Chem*, **97** : 654–660.

**Dohou N., Yani K., Thahrouch S., Idrissi Hassani L. M., Badoc A., et Gmira N.** (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro- Marocaine, *Thynelaea lythroides*. *Bull.Soc. Pharm.Bordeaux*, **142** : 61-78.

**Dr. Halfon R.** (2011). La gemmothérapie : la santé par les bourgeons. Edition Dangles. p 13.

**Dulger B., et Gonuz A.** (2004). Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences*, **7** (9) : 1559-1562.

**Dunière L., Thevenot-Sergent D., et Loukiadis E.** (2012). Les *Escherichia coli* zoonotiques pathogènes. Bultin des GTV. France. p 117.

## E

**Ebrahimzadeh M. A., Pourmmorad F., et Hafezi S.** (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish journal of biology*, **32** : 43-49.

**Edenharder R., et Grünhage D.** (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert tyhydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium*TA102. *Mutat. Res*, **540** : 1-18.

**Eloff J.N.** (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of Antimicrobial components from plants? *Journal of Ethno-pharmacology*, **60** : 1-8.

**Elqaj M., Ahami A., et Belghyti D.** (2007). La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "*ressources naturelles et antibiotiques*". Maroc.

## F

**Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D., et Guo Z.** (1986). Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, **64** (2) : p 159-175.

**Ferguson L. R., Chavan R. R., et Harris P. J.** (2001). Changing concepts of die taryfiber : implication for carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, **39** (2): 155-169.

## G

**Gamet-Payraastre L., Manenti S., Garatacap M. P., Tulliez J., Chap H., et Payraastre B.** (1999). Flavonoids ans the inhibition of PKC and PI3-kinase. *General Pharmacology*, **32** : 279-286.

**Georgé S., Brat P., Alter P., et Amiot M. J.** (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant derived product, *J. Agric. Food Chem*, **53** : 1370-1373.

**Ghaisas M., Navghare V., Takawale A., Zope V., et Deshpande A.** (2008). Invitro antioxidant activity of tectona grandis linn. *Pharmacology online*. (3): 300.

**Ghazghazi H., Aouadhi C., Riahi L., Maaroufi A., et Hasnaoui B.** (2014). Fatty acids composition of Tunisian *Ziziphus lotus* L (Desf.) fruits and variation in biological activities between leaf and fruit extracts. doi: 10.1080/14786419.2014.913244. *Natural Product Research*, **28** (14): 1106-1110.

**Ghazi F., et Sahraoui S.** (2005). Évolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia, mémoire d'ingénieur en agronomie. El Harrach.

**Ghedira K., Chemli R., Caron C., Nuzillard J. M., et Zeches M.** (1995). Le Men-Olivier L: Four cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus lotus*. *Phytochemistry*, **38** :767-772.

**Glombitza K.W., Mahran G.H., Mirhom Y.W., Michel K.G., et Motawi T. K.** (1994). Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of *Zizyphus spina-christi* in rats. *Planta Med*, **60** : 244-247.

**González-Gallego J., Sánchez-Campos S., et Tuñón M. J.** (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, **22** (3) : 287.

**Guignard J. L.** (2000). Biochimie végétal. 2<sup>ème</sup> Edition: Dunod. p 188.

## H

**Hagerman A. E.** (2002). Tannin Chemistry ([www.users.muohio.edu/hagermae](http://www.users.muohio.edu/hagermae)).

**Hans W. K.** (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p 6-7.

**Haslam E.** (1989). Plant polyphenols. *vegetale tannins revisited cambridge University Pres, Combridge*. p 230.

**Havsteen B. H.** (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Edition Nov-Dec. *Pharmacol Ther*, **96** (2-3): 67-202.

**Heimler D., Vignolini P., Giulia Dini M., Francesco Vincieri F., et Rmani A.** (2006). Antiradi-cal activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, **99** : 464-469.

**Hennebelle T., Sahpaz S., et Bailleul F.** (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1** : 3-6.

**Herbert R. B.** (1989). The Biosynthesis of secondary metabolites. 2<sup>ème</sup> Edition: Chapman and Halle. p 2, 11-115.

**Hodek P., Trefil P., et Stiborová M.** (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, **139** : 1-21.

**Hopkins W. G.** (2003). Physiologie végétale. 2<sup>ème</sup> Edition américaine : Boeck et Lancier S A, Paris. p 514.

**Hseini S., et Kahouadji A.** (2007). *Lazaroa*, **28** : 79-93.

**Huck C. W., Huber C. G., Ongania K. H., Bonn G. K., et Chromatogr J. A.** (2000). **870** : 453-462.

## I

**IESV Institut européen des substances végétales.** (2015/2016). Les plantes médicinales. Association loi 1901. Document réservé à l'usage des professionnels de la santé. p 3.

**Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., et al.** (2001). Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Edition Larousse. p 6-12.

## J

**Jang Y. S., Malavia A., et Lee S. Y.** (2013). (110/16) : 1646-52 doi.10.1002/bit.24843.Epub.

**Jeong S. M., Kim S. Y., Kim D. R., Jo S. C., Nam K. C., Ahn D. U., et Lee S. C.** (2004). Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52** : 3389-3393.

**Jeyakumar S. M., Vijaya Kumar P., Giridharan N. V., et Vajreswari A.** (2011). Vitamin A improves insulin sensitivity by increasing insulin receptor phosphorylation through protein tyrosine phosphatase 1B regulation at early age in obese rats of WNIN/Ob strain. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01407.x. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **13** (10): 955-958.

## K

**Karaali A., Boyacioğlu D., Gönez G., et Özçelik B.** (2004). Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality, nutrition and health—STREP or CA. *European commission's the 6th framework programme for research*. Istanbul technical university. Turkey.

**Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. ; et Traoré A. S.** (2005). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maîtrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. 8-11 novembre. Ouagadougou.

**Kato R., Nakadate T., Yamamoto S., et Sugimura T.** (1983). Inhibition of 12-Otet Radecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis*; **4** (10): 5-13.

**Khanbaba K., et Ree T. R.** (2001). Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*, **18** : 641-649.

**Khodjet El Khil M.** (2015). Étude de marché : consommation d'huiles essentielles en Guyane française. Réseau rurale Guyane. L'Europe s'engage en Guyane avec le Feader. Union européenne. Edition Guyarômes. p 4.

**Kumaran A., et Karunakaran R. J.** (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. **40** : 344-352. *Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, Juin 2013. **9** : 14-19.

## L

**Lagnika L.** (2005). Étude Phytochimique et Activité Antipaludique de Substances Naturelles issues de Plantes Béninoises. Thèse de Doctorat Université Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-calavi, Bénin.

**Lahouel M., Boulkour S., Segueni N., et Fillastre J. P.** (2004). The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipide peroxydation and increasing liver glutathion concentration. *Pathologie Biologie*, **52** : 314-322.

**Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., et Hseini S.** (2009). Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaer. Maroc Occidental. *Lejeunia*, **186** : 16.

**Langewald, J., et Schmutterer H.** (1992). Effets du traitement à l'huile de neem sur la phase du criquet pèlerin. p 143-145. In : **Lomer C. J et Priorc.** La lutte biologique contre les acridiens. *CAB International*, Wallingford. p 400.

**Lee K. H.** (2004). Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product lead, *Journal of Natural Products*, **67**: 273-283.

**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. *J. Agric. Food Chem*, **51**: 7292-7295.

**Les vitamines.** (2010/2011). Collège des Enseignants de Nutrition. Support de Cours (Version PDF).

**Li H. B., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K. W., Chen F., et Tian Y.** (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, **102** : 771-776.

**Li H. B., Wong C. C., Cheng K. W., et Feng C.** (2008). Antioxidant properties in vitro and total Phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel- Wissenschaft and Technology*, **41** (3): 385-390.

**Liao C. H., Lai C. C., Hsu M. S., Chu F. Y., Wu M. Y., Huang Y. T., et Hsueh P. R.** (2010). Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35** (5) : 457-60.

**Loo J. A., Udseth H. R., Smith R. D., et Biochem.** (1989). p 179, 404.

## M

**Maarouf A.** (2000). *Dictionnaire botanique*. p 129.

**Macheix J., Fleuriet A., et Jay allemand C.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*. p 4-5.

**Macheix, J. J., Fleriet, A., et Christian, A.** (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. PPTUR Lausanne.

- Mahmoudi S., Khali M., et Mahmoudi N.** (2012). Étude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques 2013*, **9** : 36.
- Makkar H. P. S.** (2000). Quantification of tannins in tree foliage: Working document. In: *FAO/IAEA*, Vienna.
- Mamadou B.** (2002). Actions pharmacologiques des tanins. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. p 53.
- Marfak A.** (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de Leur reactivite avec les radicaux issus des Alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat. Limoges.
- Martin M. J., Motilva B., et Lastra C. A.** (2007). Quercetin and Naringenin Effects on Ulcer. *Phytotherapy Research*. p 150-153.
- Maury S., et Legrand M.** (2000). Étude des O-méthyltransferases de la voie des phénylpropanoïdes dans le tabac et modulation de leur expression dans les tabacs transgénique : conséquences sur la synthèse de la lignine et d'autres composés phénoliques et sur la résistance aux agents pathogènes. *INIST-CNRS, cote INVIST: T 127548*. Université de Strasbourg. France.
- Mazza G., et E., Miniati.** (1993). Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. *Food/Nahrung*, **38** (3) : 199.
- Mbaebie B. O., Edeoga H. O., et Afolayan A. J.** (2012) Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p 118-124.
- Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S.** (2005). Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. *Centre européen de santé humanitaire –Lyon*.
- Misirli A., Kuden A., Demir G., et Gulcan R.** (2001). Determination of phenolic compounds in some almond hybrids varying in resistance to *Pseudomonas amygdali*. *Cah. Opt. Med.* **56** : 71-87.
- Mompon B., Lemaire B., Mengal P., et Surbled M.** (1998). Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. Edition INRA. Paris. p 145-149.
- Moreau B.** (2003). Maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie.

**Morigane.** (2007). Grimoire des plantes. Ce livre est publié sous la licence libre Creative Commons BYNCND. p 6-8.

**Mothana R. A. A.** (2011). Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of the endemic Soqotraen *Boswellia elongata* Balf. F. and *Jatropha unicostata* Balf. F. in different experimental models. doi: 10.1016/j.fct.2011.06.079. *Food and Chemical Toxicology*, **49** (10): 2594-2599.

**Mukhtar H. M., Ansari S. H., Ali M., et Naved T.** (2004). *J. Pharm. Biol*, **42** : 508-511.

## N

**Narayana K. R., Reddy M. S., Chaluvadi M. R., et Krishna D. R.** (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, **33** : 2-16.

**Nissiotis M., et Tasioula-Margari M.** (2002). Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation. *Food chemistry*. **77** : 371-376. Valorisation des polyphénols extraits des margines en tant qu'antioxydants naturels dans les huiles végétales. In : **Nassif D.** (2004). Mémoire (DEA). Edition INRA France.

**Nitsch J. P., et Nitsch C.** (1961). Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. *Bulletin de la société chimique de France*, **26** : 2237-2240.

**Normala H., et Mardhiah-Hayati A. H.** (2010). Determination and Evaluation of Antioxidative Activity in Red Dragon Fruit (*Hylocereus undatus*) and Green Kiwi Fruit (*Actinidia deliciosa*). *American Journal of Applied Sciences*, **7** (11) : 1432-1438.

**Nowakowska Z.** (2007). *A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones*. *Eur. J. Med. Chem*, **42** : 125-137.

## O

**Oakes R. S., Clifford A. A., et Rayner C. M.** (2001). The use of supercritical fluids in synthetic organic chemistry. *J. Chem. Soc*, **1** : 917-941.

**Obermeier M.T., White R. E., et Yang C. S.** (1995). Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Pharm. Res*, **25** (6): 575-84.

**Ochoa J. J., Quiles J. L., Ramírez-Tortosa M. C., Mataix J., et Huertas J. R.** (2002). Dietary oils high in oleic acid but with different unsaponifiable fraction contents have different effects in

fatty acid composition and peroxidation in rabbit LDL. *Nutrition*. doi: 10.1016/S0899-9007(01)00732-8, **18** (1): 60-65.

**Osato M.** (2009). Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **17** (1) : 39-44.

**Ou B., Hampsch-woodill M., et Prior R. L.** (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (49): 4619-4626.

## P

**Parekh J., et Chanda S. V.** (2007). *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology*, **31** : 53-58.

**Park H. J., et Cha H. C.** (2003). Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society*, **7** : 327-330.

**Peronny S.** (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta). Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle. Discipline Eco-Ethologie. p 151.

**Pharmacopée Européenne 8.0.** (2008).

**Piquemal G.** (2008). Les flavonoïdes (en ligne) : [http://www.detoursante.com/index.php ? Option=com\\_content&view=article&id=166&Itemid=15](http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=15).

**Pressler T., Bohmova B., Conway S., Dumciusd S., Hjelte L., Høiby N., Kollbergf H., Tümmlerg B., et Vavrovab V.** (2011) Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition, *EuroCareCF Working Group report*, **10** (2) : 75-78.

**Prior R. L., Wu X., et Schaich K.** (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem*, (53): 4290-4302.

## Q

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

## R

**Raffaelli A., Moneti G., Mercati V., et Toja E.** (1997). *J. Chromatogr. A*, **777** : 223-231.

**Ragae S., Abdel-Hal E. S. M., et Noaman K.** (2006). Antioxydant activity and nutrient composition of selected cereals for food use, Science direct, *Food chem*, **98** : 32-38.

**Rahman I., Biswas S. K., et Kirkham P. A.** (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*, **72** : 1439-1452.

**Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P., et Ribéreau-Gayon P.** (1968). Sciences et techniques du vin. Tome 1. Edition. Dunod, Paris. p 671.

**Rice-Evans C. A., et Packer I.** (1998). Flavonoids in Health and Disease. Edition marcel dekker. p 61-160.

**Robert P., Rey-Debove J. et Rey A.** 2010. Le nouveau Petit Robert de la langue française, dictionnaire alphabétique et analogique de la langue française. Edition Le Robert : Paris, France.

**Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., et Mata R.** (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, **35** : 275-283.

**Rosine C., et Momo D.** (2009). Évaluation de l'activité antidermatophytique des extraits au méthanol et fractions d'*Acalyphamma hirtum* (melastomatacees). Université de Dschang – Master en biochimie clinique et pharmacologie

**Rota M. C., Herrera A., Martinez R. M., Sotomayor J. A., et Jordán M. J.** (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control*, **19** : 681-687.

**Rsaissi N., El Kamili B., Bencharki L., et Hillali-Bouhache M.** (2013). *Inter. J. Sci. Eng. Res*, **4** : 1521 –1528.

**Rsaissi N., El Kamili., Bencharki B., Hillali L., et Bouhache M.** (2013). Antimicrobial activity of fruits extracts of the wild jujube *Ziziphus Lotus* (L) Desf. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, **4**: 1521-1528.

**Rsaissi N., et Bouhache M.** (2002). La lutte chimique contre le jujubier. *Transfert de technologie en agriculture*. p 94.

## S

**Saadoudi M.** (2008). Etude de la fraction glucidique des fruits de *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L., et *Zizyphus lotus* L. Mémoire de Magistère en Agronomie. Université de Batna.

**Sarni-Manchado P., et Cheynier V.** (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Edition Lavoisier. p 2-10.

**Schofield P., Mbugua D. M., et Pell A. N.** (2001). Analyses of condensed tannins: a review Animal. *Food and Technology*, **91** : 21-40.

**Sean H., et Timothy R.** (2005). Un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivant avec le VIH. Réseau canadien d'info traitements sida (CATIE). Edition révisée. Canada. Paul R., Saunders, PhD. p 43.

**SFA. Société Française des Antioxydants.** (2005). Compte rendu de la conférence polyphenols (23/24 NOV2005). Institut des corps gras. ITERG.

**Siddhuraju P., et Becker K.** (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, **101** (1): 10-19.

**Sine J. P.** (2003). Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses éditions marketing S A. p 99-101.

**Singleton V. L., Rossi J. A.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture*, (16): 144-153.

**Smythies J. R.** (1998). Every Person's Guide to Antioxidants. Edition British cataloging. p 89-110.

**Soel S. M., Choi O. S., Bang M. H., Yoon Park J. H., et Kim W. K.** (2007). Influence of conjugated linoleic acid isomers on the metastasis of colon cancer cells in vitro and in vivo. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.10.011. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **18** (10): 650-657.

**Stalikas C. D.** (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolicacids and flavonoid. *Review. J. Sep. Sci* : 3268-3295.

**Strang C.** 2006. Larousse medical. Edition Larousse.

## T

**Tail G.** (1998). Action de quelques substrats alimentaires sur quelques *acrididae*. Efficacité entomopathogène de *Pseudomonas fluorescens* (*Pseudomonasaceae*) sur quelques aspects physiologiques du criquet pèlerin. Thèse magister. Sci agro. INA. El harrach-Alger. p 190.

**Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., et Denamur E.** (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*, **8**.

**Terrill T. H., Rowan A. M., Douglas G. B., et Barry T. N.** (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein meals and cereal grains. *J. Sci. Food. Agri*, **58** : 321-329.

**Trease G., et Evance W. C.** (1987). A text book of Pharmacognosy. Tindal, Oxford: ELSB/Bailliere.

**Tringali C.** (2001). Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation Characterisation and Biological Properties. 1ere Edition: taylor & francis. p 1-24, 339- 367.

**Tschesche R., et Kaubmann E. U.** (1975). In: Manske R (ed) Thealkaloids. *HF Academic Press, New York*, **15**: 165-205.

## V

**Vansant-Greet I. R.** (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base. *Département nutrition, ku leuven et departement dietetique, gasthuisberg*.

**Verpoorte R., et Alfermann A.W.** (2000). Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Edition Kluwer Academic. p 1-23.

## W

**Wahida B., Abderrahman B., et Nabil C.** (2007). Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extracts. *J Ethnopharmacol*, **112** : 228-231.

**Walsh C.** (2003). *Nat. Rev, Microbiol*, **1** : 65-70.

**Walton N. J., et Brown D. E.** (1999). *Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products*. Edition World Scientific. p 1-14.

**Wang J., et Mazza G.** (2002). Effect of Anthocyanins and other phenolic compounds on the production of Tumor Necrosis Factors  $\alpha$  in LPS/IFN- $\gamma$ -Activated RAW.264.7. Macrophages. *J.Agric.Food.Chem*, **50** : 4183-4189.

**Waridel J. L., Wolfreder K., Ndjoko K. R. Hobby., et Chromatogr J. A.** (2001). **926** : 29-41.

**W-Erdman J., Balentine J. D., Arab L., Beecher G., Dwyer J. T., Folts J., et al.** (2007). Flavonoids and heart health: Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition*, **137** (3 suppl): 718-737.

**Wichtl M et Anton R.** (2003). *Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. 2ème édition. Edition TEC & DOC. p 161.

**Wilps H., Nasseh O., Krall S., et Salissou G. B.** (1992). Les effets d'inhibiteurs de croissance et de biocides végétaux sur les larves de *Schistocer cagregaria* (Forsk., 1775). *Rev Sahel PV Info*, **45** : 5-19.

**Wong S. P., Leong L. P., et William Koh J. H.** (2006). Antioxidant activities of extracts of selected plants. *Food chemistry*, **99** : 775-783.

**World Health Organisation (WHO).** (2000). A report of the consultation meeting on traditional and modern medicine. *Harmonizing two approaches, Beijing, China*. p 22-26.

## Y

**Yao L. H., Jiang Y. M., SHI J., Tomas-Barberan F. A., Datta N., Singanusong R., et Chen S. S.** (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant Food Human Nutrition*, **59** : 113-122.

**Yoon J. I., Al-Reza S. M., et Kang S. C.** (2010). Hair growth promoting effect of *Zizyphus jujuba* essential oil. *Food Chem Toxicol*, **48** : 1350-1354.

## Z

**Zimmer N., et Cordesse R.** (1996). Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. Edition INRA. *Prod Anim*, **9** : 167-179.

## Webographie

[Site1] <https://www.carenity.com/infos-maladie/spondylarthrite-ankylosante/phytotherapie-ou-se-soigner-par-les-plantes-740>.

[Site2] <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/phytoth%C3%A9rapie/15365>.

[Site3] <http://www.cosmopolitan.fr/lutter-contre-les-douleurs-articulaires-avec-la-phytotherapie,1905201.asp>.

[Site4] <http://www.iqrashop.com/Feuilles-de-sidr-jujubier-pour-la-roqya--Roqya-protection-p6095-.html>

[Site5] <file:///C:/Users/hds/Desktop/mémoire/SaharaNature%20%20zizyphus%20lotus.html>.

[Site6] <http://www.cnrtl.fr/definition/lyophilisation>.

[Site7] <https://theartofmed.wordpress.com/2015/08/28/bacterial-taxonomy-1-classification-based-on-morphology-and-the-gram-stain/>

## Étude phytochimique et biologique des extraits aqueux et méthanolique des écorces des racines du *Zizyphus lotus* (L).

Option : Biochimie / Biochimie Moléculaire et Santé.

### Résumé :

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. Dans ce contexte nous avons tenté d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante des différents extraits préparés à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus*, ces extraits ont été obtenus par macération dans deux solvants polaires : l'eau et le méthanol. Les rendements respectifs sont : 8,2794g/100g de poudre, 21,8669g/100g de poudre.

L'analyse qualitative de ces extraits par les tests préliminaires et la CCM a révélé la présence des composés phénoliques, des tanins, des flavonoïdes et des saponines dans les deux extraits, ceci est confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage des composés phénoliques, des tanins, et des flavonoïdes dont les valeurs sont : pour les composés phénoliques ( $26,989 \pm 2,0168\mu\text{g EAG/mg d'extract}$ ), les tanins ( $21,9233 \pm 1,5739\mu\text{g ECT/mg d'extract}$ ) et les flavonoïdes ( $3,2608 \pm 1,3140\mu\text{g EQ/mg d'extract}$ ) dans l'extrait méthanolique, et ( $39,9667 \pm 2,5554\mu\text{g EAG/mg d'extract}$ ), ( $14,5105 \pm 2,755\mu\text{g ECT/mg d'extract}$ ), ( $4,3719 \pm 0,9226\mu\text{g EQ/mg d'extract}$ ) respectivement dans l'extrait aqueux.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits a révélé une puissante activité de l'extrait méthanolique contre *Staphylococcus aureus*, dont la zone d'inhibition la plus grande est de  $10,80 \pm 0,80\text{mm}$ , par comparaison avec les autres souches bactériennes testées. Par contre l'extrait aqueux est révélé moins actif.

L'activité antioxydante a été établie par la méthode de FRAP in vitro, les résultats obtenus démontrent la présence des principes actifs antioxydants dans les deux extraits avec des proportions différentes.

**Mots clés :** *Zizyphus lotus*, composés phénoliques, flavonoïdes, tanins, activité antimicrobienne, *Staphylococcus aureus*, activité antioxydante, FRAP.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Biochimie RDC ; Laboratoire N°10 et 15 ; Laboratoire d'analyse pharmaceutique « ISOPHARM ».

Jury d'évaluation :

**Président :** Mr. NECIB Youcef (Pr-UFM Constantine).

**Rapporteur :** Mme. DJEMAI ZOUGHLACHE Soumia (MA-UFM Constantine).

**Examineurs :** Mme. BAHY Ahlem (MA-UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 28/06/2017.