



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine1

جامعة الأخوة منتوري قسنطينة 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

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 Appliquée

**Intitulé:**

---

## **Etude phytochimique et l'évaluation *in vitro* des activités antioxydantes, anticholinestérase, antidiabétique et anti-inflammatoire des extraits d'*Eriobotrya japonica***

---

Présenté et soutenu par : **BAADECHE TAKOUA BALKISS**

Soutenu le : 27/09/2020

**BENHACINE MANEL**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :** Mr. MOKRANI (MAA - UFM Constantine1).

**Rapporteur :** M<sup>me</sup>. KLIBET (MCB- UFM Constantine1).

**Examinatrice :** M<sup>me</sup>. TENIOU (MAA- UFM Constantine1).

**Année universitaire**

**2019 -2020**

## Remerciements

Tout d'abord, nous remercions **Dieu** tout puissant qui nous a donné la force et la chance d'achever ce modeste travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme **KLIBET F** maitre de conférences « B » à l'université des frères mentouri, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils qui ont contribué pour la réalisation de ce mémoire.

Nous tenons à remercier Mr **MOKRANI E.H** maitre assistant « A » à l'université des frères mentouri, de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider notre jury.

Nous remercions également Mme **TENIOU S** maitre assistante « A » à l'université des frères mentouri d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous souhaitons présenter nos sincères remerciements à Mr **HOUASSNIA MOURAD** chef du laboratoire d'électrophorèse au centre de recherche en biotechnologie, pour tout ce qu'il nous a présenté comme soutien et conseil précieux tout au long de notre stage

Un grand merci également à tout le personnel du laboratoire de biochimie et d'électrophorèse : Mr **BENSOVICI CHAWKI**, Mme **HANANE**, Mme **LINDA**, Mr **MEHDI**, Mme **IBTISSEM**, Mr **HATEM** et Mme **ROKAYA**.

Merci pour tous ceux qui ont participé à la réussite de ce mémoire.

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail avec le profond remerciement, aux êtres les plus chères à mon cœur.*

*A mes très chers parents*

*Je ne pourrai jamais assez-vous dire merci pour les conseils, le soutien, les encouragements et pour les prières qui m'ont accompagnés tout au long de mes études. Ce travail est le fruit de tous vos sacrifices, tous ces mots ne traduisent pas l'amour que je ressens pour vous.*

*Que Dieu vous garde longtemps près de moi*

*A mon très cher frère **Djaoued**, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi. Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse.*

*A toute ma famille pour leur encouragement durant toute la réalisation de mon mémoire surtout ma tante **Meriem** qui a su manifester son grand intérêt pour ce travail*

*A mes très chère amies **Manar** et **Choubeila***

*A ma chère binôme **Takoua** pour son soutien et affection durant tous ces longues années d'études, ainsi que tout sa famille « **BAADECHE** »*

*Manel*

## Dédicace

*Avec l'expression de ma reconnaissance je dédie ce modeste travail :*

*À mes **chers parents**, mon précieux offre de Dieu, source de vie, d'amour et d'affection, pour leurs sacrifices leur tendresse, leur soutien et prières, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*Particulièrement à mon cher oncle **Docteur Ayachi Boubakeur**, source d'espoir et de motivation ,qui n'a pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout le long de mon parcours, que Dieu Le Tout-Puissant lui préserve et lui accorde santé et bonheur.*

*À ma sœur **Rofeida**, ma fièreté, qui a toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.*

*À mes adorables frères **Mohamed** et **Tedjeddine** qui savaient toujours comment procurer la joie pour toute la famille.*

*Sans oublier **Manel**, ma chère binôme pour son soutien moral, sa patience et compréhension, ainsi que sa famille (**BENHACINE**).*

*Takoua balkiss*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale .....1

## *Partie I. Etude bibliographique (Chapitre I & II)*

### **Chapitre I. Les activités Biologiques**

I.1. Les polyphénols .....3

I.2. Les flavonoïdes.....3

I.3. Activité antioxydants .....4

I.4. Activité enzymatique .....5

I.4.1. L'activité antidiabétique .....6

I.4.2. Activité anticholinestérase .....6

I.5. Activité anti-inflammatoire .....7

I.6. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (*in vitro*) .....9

### **Chapitre II. *Eriobotrya japonica* L**

II.1. Historique .....11

II.2. Noms vernaculaires de la plante .....12

II.3. Description botanique de la plante .....13

II.4. Caractéristiques des différentes parties de la plante .....13

II.5. Classification botanique d'*Eriobotrya japonica* .....15

II.6. Habitat de la plante .....16

II.7. Composition biochimique de la plante.....17

II.8. Propriétés médicinales de la plante .....18

II.9. Les activités biologiques .....19

II.10. Toxicité d'*Eriobotrya japonica* .....21

## **Partie II. Etude pratique (Chapitre III & IV)**

### **Chapitre III. Matériels et méthodes**

III.1. Matériel végétal .....	22
III.2. Macération et extraction .....	22
III.2.1. Macération .....	22
III.2.2. Extraction .....	23
III.3. Activité biologiques .....	25
III.3.1. Estimation du contenu total en polyphénols (TPC) .....	25
III.3.2. Estimation du contenu total en flavonoïdes (TFC) .....	26
III.3.3. Activité antioxydants.....	27
III.3.3.1. Activité antiradicalaire au DPPH• .....	27
III.3.3.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS• .....	29
III.3.3.3. Activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) .....	31
III.3.3.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP) .....	32
III.3.3.5. Activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>2+</sup> - phénantroline .....	33
III.3.3.6. Activité Silver nanoparticle (SNP) .....	34
III.3.4. Activité enzymatique.....	35
III.3.4.1. Evaluation de l'activité antidiabétique .....	35
III.3.4.2. Evaluation de l'activité anticholinestérase.....	37
III.3.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire ( <i>in vitro</i> ) .....	39
III.4. Etude statistiques.....	41

### **Chapitre IV. Résultats et discussion**

IV.1. Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes .....	42
IV.1.1. Estimation du contenu total en polyphénols (TPC) .....	42
IV.1.2. Estimation du contenu total en flavonoïdes (TFC) .....	44
IV.2. Activité antioxydants.....	46
IV.2.1. Activité antiradicalaire au DPPH• .....	46
IV.2.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS• .....	48

IV.2.3. Activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) .....	50
IV.2.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP) .....	52
IV.2.5. Activité de réduction par la formation du complexe Fe+2phénantroline.....	54
IV.2.6. Activité Silver nanoparticle (SNP) .....	57
IV.3. Activité enzymatique.....	58
IV.3.1. Evaluation de l'activité antidiabétique.....	58
IV.3.2. Evaluation de l'activité anticholinestérase .....	60
IV.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire ( <i>in vitro</i> ) .....	61
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>64</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>66</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

## *Liste des abréviations*

**A<sub>0,5</sub>** : Concentration indiquant 0,50 d'absorbance

**ABTS**: Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6 sulfonique)

**AChE** : Acétylcholinestérase

**ATS** : Anti-inflammatoires stéroïdiens

**ATNS** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

**BChE** : Butyrylcholinestérase

**BHA** : Butylhydroxyanisole

**BHT** : Butylhydroxytoluène

**BPCO** : Bronchopneumopathie chronique obstructive

**BSA**: Albumine sérique bovine

°C : Degré Celsius

**CB** : bronchite chronique

**CI<sub>50</sub>** : Concentration d'inhibition à 50%

**COX-1** : Cyclooxygénase 1

**COX-2** : Cyclooxygénase 2

**CUPRAC** : Complexe cuivre- néocuproïne

**DPPH** :  $\alpha, \alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyl

**DTNB** : Acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)

**EAG** : Équivalent de l'acide gallique

**EAEJ** : Extrait acétate d'éthyle de la plante *Eriobotrya japonica* L

**EBEJ** : Extrait butanolique de la plante *Eriobotrya japonica* L

**EDEJ** : Extrait dichlorométhane de la plante *Eriobotrya japonica* L

**EDTA** : Acide éthylènediaminetétraacétique

**ELTA**: *Eriobotrya japonica* leaf triterpene acid

**EOA**: Espèces oxygénées activeés

**EQ** : Équivalent de la quercétine

**FCR** : Folin-Ciocalteu

**FRAP** : Pouvoir réducteur

**GOR** : Radical Galvinoxyl

**IL-1beta**: Interleukine 1 beta

**IL-8**: Interleukine 8

**LOX**: Lipoxygénases

**iNOS** : oxyde nitrique synthase

**Mg** : Milligramme

**NAFLD** : Maladie hépatiques grasses non alcooliques

**Nm** : Nanomètre

**NO** : Nitric oxide

**NP** : Nanoparticle

**PH**: Potentiel hydrogène

**PLA 2**: Phospholipase A2

**ppm** : Partie par million

**R''**: Radicaux libre

**SD** : Standard de déviation

**SNP**: Silver nanoparticle

**TEAC** : Capacité antioxydante équivalente Trolox

**TFC** : Contenu total en flavonoïdes

**TNF-alpha**: Tumor necrosis factors - alpha

**TNB**: l'acide 5-thio 2-nitrobenzoïque

**TPC** : Contenu total en polyphénols

**TR** : Temps de rétention

**Trolox** : Acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : bibaces et oiseau des montagnes, peinture chinoise .....	12
<b>Figure 2</b> : les différentes parties de loquat.....	15
<b>Figure 3</b> : les fractions d' <i>Eriobotrya japonica</i> .....	23
<b>Figure 4</b> : Protocole de préparation des fractions d' <i>Eriobotrya japonica</i> .....	24
<b>Figure 5</b> : Structure de base des flavonoïdes .....	26
<b>Figure 6</b> : Transformation du radical DPPH• en DPPHH.....	28
<b>Figure 7</b> : Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H• .....	30
<b>Figure 8</b> : Réduction du complexe chromogène de Cu <sup>+2</sup> -Nc <sub>2</sub> .....	31
<b>Figure 9</b> : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe Tripyridyltriazine ferrique Fe (III)-TPTZ et un antioxydant (AH) .....	32
<b>Figure 10</b> : Formation du complexe Fe <sup>+2</sup> -phénantroline .....	34
<b>Figure 11</b> : Récapitulatif des différentes solutions préparées.....	37
<b>Figure 12</b> : Mécanisme chimique de la méthode .....	38
<b>Figure 13</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	42
<b>Figure 14</b> : Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	43
<b>Figure 15</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine .....	44
<b>Figure 16</b> : Représentation graphique des teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	45
<b>Figure 17</b> : IC <sub>50</sub> obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité antiradicalaire au DPPH de différents extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> L.....	47
<b>Figure 18</b> : IC <sub>50</sub> obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité du piégeage du cation radical ABTS•+ de différents extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> L .....	49

<b>Figure 19 :</b> $A_{0,5}$ obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) de différents extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> .....	<b>51</b>
<b>Figure 20 :</b> $A_{0,5}$ obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité du pouvoir réducteur de différents extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> .....	<b>53</b>
<b>Figure 21 :</b> $A_{0,5}$ obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité de réduction par la formation du complexe $Fe^{+2}$ - phénantroline de différents extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> .....	<b>56</b>
<b>Figure 22 :</b> $A_{0,5}$ obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité de silver nanoparticules (SNP) de différents extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> .....	<b>57</b>
<b>Figure 23 :</b> $CI_{50}$ obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase de différents extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> .....	<b>59</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude du contenu total en polyphénols des extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> L .....	<b>42</b>
<b>Tableau 2 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude du contenu total en flavonoïdes des extraits d' <i>Eriobotrya japonica</i> L .....	<b>45</b>
<b>Tableau 3 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre d'Activité antiradicalaire au DPPH : valeurs d'Inhibition enregistrées et IC50 calculées.....	<b>47</b>
<b>Tableau 4:</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'activité du piégeage du cation radical ABTS <sup>•+</sup> : valeurs d'Inhibition enregistrées et IC50 calculées .....	<b>49</b>
<b>Tableau 5 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de Activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) : valeurs d'absorbance enregistrées et A <sub>0,5</sub> calculées.....	<b>50</b>
<b>Tableau 6 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité du pouvoir réducteur : valeurs d'absorbance enregistrées et A <sub>0,5</sub> calculées .....	<b>52</b>
<b>Tableau 7 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe <sup>+2</sup> - phénantroline : valeurs d'absorbance enregistrées et A <sub>0,5</sub> calculées.....	<b>54</b>
<b>Tableau 8 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité silver nanoparticules (SNP) : valeurs d'absorbance enregistrées et A <sub>0,5</sub> calculées .....	<b>56</b>
<b>Tableau 9 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase : pourcentage d'inhibition enregistrées et valeurs IC <sub>50</sub> calculées .....	<b>58</b>
<b>Tableau 10 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase : valeurs d'absorbance enregistrées .....	<b>60</b>
<b>Tableau 11 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase : valeurs d'absorbance enregistrées .....	<b>60</b>
<b>Tableau 12 :</b> Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine : pourcentage d'inhibition enregistrée .....	<b>61</b>

***Introduction***  
***Générale***

### **Introduction générale**

La nature nous a dotés de différentes plantes médicinales, l'homme les utilise dans la recherche des aliments, et à réussi à distinguer ceux qui ont des effets biologiques et pharmacologiques, les connaissances acquises par l'homme vont être utilisés pour soigner les maladies et pour développer de nouveaux médicaments à base de plante, donc les plantes médicinales ont un rôle majeur dans la médecine moderne et traditionnelle dans le monde. **(Sandberg et al. 2001)**.

Les propriétés thérapeutiques des plantes sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés : Les métabolites secondaires tels que ; les terpènes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. **(Akrouit et al., 2001)**. Ces derniers sont utilisés comme des agents préventifs anti-inflammatoires, antimicrobien, antiseptique, anti-carcinogène, antidiabétique et anti-alzheimer mais essentiellement antioxydant qui défendent contre le stress oxydant. **(Bourgaud et al., 2001 ; Kar, 2007)**.

Le stress oxydant est lié à de nombreuses pathologies, par exemple l'athérosclérose, les cancers, le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives et rhumatismales. C'est pour cela que la recherche sur les antioxydants dans les plantes s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de permettre de trouver les meilleurs antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir ces différentes maladies.

Actuellement, les scientifiques favorisent le développement d'une nouvelle génération de substances antioxydantes d'origine végétale pour remplacer celles de synthèse. De même, un certain nombre de secteurs industriels se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules aux caractéristiques biologiques intéressantes dans leurs formulations.

A cet effet, des études scientifiques s'intéressent à la phytochimie et aux activités biologiques des extraits des plantes, dans le but d'élargir les perspectives de valorisation des produits naturels **(Taviano et al. 2013)**.

L'utilisation des médicaments : les anti-inflammatoires, les anti-diabétiques et les anti-alzheimer... à long cours est souvent associé à des effets indésirables tels que ; les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale..., cependant le recours aux ressources naturelles et plus particulièrement aux plantes médicinales devient une importante voie alternative à explorer a fin de découvrir des médicaments efficaces à moindre effets secondaires. (Ouédraogo *et al.*, 2012).

Dans ce cadre, l'objectif de notre travail vise à démontrer l'évaluation des activités biologiques et l'étude phytochimique de la plante *Eriobotrya japonica* L.

- La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique, qui Comporte un premier chapitre sur les activités biologiques ; antioxydante, anticholinestérase, antidiabétique et anti-inflammatoire, Un deuxième chapitre généralité sur la plante *Eriobotrya japonica* L.
- La seconde partie (la partie expérimentale) comportant la description du matériel biologique, les méthodes d'extraction, et les méthodes d'évaluation *in vitro* des activités antioxydante, anticholinestérase, antidiabétique et l'activité anti-inflammatoire ainsi que les résultats obtenus et leurs discussions.
- En dernier lieu, une conclusion sera donnée pour restituer les principaux résultats obtenus et les perspectives voulues pour pouvoir compléter et améliorer cette étude.

*Etude*  
*Bibliographique*  
*Chapitre I*  
*Les Activités Biologiques*

## **I. Les activités biologiques**

Les activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Ces propriétés sont dues essentiellement à la fraction d'huile essentielle et aux composés phénoliques contenues dans les plantes

### **I.1. Les polyphénols**

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans la santé humaine en raison de leurs activités pharmacologiques diverses comme antivirales, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antiallergiques, antimicrobiennes, cardioprotectives et vasodilatoires. En outre, ils peuvent prévenir la modification oxydative par neutralisation et piégeage des radicaux libres, ou réduction des métaux par l'intermédiaire de leurs activités antioxydantes (**Ladoh et al., 2015**).

Les composés phénoliques végétaux constituent l'un des principaux groupes de composés agissant comme antioxydants primaires ou terminateurs de radicaux libres. Les polyphénols végétaux sont multifonctionnels en ce sens qu'ils peuvent agir comme agents réducteurs, donneurs d'atomes d'hydrogène et piègeurs d'oxygènes singlets. Certains polyphénols sont également efficaces en tant qu'antioxydants capables de chélater les ions des métaux de transition qui, autrement pourraient induire des réactions d'oxydation de type Fenton à l'état libre (**Rice-Evans et al., 1996 ; Karaman et al., 2009**).

### **I.2. Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes constituent le groupe majeur des antioxydants phénoliques dérivés des plantes médicinales (**Ouyang et al., 2018**). Y compris ; les flavones, les flavonols, les isoflavones, les flavonones et les chalcones, sont présents dans tous les types de tissus végétaux supérieurs (**Herrmann, 1993 ; White et Xing, 1997**). Les flavones et les flavonols sont présents dans presque toutes les plantes, en particulier dans les feuilles et les pétales, les flavonols étant plus fréquents que les flavones (**Herrmann, 1976**). Il a été signalé que les flavonoïdes peuvent agir comme antioxydants en piégeant des radicaux tels que ; les radicaux anioniques superoxydes (**Robak et Gryglewski, 1988 ; Hu et al., 1995**), les radicaux peroxydes lipidiques

(Takahama , 1985) et les radicaux hydroxyles (Husain et al., 1987), l'extinction de l'oxygène singulet (Takahama ,1984), la chélation des ions métalliques (Ramanathan et Das 1993) et l'inhibition des lipoxygénases (Voss et al., 1992). Parmi les flavonoïdes les plus courants, on trouve l'apigénine, la chrysin, la lutéoline, la datiscétine, la quercétine, la myricétine, le morin et le ka-empférol. De plus, la plupart des flavonoïdes présents dans les plantes se présentent sous forme de glycosides (Macheix et al., 1990).

### I.3. Activité antioxydante

#### ❖ Radicaux libres

Les radicaux libres (R·) sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche extrême. Ce sont des espèces chimiques instables, très réactives, et possèdent un temps de demi-vie extrêmement court ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  S), qui peuvent être formées par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radical. Ils peuvent aussi apparaître au moment de la rupture symétrique d'une liaison covalente après laquelle chaque atome conserve un électron et devient un radical libre (Halliwell et Gutteridge, 1989).

Les origines des radicaux libres sont :

- **D'origine exogène:** produits des radiations (rayons X et lumière UV), polluants de l'air (N, NO<sub>2</sub>), solvants organiques, anesthésiques, pesticides, drogues, xénobiotiques et hyperoxie (Halliwell et Gutteridge, 1989).
- **D'origine endogène :** ils sont produits, en majorité, au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies.

### ❖ Stress oxydant

En 1991, Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées activées, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue d'EOA ( espèces oxygénées activées ), soit à une diminution de la capacité de défense antioxydants .

### ❖ Les antioxydants

Les antioxydants sont des composés capables à ralentir ou à empêche les processus d'oxydation qui se produisent sous l'influence d'une espèce réactive oxygénée (Pisoschi et Negulescu, 2011). Ils préviennent l'oxydation des macromolécules en donnant de l'hydrogène, la désactivation des radicaux par création d'addition covalente, la réduction des métaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition et le captage de l'oxygène singulet.

Il existe deux types d'antioxydants :

- **Les antioxydants naturels** : La vitamine E et l'acide ascorbique (Dugan et al., 1979).
- **Les antioxydants synthétiques** : l'hydroxytoluène butylé, l'hydroxyanisole butylé et l'éthoxyquine (simic et karel, 1979).

## I.4. Activité enzymatique

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle important dans les réactions biochimiques nécessaires pour la croissance, la maturation et la reproduction des êtres vivants. Leur quantification par mesure de l'activité catalytique dans les échantillons biologiques est importante dans divers domaines (Glatz, 2006).

#### **I.4.1. L'activité antidiabétique**

Le **diabète** est une maladie complexe tant par ses mécanismes physiopathologiques que par son déterminisme génétique ainsi que la genèse de ses complications. C'est un groupe hétérogène de maladies métaboliques dont la caractéristique principale est une hyperglycémie résultant d'un défaut de sécrétion, d'action de l'insuline ou de ces deux anomalies associées (**Eddouks et al., 2007**).

**$\alpha$ -Amylase** est une métallo-enzyme, que l'on trouve dans sérum, urine et salive normaux de l'homme (**Liang et al., 2013**). En tant qu'enzyme omniprésente, elle est produite par les animaux, les plantes et les microorganismes (**Rana et al., 2013**). L'enzyme alpha-amylase catalyse l'endohydrolyse de  $\alpha$  (1-4) glycosidique les liens entre les polysaccharides communs (amidon) issus de l'alimentation, pour réguler la glycémie. Pendant l'état pathologique du diabète sucré, cette enzyme peut être préjudiciable, en raison du défaut biochimique qui entraîne une élévation du taux de glucose dans le sang. L'inhibition de l'activité de l'enzyme réduirait l'absorption du glucose par l'intestin grêle et contrôlerait l'élévation des niveaux de glucose. Cela permettrait ensuite de l'amidon non digéré pour arriver au côlon (**Sethi et Brahmliin, 2006**).

#### **I.4.2. Activité anticholinestérase**

La maladie **d'Alzheimer** est une maladie neurodégénérative progressive. L'atteinte précoce des neurones entraîne, en premier lieu, des troubles de la mémoire. S'y ajoutent, ensuite, une perturbation des fonctions cognitives (langage, raisonnement, orientation,...) (**Braak, 1998**). Le système cholinergique est le plus précocement atteint avec une synthèse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) anormalement basse. Un des traitements de cette maladie est de pallier le déficit en ACh en inhibant sa dégradation au niveau de la fente synaptique, c'est à dire en inhibant l'acétylcholinestérase (**Wandhammer, 2012**).

**Les cholinestérases** sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'esters de choline (acétylcholine, butyrylcholine, succinylcholine) en acide carboxylique et en

choline. Il existe deux types de cholinestérases : l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase (**Crismon, 1998**).

L'acétylcholinestérase (AChE ; EC 3.1.1.7) se localise principalement au niveau des synapses cholinergiques du système nerveux central ainsi qu'au niveau des jonctions neuromusculaires mais également au niveau de la membrane érythrocytaire.

La butyrylcholinestérase (BChE ; EC 3.1.1.8), quant elle, est abondante au niveau plasmatique (environ 5mg/ml) et elle est présente également dans de nombreux tissus (foie, intestin, poumons, cœur, muscles, cerveau). Ainsi que de nombreuses homologues avec l'AChE, notamment au niveau de sa séquence (54%), de la structure tridimensionnelle et du mécanisme catalytique.

Dans les conditions physiologiques, l'activité de la cholinestérase dans le cerveau est principalement liée à l'AChE. Cependant, en présence de la maladie d'Alzheimer, l'activité de l'AChE diminue progressivement dans certaines régions du cerveau, tandis que l'activité de la BuChE augmente ; la BuChE peut alors agir comme un mécanisme compensatoire de l'hydrolyse de l'acétylcholine (**Giacobini, 2003**).

### **I.5. Activité anti-inflammatoire**

L'inflammation est un mécanisme de défense naturel qui offre une résistance contre divers types d'agents pathogènes reconnus par le système immunitaire (**parimisetty, 2015**).

Les réactions inflammatoires sont induites par les infections microbiennes et virales; l'exposition aux allergènes, les radiations et les produits chimiques toxiques, les maladies auto-immunes et chroniques, l'obésité, la consommation d'alcool, l'utilisation de tabac, et l'alimentation riche en calories (**Aggarwal et al., 2009; Schetter et al., 2010**). Deux stades de l'inflammation existent, aiguë et chronique.

- **L'inflammation aiguë** est une étape initiale de l'inflammation (de l'immunité innée), qui est médiée par le mouvement rapide du plasma et des leucocytes

du sang vers le site de la blessure. Ce type d'inflammation apparaît en quelques minutes (immédiate) et dure quelques jours (**bagora, 2015**).

- **L'inflammation chronique** correspond à la persistance de l'agent pathogène à cause de l'échec de la réponse inflammatoire aigue, caractérisée par le déplacement rapide et progressif des cellules au site inflammatoire, suivi par la destruction simultanée du tissu, et peut conduire à diverses maladies chroniques, y compris le cancer (**Lin and Karin, 2007**). Ce type d'inflammation n'apparaît pas immédiatement (retardé), et peut persister des semaines, voire des années (**Feghali et Wright, 1997**).

Lors de l'inflammation aiguë, une fois l'agression maîtrisée, la phase de résolution se déclenche : libération de cytokines anti-inflammatoires, migration hors du site inflammatoire et mort cellulaire. Par contre dans l'inflammation chronique, cette phase de résolution est absente. L'infiltrat immunitaire persiste, ce qui contribue à l'hyperplasie et à la destruction du tissu (**Noack, 2016**).

**Les anti-inflammatoires** sont définis comme étant des substances qui agissent sur la douleur et le gonflement qui apparaissent suite à une agression d'un agent pathogènes. Elles bloquent la sécrétion ou l'action de certains médiateurs chimiques de l'inflammation (comme les prostaglandines) et donc diminuent la sensation de la douleur mais aussi l'inflammation (**Orliaguet et al., 2013 ; Hajjaj, 2017**). Elles sont utilisées lorsque la réaction inflammatoire se prolonge de façon anormale (inflammation chronique) et entraîne des dommages aux tissus. Selon le mode d'action, il existe trois (3) catégories d'anti-inflammatoire :

- **Les anti-inflammatoires stéroïdiens (A.I.S)**

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou les corticoïdes agissent sur toutes les composantes de l'inflammation en s'opposant à l'action de la phospholipase A2 qui est l'enzyme catalysant la libération de l'acide arachidonique, à partir de la membrane cellulaire. Ils bloquent la libération de l'acide arachidonique en agissant

sur les membranes cellulaires. En effet, l'acide arachidonique est un constituant des membranes cellulaires qui joue un rôle majeur dans l'inflammation par la production des leucotriènes, des prostaglandines, et du thromboxane A2 (Dolci et al., 1993).

➤ **Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (A.I.N.S.)**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont les plus utilisés dans le monde en raison de leurs propriétés antalgique, et antipyrétique (contre la fièvre) (Haioun et Zohra, 2015). Ils n'agissent que sur une partie de la composante inflammatoire en bloquant la dégradation de l'acide arachidonique par la voie de la cyclo-oxygénase. Ils s'opposent ainsi à la production des prostaglandines et du thromboxane A2. Par ailleurs, Ils peuvent agir sur la composante cellulaire de l'inflammation en bloquant la mobilité de cellules notamment les macrophages (wilfried, 2020).

➤ **Les anti-inflammatoires naturels**

les composés phytochimiques issus du règne végétal et fongique sont très nombreux avec une gamme variée d'activités biologiques. Certains parmi eux, possèdent une activité anti-inflammatoire et ont pour cibles la COX-1 et COX -2, les lipoxygénases (LOX), le NO, la phospholipase A2 (PLA2)...etc. Ces composés phytochimiques présentent un intérêt grandissant car ils offrent des avantages par rapport aux anti-inflammatoires classiques, avec moins d'effets secondaires (Dhingra et al., 2018).

Par ailleurs, au cours de ces dernières années, de nombreux composés pharmacologiquement actifs avec une activité anti-inflammatoire ont été aussi isolés à partir d'organismes marins (des éponges, des mollusques, des algues, des échinodermes et des bactéries) (Mebirouk, 2017).

## **I.6. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (*in vitro*)**

La dénaturation des protéines est un processus durant lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et secondaire par application d'un stress ou d'un composé externe, tel qu'un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant

organique ou de son exposition à la chaleur. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées (**leelaprakash, 2011**).

Selon **Mizushima. (1966)** la dénaturation des protéines est bien corrélée à la survenue de la réponse inflammatoire. Les lésions tissulaires pourraient être liées à la dénaturation des constituants protéiques des cellules ou de la substance intercellulaire. Par conséquent, la capacité d'une substance à inhiber la dénaturation des protéines signifie un potentiel apparent d'activité anti-inflammatoire (**Opie, 1962**).

# *Chapitre II*

*Eriobotrya japonica L*

## **II. *Eriobotrya japonica***

*Eriobotrya japonica* a été utilisée comme plante médicinale traditionnelle (**Kim et al., 2011**). De nombreuses parties de la nêfle ont été utilisées pour le traitement de plusieurs maladies.

### **II.1. Historique**

L'origine de loquat a toujours fait l'objet d'un désaccord dans la communauté scientifique. Thunberg a décrit pour la première fois le loquat en 1784 et l'a placé dans le genre *Mespilus*. En 1822, le botaniste anglais John Lindley a révisé le genre *Mespilus*, et a établi le loquat dans un nouveau genre, *Eriobotrya* (**Condit, 1915 ; Huxley, 1992**). Il est largement rapporté que loquat cultivé au japon a été importé de chine (**Popenoe, 1920 ; Shaw, 1980 ; Campbell et Malo, 1986 ; Morton, 1987 ; Zhang, 1990 ; Ichinose, 1995**). Cette hypothèse a été réfutée par des chercheurs japonais qui ont confirmé la présence de certaines espèces primitives dans plusieurs régions du japon (**Fujisaki, 1994 ; Ichinose, 1995**).

Depuis lors, sa cultivation s'est répandue dans le monde entier : d'abord les pays méditerranéens (Algérie, Tunisie, Italie, Espagne, Malte, Chypre, Grèce, Turquie et Égypte), puis les États-Unis d'Amérique, ainsi que certains pays d'Amérique latine (Antilles, Porto Rico, Cuba) (**Demir, 1983 ; Morton, 1987**).



**Figure 1** : bibaces et oiseau des montagnes, peinture chinoise (Dynasties des Song, XII-XIII siècles)

## II.2. Noms vernaculaires de la plante

Les principaux noms vernaculaires de l'espèce (Lin et al., 1999) :

**Anglais**: loquat

**Espagnol**: nisperojapones

**Français**: neflier du Japon ; bibasse

**Japon** : bipa; biwa

**Chinois**: biba; luju; pi ba

**Italie** : nisperojapones

**Arabe** : Zaroure

### II.3. Description botanique de l'espèce *Eriobotrya japonica*

*Eriobotrya japonica* est un petit arbre, de 5 à 8 m de haut, avec une couronne arrondie un tronc droit et ramifié à une très faible hauteur, une écorce rugueuse et grise qui se décolle chaque année.

Feuilles persistantes, dont la face supérieure est généralement brillante, tandis que la face inférieure est souvent pubescence (Yu, 1979)

Ces fleurs donnent naissance à un fruit orange très juteux au goût quelque peu acide (ferreres et al., 2009). Ce fruit subtropical est consommé frais ou préparé en conserves, confitures, jellie, jus et nectars après enlèvement des semences (Ibarz et al., 1995) (voir figure 1).

Le cycle annuel comprend trois saisons de croissance: pousses de printemps, d'été et d'automne. La différenciation des boutons floraux a lieu en juillet-août, la formation des boutons floraux se produit en septembre-octobre, la saison de floraison s'étend de novembre à février, selon le cultivar, et la saison de récolte s'étend de mars à juin (données relatives à l'hémisphère Nord).

### II.4. Caractéristiques des différentes parties de la plante

- ❖ **Les feuilles** : la couleur en face supérieure rugueuse et verte, la face inférieure est semblable à du coton et gris, la largeur entre 3-9 cm, la longueur entre 12-30 cm sous forme lancéolée ou elliptique (en forme de lance). Elles sont simples, alternes, à bords dentelés, coriaces ; pétiole court, nerf central prononcé (voir la figure 2) (Yu, 1979 ; Huxley, 1992 ; Lin et al., 1999)
- ❖ **Les fleurs** de couleur blanches ou jaunâtres, la taille entre 1,2 à 2 cm et la longueur entre 10-19 cm (Yu, 1979 ; Jonathan et al., 2006 ; Janick et Paull,

2008 ) Elles sont petites, blanches ou jaunâtres parfumées. Habituellement, il y a 60 à 70 fleurs par grappe. (Jonathan et al., 2006). Elles sont bisexuelles avec une panicule terminale souvent poilue et elles ont un tube calice en forme de coupe ou de turbinaison ; cinq sépales persistants ; cinq pétales obovales ou orbiculaires, glabres ou poilus ; une forme hélicoïdale ou bourgeon imbriqué ; 10 à 40 étamines ; deux à cinq styles qui sont fondamentalement connus et souvent glabres ; un ovaire inférieur, c'est-à-dire connu et comportant deux à cinq pièces avec deux ovules par locule ; un endocarpe membraneux ; et une ou plusieurs grosse(s) graine(s) (voir la figure 2) (Huxley, 1992 ; Lin et al., 1999 ; Janick et Paull, 2008).

- ❖ **Les fruits** de couleurs jaune-orange, en forme ronde ou ovale, leurs taille de 2 a 5 cm, et le poids entre 30 a 40 g (Yu, 1979 ; Ibarz et al., 1995 ; Jonathan et al., 2006 ; Janick et Paull, 2008 ) Le fruit loquat est un type à pépins ; le nombre de pépins varie entre un et huit, mais le plus souvent de trois a quatre regroupées au centre du fruit. Elles sont séparées de la chair par un tégument très fin. (Janick et Paull, 2008). L'épicarpe, l'épiderme ou la peau rugueuse est aussi épaisse que celle d'une pêche mais légèrement plus dure. La couleur de la chair juteuse ou le mésocarpe varie du blanc jaunâtre à l'orange foncé et son goût a été décrit comme doux, subacide ( légèrement acide) et proche de celui de la pomme (voir la figure 2) (Frijehlich et Schreier, 1990).
- ❖ **Les graines** de couleur brun foncé, Poids entre 1,1-3,6 g (Yu, 1979 ; Jonathan et al., 2006 ; Janick et Paull, 2008 ) Le loquat a des graines relativement grosses comprennent environ 20 à 30 % du poids du fruit (Yu, 1979 ; Demir, 1987). Les amandes sont recouvertes d'une peau brune, lisse et fibreuse (voir la figure 2).



Figure 2 : les différentes parties de loquat

## II.5. Classification botanique d'*Eriobotrya japonica*

Le loquat est un fruit comestible (*Eriobotrya japonica* Lindl.) appartenant à la famille des Rosacées (Badenes *et al.*, 2000 ; Kalkman, 2004).

Les Rosaceae sont une famille de 92 genres et de 2 805 espèces d'herbes, d'arbustes et d'arbres, répartis dans le monde entier mais particulièrement diversifiés dans l'hémisphère nord (Stevens, 2019).

Environ 800 cultivars d'*E. japonica* ont été développés. En fonction de leur origine, on peut distinguer deux groupes : le premier groupe chinois avec de gros fruits piriformes de couleur orange foncé et le deuxième groupe japonais avec de petits fruits minces de couleur claire (Orwa et al., 2009).

**Règne :** végétal

**Classe :** Dicotylédones (Tonellie et Gallouin, 2013)

**Ordre :** pomée (Tonellie et Gallouin, 2013)

**Famille :** Rosaceae (Ferrerres et al., 2009)

**Sous-famille :** Maloideae (pareek et al., 2014)

**Genre :** *Eriobotrya* (Lin et al., 1999)

**Espèce :** *Eriobotrya japonica*

## II.6. Habitat de la plante

Le loquat s'est bien adapté au climat méditerranéen et produit dans les mêmes régions où les agrumes prospèrent (Demir, 1987 ; Lin et al., 1999 ; Badenes et al., 2000 ; Jonathan et al., 2006 ). L'arbre pousse bien dans presque tous les sols qui ont un bon drainage et dans les sols acides et alcalins. Les arbres bien établis peuvent tolérer une baisse de température jusqu'à 12 °C (Demir, 1987), des températures supérieures à 35 ° C peuvent avoir un effet négatif sur la croissance des arbres (Jonathan et al., 2006).

Loquat a formé une variété de types écologiques dans différentes zones. En général, ils se trouvent dans les climats maritimes entre les latitudes 20 ° et 35 ° nord et sud (Vilanova et al., 2001) mais peut être cultivé à la latitude 45 ° (Lin, 2007 ; Lin et al., 2007 ; Polat et Caliskan, 2007).

Dans son aire de répartition naturelle, *E. japonica* pousse dans les vallées et les forêts (**Flora of China, 2016**). En Australie, on la trouve dans les zones côtières, dans les forêts sclérophylles sèches et le long des cours d'eau (**Weeds of Australia, 2016**). À Hawaï, on la trouve naturalisée dans les zones humides et mouillées, dans les forêts mésiques mixtes, les forêts tropicales et le long des routes (**Lorence et al., 1995 ; Pier, 2016**). En Nouvelle-Zélande, cette espèce peut être trouvée naturalisée dans des forêts et des arbustes perturbés, sur les flancs des collines et près des sites de culture (**Webb et al., 1988 ; Weeds of New Zealand, 2016**).

## II.7. Composition chimique de la plante

Selon le département de nutrition de l'Institut central chinois de recherche sur la santé, les composants nutritionnels de 100 g de pulpe de loquat contiennent 0,4 g de protéines, 1 g de graisses, 7 g glucides, 0,8 g de fibres alimentaires, 0,5 g de cendres, 22 mg de calcium, 32 mg de phosphore, 1,33 mg caroténoïdes, et 3mg de vitamine C. Par conséquent, le loquat est un excellent fruit nutritionnel (**Li et al., 2016**).

Le profil phénolique de l'arbre du loquat varie en fonction de la croissance, de la maturation, les facteurs génétiques de chaque cultivar, les conditions environnementales et les méthodes d'extraction.

La composition phytonutritionnelle des extraits de différents organes varie considérablement :

- ❖ **Feuilles et fleurs** : Sont riches en composés phénoliques ; en triterpènes tels que ; les acides ursolique , oléanolique et les glycosides de sesquiterpène (**Xu et Chen, 2011 ; Fu et al., 2012 ; Zhang et al., 2015**).
- ❖ **Les fruits** : riches en sucres, en acides organiques, en caroténoïdes, en flavonoïdes, en acides phénoliques et en vitamines A et B (**Fu et al., 2012 ; Zhang et al., 2015**).

- ❖ **Les graines** : sont une bonne source de protéines, d'amidon, de tanins et de minéraux (Fu et al., 2012 ; Zhang et al., 2015) et riche en amygdaline (Li et al., 2016).

## II.8. Propriétés médicinales de la plante

### ➤ Usages traditionnels

Le loquat est également une plante à haute valeur médicinale, et différents organes de la plante sont utilisés depuis des milliers d'années comme médicaments populaires (Li et al., 2016).

En 1874, **Philibert Dabry** de Thiersant écrit dans « La matière médicale chez les Chinois » : « sa feuille amère dissout les inflammations, arrête la toux et la soif, apaise la mélancolie et renforce l'estomac »

### ➤ Potentiels thérapeutiques confirmés

Des études pharmacologiques récentes ont montré que *Eriobotrya japonica* possédait plusieurs activités, telles que ; des effets antidiabétiques (Chen et al., 2008 ; Lü et al., 2009), des effets anti-tumoraux et anti-inflammatoires (Huang et al., 2009), des effets antioxydants (Huang et al., 2006), et un effet bénéfique sur les maladies hépatiques grasses non alcooliques (NAFLD) (Jian et al., 2017 ; Jian et al., 2018).

En tant que médicament traditionnel chinois, la feuille de loquat (*Eriobotrya japonica*Lindl) a été largement utilisée depuis des siècles dans le traitement des maladies respiratoires, telles que ; la pharyngolaryngite, bronchite, bronchite chronique (BC), toux et bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (matalkaet al., 2016).

L'extrait des feuilles de nêfle a également montré d'autres bioactivités, en particulier l'effet sur les troubles métaboliques, hypolipidémiques, anti-obésité (shihet al., 2013 ; Liu et al., 2016) les maladies des poumons, d'estomac, l'asthme

(Alshaker et al., 2011), l'amélioration de la fonction hépatique (Nishioka et al., 2002), activité gastroprotectrice (Yokota et al., 2008), effet anti-vieillessement (Muramoto et al., 2011), et l'activité antiallergique (Kim et al., 2009).

## II.9. Les activités biologiques d'*Eriobotrya japonica*

- **Activité antioxydante :** En utilisant de multiples méthodes de dosage des antioxydants, diverses études ont démontré la forte capacité antioxydante des extraits de loquat *in vitro* et *in vivo*. Les composés phénoliques et les acides triterpéniques peuvent tous les deux contribuer à cette activité dans différents tissus de la nêfle (Liu et al., 2016).

À tel point qu'en 2010, une étude chinoise de Song et al. (2010) a classé le néflier du Japon en seconde position sur 56 plantes antioxydantes utilisées en médecine traditionnelle.

- **Activité anti-inflammatoire :** Dans la médecine populaire chinoise, la feuille de loquat est utilisée depuis l'Antiquité pour traiter les maladies inflammatoires telles que ; la toux, bronchite chronique (BC) et l'asthme (Li, 1578). Des études scientifiques modernes utilisant différents modèles expérimentaux ont prouvé la capacité anti-inflammatoire de différents tissus du néflier comme la feuille (Banno et al., 2005 ; Huang et al., 2005 ; Choi et al., 2011 ; Kim et al., 2012), la graine (Tukuma et al., 2008 ; Sun et al., 2010) et le fruit (Lin et al., 2008).

À ce titre, il a été rapporté que des extraits de feuilles de cet arbre inhibent, de manière dose-dépendante, la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL-1beta, et IL-8) (Lee et al., 2008 ; Cha et al., 2011).

De manière intéressante une étude tunisienne, a montré qu'une fraction enrichie en flavonoïdes extraite de feuilles d'*Eriobotrya japonica* exerce une action inhibitrice sur l'enzyme pro-inflammatoire humaine, phospholipase A2 (Maher et al., 2015).

- **Activité antidiabétique** : *E. japonica* présentait un grand potentiel anti-diabète. Des recherches récentes ont montré que les extraits de la feuille ou la graine de loquat sont utiles dans la prévention et le contrôle du diabète de type 1 et de type 2 (Sakuramata et al., 2004 ; Li et al., 2007).

Une étude italienne Tommasi et al., (1991) a mis en évidence l'effet hypoglycémiant d'un extrait alcoolique d'*Eriobotrya japonica* contenant des sesquiterpènes glycosidés ainsi que de triterpénoïdes isolés sur des rats normaux et diabétiques.

De manière similaire, il a été démontré, par des chercheurs chinois Chen et al. (2008), qu'un sesquiterpène glycosidé naturel isolé des feuilles d'*Eriobotrya japonica* permet de réduire significativement les niveaux de glucose sanguins de souris diabétiques.

- **Activité anticancéreuse** : Des études de Komiya et al., (1998) et Kim et al., (2011) ont démontré au niveau de la protéine et au niveau des gènes que les extraits de loquat peuvent supprimer la cancérogenèse cellulaire à différents stades de progression (l'initiation, la prolifération et les métastases).

Une étude publiée par des chercheurs coréens Kang et al., (2006) conclut que la nêfle réduit la prolifération de différentes lignées des cellules cancéreuses. Des résultats similaires ont également été observés sur des lignées cancéreuses de la leucémie (Kikuchi et al., 2011 ; Zar et al., 2014). Ils indiquent notamment que la plante stimule l'apoptose de ces cellules cancéreuses, par un dérivé de l'acide tormentique, composé triterpène présent dans la feuille du néfler du Japon.

**II.10. Toxicité d'*Eriobotrya japonica***

Dans les études de toxicité aiguë (0,30, 0,65, 1,39 et 3,00 g·kg<sup>-1</sup> de poids corporel) et subaiguë (150, 300 et 600 mg·kg<sup>-1</sup> de poids corporel), les triterpènes des feuilles d'*Eriobotrya japonica* n'a produit aucune mortalité et aucune toxicité des principaux organes chez les souris mâles et femelles. Les résultats de la présente étude indiquent qu'*Eriobotrya japonica* leaf triterpene acid (ELTA) administrée par voie orale pourrait avoir une grande marge de sécurité pour l'homme (**Li et al., 2017**).

# *Etude Pratique*

## *Chapitre III*

### *Matériels et Méthodes*

La présente étude vise à évaluer les activités biologiques de l'extrait de feuilles d'*Eriobotrya japonica*. La partie expérimentale a été réalisée au sein du centre de Recherche en Biotechnologie CRBt. Constantine.

### **III. Matériels et méthodes**

#### **III.1. Matériel végétal**

Les feuilles d'*Eriobotrya japonica* utilisées dans cette étude ont été récoltées en février 2020 à Ain smara, Wilaya de Constantine. Elles ont été lavées soigneusement à l'eau courante, conservées à température ambiante et à l'abri de l'humidité pendant une semaine, puis séchées dans une étuve à 40°C pendant 24 heures. Une fois séchées, elles ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique. Jusqu'à l'obtention d'une poudre fine

#### **III.2. Macération et extraction**

Pour l'évaluation de l'activité *in vitro* de l'extrait de feuilles d'*Eriobotrya japonica*, différents procédés d'extraction ont été réalisés.

##### **III.2.1. Macération**

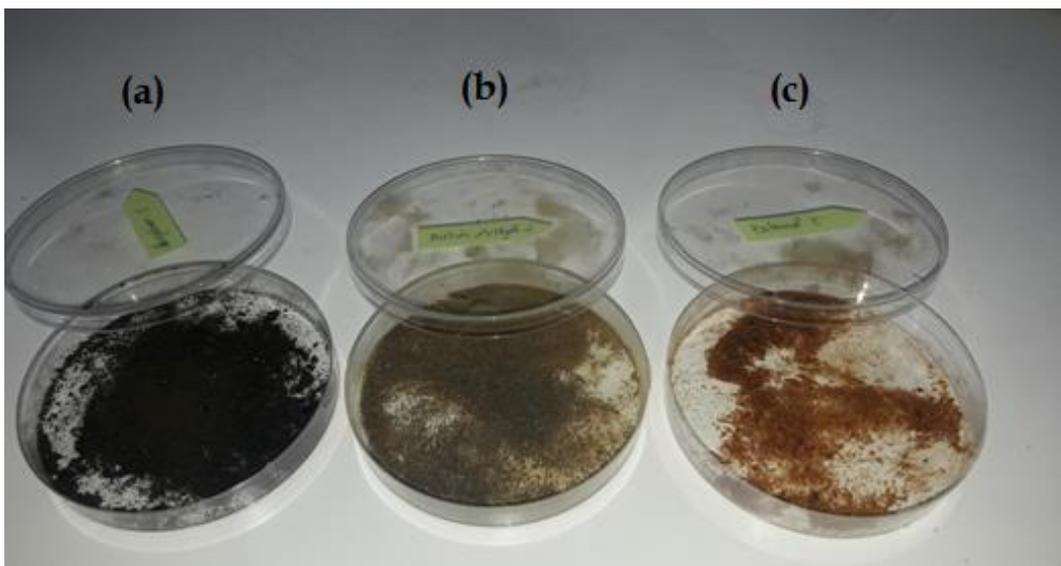
La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour extraire des principaux actifs.

Une quantité du matériel végétal (100 g) a été mise a macération dans un système hydrométhanolique (MeOH/H<sub>2</sub>O 85 V:V). Après 24 heures de contact, le mélange a été filtré à l'aide d'un papier whatman et d'un entonnoir puis concentré en utilisant un rotavap de marque BUCHI. Cette opération a été répétée trois fois. L'extrait brut obtenu a été ensuite dilué dans un volume de 250 ml d'eau distillée puis filtré. A la fin de cette étape, une fraction hydrométhanolique a été obtenue.

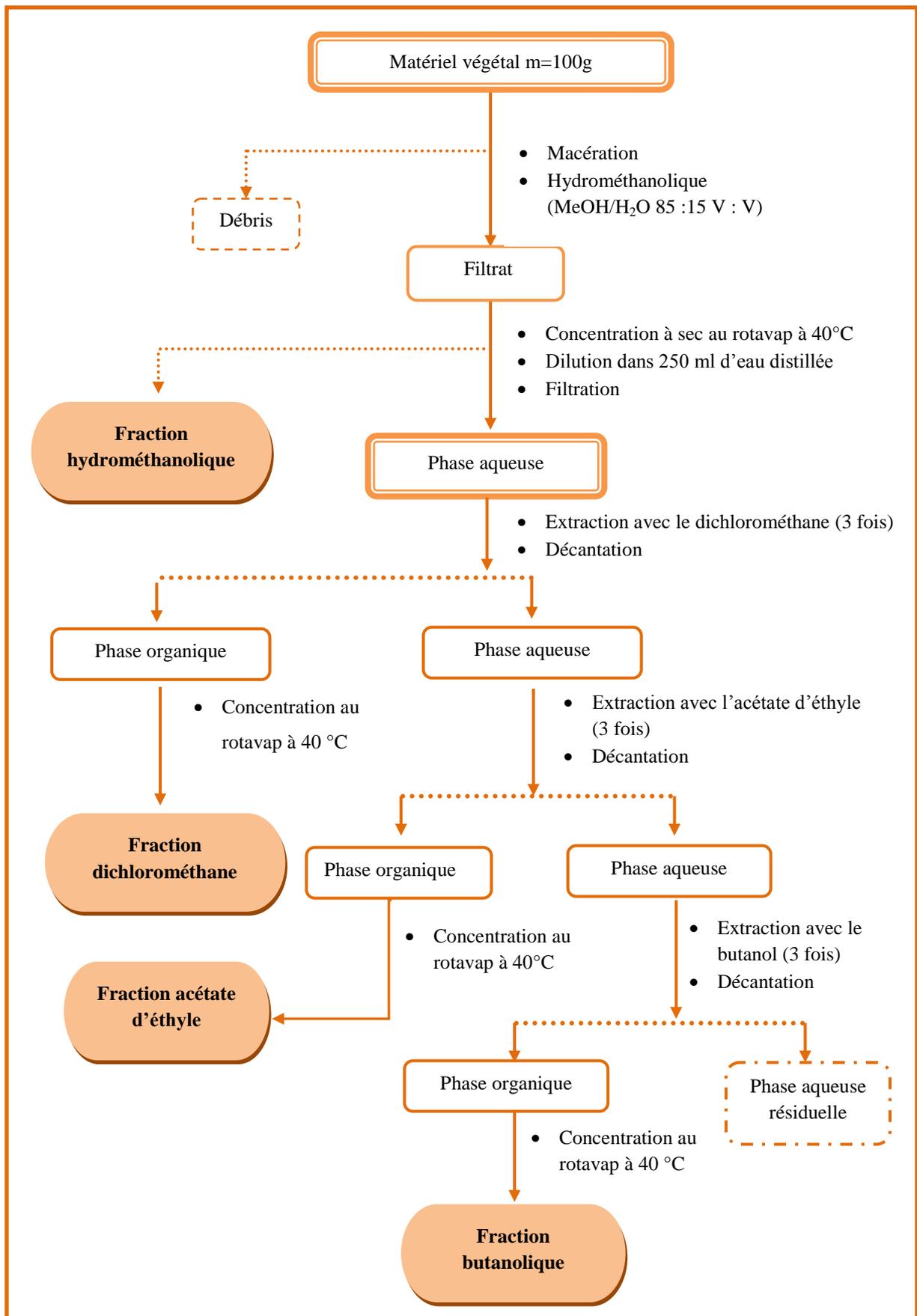
### III.2.2. Extraction

Le produit obtenu après filtration a subi une série de procédés d'extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants organiques à polarité croissante : chloroforme, acétate d'éthyle et n-Butanol. Pour chaque solvant d'extraction, la décantation a été répétée trois fois; au bout de la troisième décantation, la phase organique a été concentrée au rotavap à 40°C pour le fractionnement, tandis que, la phase aqueuse a été utilisée pour une autre extraction avec un solvant de polarité supérieure.

A la fin de cette étape, trois fractions ont été obtenues : fraction chloroformique, fraction acétate d'éthyle et fraction butanolique (voir figures 3 et 4).



**Figure 3** : les fractions d'*Eriobotrya japonica* (a) : fraction chloroformique, (b): fraction acétate d'éthyle, (c) : fraction butanolique.

Figure 4 : Protocole de préparation des fractions d'*Eriobotrya japonica*

### III.3. Activité biologiques

Les mesures des absorbances ont été faites à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits de marque Perkin Elmer (USA) avec son logiciel EnSpire au niveau du laboratoire de Biochimie au CRBt de Constantine.

#### III.3.1. Estimation du contenu total en polyphénols (TPC)

##### ➤ Principe

Le contenu phénolique total des extraits a été estimé à l'aide de la méthode Folin-Ciocalteu, qui repose sur le transfert d'électrons des composés phénoliques au FCR en milieu alcalin, et qui est une méthode simple et largement utilisée (**Singleton et Rossi, 1965 ; Cai et al., 2004 ; Song et al., 2010**). Le FCR ou réactif phénolique de Folin ou réactif Folin-Denis, utilisé pour le dosage colorimétrique des antioxydants phénoliques et polyphénoliques (**Singleton et al., 1999**). Il fonctionne en mesurant la quantité de substance à tester nécessaire pour inhiber l'oxydation du réactif (**Vinson et al., 2005**). Il est réduit, en présence de polyphénols en un mélange bleu d'oxydes de tungstène et de molybdène. L'absorbance du mélange obtenu est mesurée à 765 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à l'augmentation de la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (**Macheix et al., 2005**).

##### ➤ Mode opératoire

Le contenu phénolique total est détecté en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu (FCR) (**Singleton et Rossi, 1965**) par la méthode de dosage sur microplaque de 96 puits décrite par **Muller et al., (2010)**. Un volume de 20 µl d'extrait de plante (1 mg d'extrait dissout dans 1 ml de méthanol) est ajouté à 100 µl de FCR dilué (1:10). Ensuite un volume de 75 µl de carbonate de sodium (7,5%) est additionné.

Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante. L'absorbance de différentes intensités de la couleur bleue résultante est déterminée à 765 nm.

Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). L'acide gallique (10%) est utilisé comme contrôle positif, à partir de lequel une courbe d'étalonnage a été établie.

### III.3.2. Estimation du contenu total en flavonoïdes (TFC)

#### ➤ Le principe

La méthode utilisée pour estimer les taux en flavonoïdes, est celle décrite par **Topçu et al., (2007)** avec quelques modifications.

Le principe de cette méthode repose sur le dosage direct par le chlorure de l'aluminium. En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position 5 susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion  $Al^{3+}$ . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

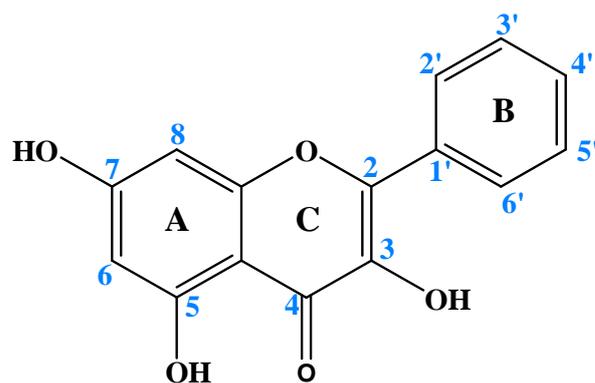


Figure 5 : Structure de base des flavonoïdes (**Lin et al., 2015**)

➤ **Le mode opératoire**

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre les ions  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes. La méthode décrite par **Topçu et al., (2007)** est utilisée et adaptée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque à 96 puits.

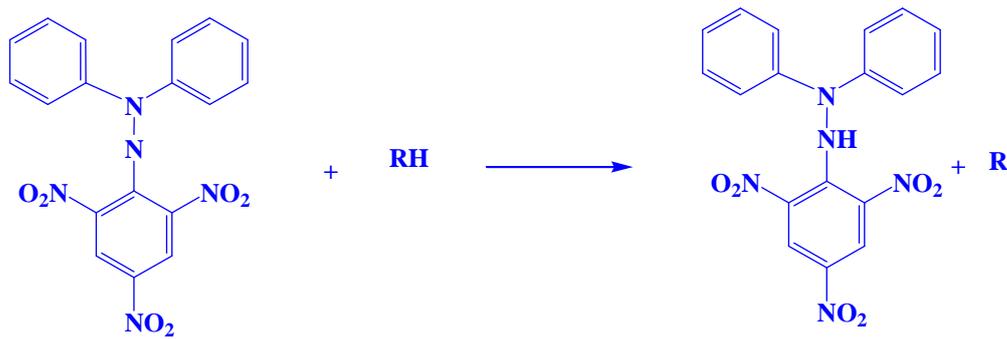
Un volume de 50  $\mu$ l de l'extrait est mélangé avec : 130  $\mu$ l de méthanol, 10  $\mu$ l d'acétate de potassium (1M) et 10  $\mu$ l de nitrate d'aluminium (10%). Le mélange est ensuite maintenu à la température ambiante pendant 40 min puis une lecture d'absorbance est réalisée à 415 nm. La quercétine (20%) est utilisée comme contrôle positif, à partir de la quelle une courbe d'étalonnage a été établie.

### **III.3.3. activité antioxydants**

#### **III.3.3.1. Activité antiradicalaire au DPPH•**

➤ **Le principe**

La DPPH est l'une des techniques les plus anciennes et les plus populaires utilisées pour mesurer l'activité antioxydante d'un composé. Cette méthode a été décrite pour la première fois par **Blois. (1958)** et modifiée par la suite par de nombreux chercheurs. Cette méthode mesure la capacité réductrice des antioxydants à DPPH•. L'effet antioxydant est proportionnel à la disparition de DPPH• dans une solution méthanolique. La solution de DPPH étant violette, est réduite en recevant un atome d'hydrogène des antioxydants à l'hydrazine correspondante et se décolore donc en jaune (**Contrerasguzman et Strong, 1982**). Cette transformation peut être suivie par spectrophotométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm (**Molyneux, 2004**).



### Transformation du radical DPPH<sup>•</sup> en DPPHH

**Figure 6 :** Transformation du radical DPPH<sup>•</sup> en DPPHH. (Blois, 1958)

#### ➤ Le mode opératoire

L'activité de piégeage de radical DPPH<sup>•</sup> a été élaboré selon la méthode décrite par **Blois. (1958)**. Sur une microplaque à 96 puits, une solution de 160 µL de DPPH<sup>•</sup> (6%) est additionnée à 40 µL de solution d'extraits préparé à plusieurs concentrations. La conservation du mélange a été faite a une température ambiante pendant 30 minutes, en utilisant de méthanol à 95 % comme blanc.

- La lecture de l'absorbance de l'échantillon et du blanc a été réalisée à 517 nm.
- L'activité antiradicalaire au DPPH<sup>•</sup> a été exprimée en équivalents de BHA et le BHT (50%) comme standards.
- L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon.
- Les pourcentages d'inhibition de DPPH des échantillons étaient calculés :

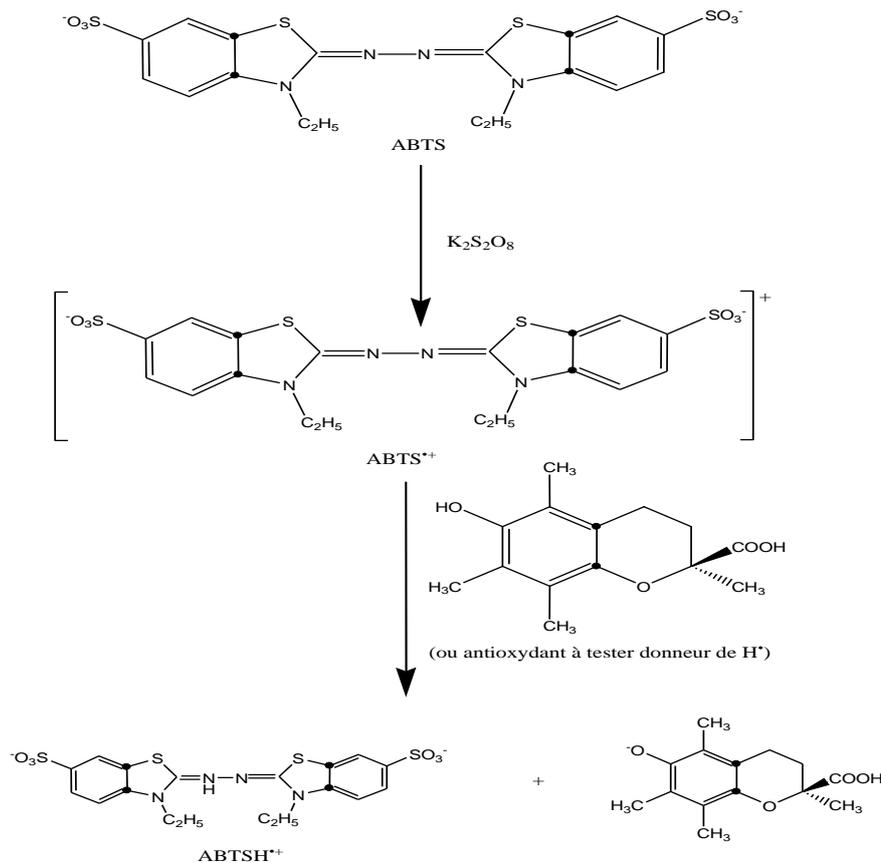
$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \right] \times 100$$

Où  $A_{\text{contrôle}}$  est l'absorbance du contrôle négatif, et  $A_{\text{extrait}}$  est l'absorbance de l'extrait/standard.

### III.3.3.2. Activité du piégeage du cation radical $ABTS^{\bullet+}$

#### ➤ Le principe

L'essai ABTS est une méthode spectrophotométrique qui mesure la capacité d'un antioxydant à récupérer un cation de radical libre  $ABTS^{\bullet+}$ . Cette méthode a été développée par **Miller et al., (1993)** et adaptée par **Re et al., (1999)**. Pour générer directement le radical  $ABTS^{\bullet+}$  par une réaction entre la solution ABTS avec persulfate de potassium dans l'eau. Le mélange réactionnel, que l'on laisse reposer à température ambiante pendant 12-16 h avant l'utilisation, produit une solution bleu foncé. Ainsi, le mélange est dilué avec de l'éthanol ou une solution saline tamponnée au phosphate (pH 7,4) jusqu'à une absorbance de 645 nm à 734 nm (longueur d'onde la plus utilisée) et 37 °C. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la consommation du radical  $ABTS^{\bullet+}$  suite à l'addition d'un échantillon antioxydant. Ce dernier réagit avec  $ABTS^{\bullet+}$  (en excès) par transfert d'électrons pour redonner l'ABTS incolore (**Roginsky et Lissi, 2005**).



**Figure 7 :** Formation et piégeage du radical  $ABTS^{\bullet+}$  par un antioxydant donneur de  $H^{\bullet}$  (Re, 1999)

### ➤ Mode opératoire

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de **Re et al., (1999)**. Sur une microplaque à 96 puits, une solution de 160  $\mu$ l d'ABTS  $\bullet+$  (7 mM) a été embrouillée avec 40  $\mu$ l de l'extrait dilué dans le méthanol à plusieurs concentrations. Ce dernier a été conservé à l'obscurité et à température ambiante pendant 10 min.

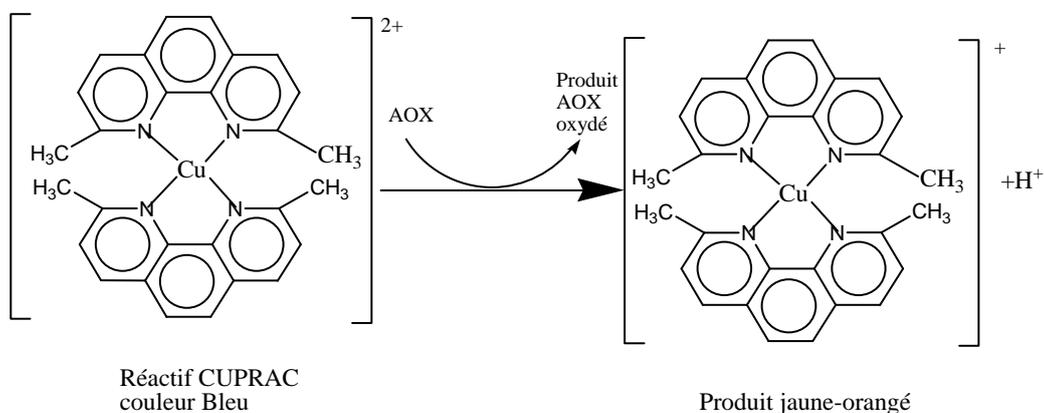
- La lecture de l'absorbance de l'échantillon et du blanc a été réalisée à 734 nm.
- Activité du piégeage du cation radical  $ABTS^{\bullet+}$  a été exprimée en équivalents de BHA et le BHT (50%) comme standards.
- L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon.
- Le pourcentage d'inhibition d'ABTS a été calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \right] \times 100$$

### III.3.3.3. Activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC)

#### ➤ Le principe

Ce dosage est basé sur la réduction du Cu (II) en Cu (I) par les antioxydants présents dans l'échantillon. Le Cu (I) forme un complexe avec la néocuproïne (2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline) cuivre-néocuproïne [Cu<sup>2+</sup>-Nc<sub>2</sub>]. Ce dernier est réduit produisant ainsi un complexe chromogène de Cu<sup>+</sup>-Nc, cette réaction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm (Apak *et al.*, 2004).



**Figure 8 :** Réduction du complexe chromogène de Cu<sup>2+</sup>-Nc<sub>2</sub> (Özyürek *et al.*, 2011)

#### ➤ Mode opératoire

La capacité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) a été déterminée selon la méthode d'Apak *et al.*, (2004). Des mélanges réactionnels contenant 60 µl d'acétate d'ammonium (7,7%), 50 µl de chlorure de cuivre (0,1%), 50

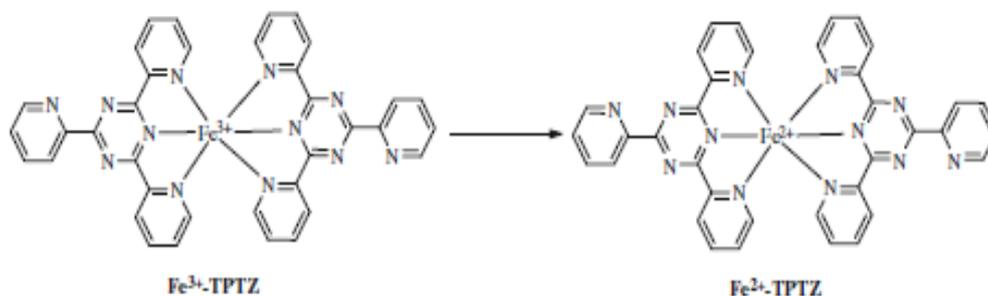
$\mu\text{l}$  de néocuproïne (0,1%) et 40  $\mu\text{l}$  d'extrait dilué dans le méthanol ont été préparés dans une microplaque à 96 puits, pour arriver à un volume total de 200  $\mu\text{l}$ , Après une heure d'incubation.

- La lecture de l'absorbance de l'échantillon et du blanc a été réalisée à 450 nm.
- L'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) a été exprimée en équivalents de BHA et le BHT (50%) comme standards.
- L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon.
- Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

#### III.3.3.4. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

##### ➤ Le principe

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction oxydoréduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition ; notamment le fer, le ferricyanure de potassium  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$  fournit le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) qui sera réduit en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) par les antioxydants présents dans l'extrait végétal (Khadhri et al., 2013). La forme réduite de ce complexe donne une coloration bleu verte, qui absorbe à 700 nm.



**Figure 9** : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe Tripyridyltriazine ferrique  $\text{Fe}(\text{III})$ -TPTZ et un antioxydant (AH) (Prior et al., 2005)

➤ **Le mode opératoire**

Le pouvoir réducteur des extraits de feuilles d'*Eriobotrya japonica* est déterminé par la méthode d' **Oyaizu. (1986)** avec quelques modifications. Un volume de 10 µl de l'extrait à différentes concentrations est additionné à 40 µl d'une solution tampon phosphate (pH 6,6) et à 50 µl d'une solution de ferricyanide de potassium (1%). L'ensemble est incubé à l'étuve à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 50 µl d'acide trichloroacétique (10%) sont ajoutés pour stopper la réaction. Enfin, un volume de 40 µl d'eau distillée et 10 µl d'une solution de chlorure de fer anhydre (0,1%) sont ajoutés.

- La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol.
- L'activité du pouvoir réducteur (FRAP) a été exprimée en équivalents de deux solutions d'antioxydants standards, l'acide ascorbique et l'α-tocophérol (400%).
- L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon.
- Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

### III.3.3.5 Activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup> phénantroline

➤ **Le Principe**

Le complexe rouge Fe(II)-phénanthroline (Phen) est largement utilisé dans la méthode spectrophotométrique classique pour la détermination du fer (**Szydłowskaczerniak et al., 2008**). Cette technique est basée sur la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénantroline rouge-orangé suite à une réaction d'oxydoréduction. Ce complexe est soluble à pH basique et peut être mesuré à une absorbance de 510 nm (**Adhikamsetty et al., 2008**).

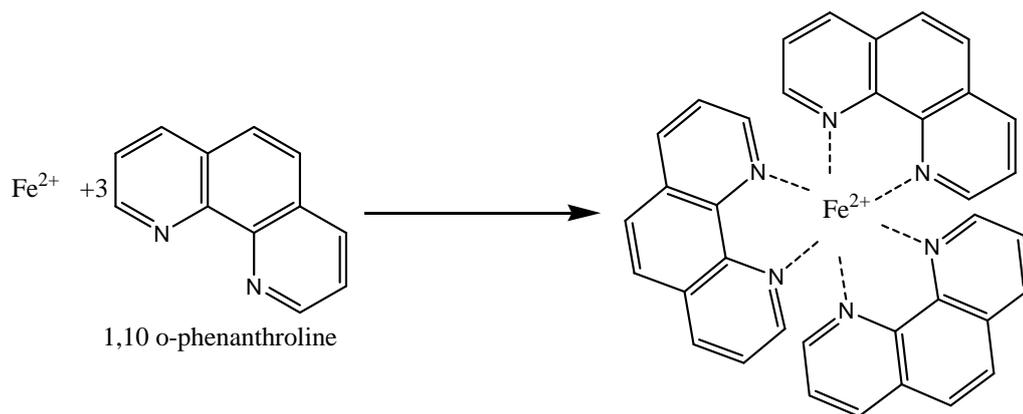


Figure 10 : Formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -phénantroline (Apak *et al.*, 2007)

#### ➤ Le mode opératoire

L'activité de phénantroline est décrite par la méthode de **Szydłowska-Czerniak *et al.*, (2008)**. Un volume de 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait à différentes concentrations est déposé avec 50  $\mu\text{l}$  de chlorure de fer anhydre (0,2%), 30  $\mu\text{l}$  de phénantroline (0,5%) et 110  $\mu\text{l}$  de méthanol. Le mélange obtenu est incubé dans l'étuve à 30°C pendant 20 min.

- La lecture de l'absorbance de l'échantillon et du blanc a été réalisée à 510 nm.
- L'activité de réduction par la formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$  phénantroline a été exprimée en équivalents de BHA et le BHT (50%) comme standards.
- L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon.
- Les résultats ont été calculés à titre de  $A_{0,50}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

#### III.3.3.6. Activité Silver nanoparticle (SNP)

##### ➤ Le principe

Les SNP ont des propriétés et des applications diverses, comme les conductivités, stabilité chimique, catalytique et antibactérienne, le séquençage de l'ADN (**Cao *et al.*, 2002** ; **Fratini *et al.*, 2005**). Les agents réducteurs couramment utilisés pour production de SNP stables sous forme de dispersions colloïdales 9 sont le sodium

borohydrure, citrate de sodium, acide ascorbique, et élémentaire hydrogène (Fratini et al., 2005). Dans un premier temps, la réduction de diverses espèces d'Ag<sup>+</sup> conduit à la formation des atomes d'argent (Ag<sup>0</sup>), qui est suivie par l'agglomération en amas oligomères. Ces amas conduisent finalement à la formation de particules colloïdales d'Ag (Kappor et al., 1994). Outre, les agents réducteurs classiques, divers extraits végétaux et biologiques ont été utilisés comme réducteurs pour la synthèse des SNP (Forough et al., 2010).

#### ➤ Le mode opératoire

L'activité Métal Chélate a été étudiée par la méthode d'Ozyürek et al., (2012). On a administré 20 µl de l'extrait à différentes concentrations avec 130 µL (solution SNP) (Annexe II), 50 µl H<sub>2</sub>O. Le mélange acquis est incubé dans l'étuve à 25°C pendant 30 min.

- La lecture de l'absorbance de l'échantillon et du blanc a été réalisée à 423 nm.
- L'activité Silver nanoparticle (SNP) a été exprimée en équivalents de Trolox comme standard.
- L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon.
- Le pourcentage d'inhibition d'SNP a été calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[ \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{extrait}}}{A_{\text{extrait}}} \right] \times 100$$

### III.3.4. Activité enzymatique

#### III.3.4.1. Evaluation de l'activité antidiabétique

L'activité antidiabétique de différents extraits de feuilles d'*Eriobotrya japonica* a été évaluée en utilisant la méthode d'inhibition de l'enzyme l'alpha-amylase.

➤ **Le principe**

Dans le milieu réactionnel, lorsque l'enzyme  $\alpha$ -amylase est active, l'amidon (le substrat de l'enzyme) est hydrolysé en libérant des unités de maltose et de glucose.

Le test d'inhibition de  $\alpha$ -amylase est basé sur la colorimétrie à base de solution d'iode pour déterminer la quantité d'amidon hydrolysé (Yang et al., 2012).

➤ **Le mode opératoire**

L'activité inhibitrice de l'alpha-amylase a été déterminée par la méthode de Zengin et al., (2014) avec quelques modifications.

Des mélanges de  $\alpha$ -amylase (50  $\mu$ l) (1U) avec des solutions d'extrait de différentes concentrations (25  $\mu$ l) ont été préparés dans une Microplaque à 96 puits, puis incubés pendant 10 min à 37°C. La réaction a été ensuite initiée en ajoutant une solution d'amidon (50  $\mu$ L, 0.1%). Les mélanges réactionnels ont de nouveau été incubés pendant 10 minutes à 37°C. La réaction a ensuite été arrêtée en ajoutant 25  $\mu$ l d'acide chlorhydrique (HCl, 1 M), et 100  $\mu$ l d'iodure de potassium (KI) (Annexe VI).

En parallèle à cela, des blancs à base de solutions d'extrait de différentes concentrations ont également été préparés (un blanc est constitué d'une solution d'extrait d'une concentration donnée, d'amidon, d'acide chlorhydrique, et d'iodure de potassium).

- La lecture de l'absorbance de l'échantillon et du blanc a été réalisée à 630 nm.
- L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon.
- L'activité inhibitrice de  $\alpha$ -amylase a été exprimée en équivalents d'acarbose (400%) (voir figure 11).
- Le pourcentage d'inhibition de  $\alpha$ -amylase a été calculé avec la formule suivante :

$$\% \text{Inhibition} = 1 - \left[ \frac{(\text{Ac} - \text{Ae}) - (\text{As} - \text{Ab})}{(\text{Ac} - \text{Ae})} \right]$$

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	A <sub>b1</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	A <sub>b2</sub>	As	As	As	A <sub>b</sub>
B	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	A <sub>b1</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	A <sub>b2</sub>	As	As	As	A <sub>b</sub>
C	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	A <sub>b1</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	A <sub>b2</sub>	As	As	As	A <sub>b</sub>
D	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	A <sub>b1</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	A <sub>b2</sub>	As	As	As	A <sub>b</sub>
E	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	A <sub>b1</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	A <sub>b2</sub>	As	As	As	A <sub>b</sub>
F	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	A <sub>b1</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	A <sub>b2</sub>	As	As	As	A <sub>b</sub>
G	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	As <sub>1</sub>	A <sub>b1</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	As <sub>2</sub>	A <sub>b2</sub>	As	As	As	A <sub>b</sub>
H	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ae	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac	Ac

Figure 11 : Récapitulatif des différentes solutions préparées.

A<sub>c</sub>=Absorbance [Amidon + KI + HCl + solvant d'extrait + tampon Enzyme]

A<sub>e</sub>=Absorbance [Enzyme + Amidon + KI + HCl + solvant d'extrait]

As=Absorbance [Enzyme + Extrait + Amidon + KI + HCl]

A<sub>b</sub>=Absorbance [Extrait + KI + tampon].

### III.3.4.2. Evaluation de l'activité anticholinestérase

L'activité anticholinestérase des divers extraits de la plante *Eriobotrya japonica* est réalisée par la méthode d'inhibition des deux enzymes butyrylcholinestérase et Acetylcholinestérase.

#### ➤ Le principe

Cette méthode est basée sur la mesure du taux de production de la thiocholine résultante de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine ou de la butyrylcholine.

Sachant que la réaction de la thiocholine avec le dithiobisnitrobenzoate (DTNB) conduit à la formation de l'acide 5-thio 2-nitrobenzoïque (TNB), de couleur jaune, et d'un mélange disulphide, il suffit donc de mesurer le taux de production de l'acide 5

thio 2-nitrobenzoïque en utilisant un photomètre (la coloration jaune est lisible à 412nm) pour remonter au taux de production de la thiocholine.

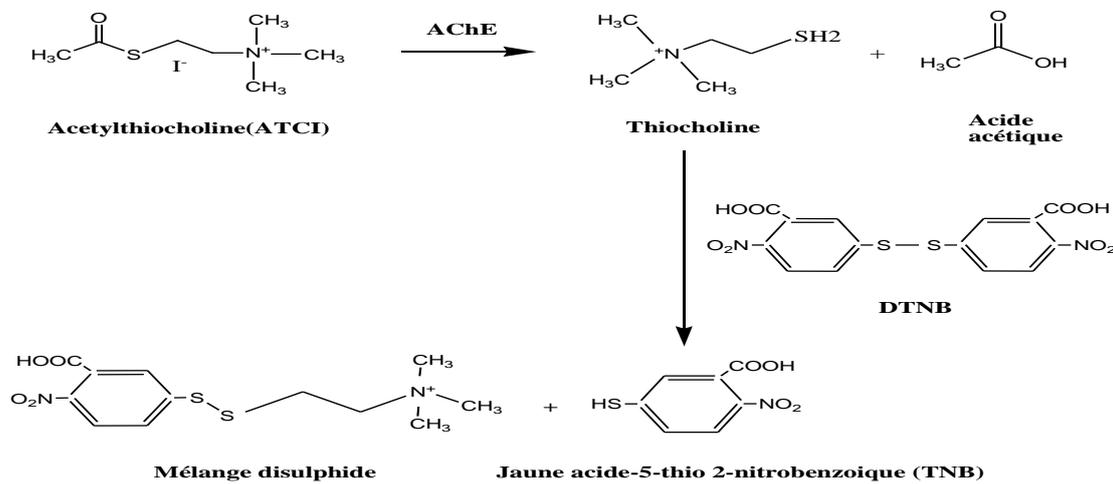


Figure 12 : Mécanisme chimique de la méthode d'Ellman *et al.*, (1961)

### ➤ Le mode opératoire

L'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase (BChE) et de l'Acetylcholinestérase (AChE) de différents extraits de feuilles d'*Eriobotrya japonica* a été évaluée en utilisant la méthode de spectrophotométrie développée par Ellman *et al.* (1961).

En utilisant une microplaque à 96 puits, des solutions à base de 150 µl de tampon phosphate de sodium (100 mM ; pH= 8), de 10 µl d'une solution d'extrait d'une concentration donnée, et de 20 µl de BChE ( $6,85 \times 10^{-3}$  U) ou de AChE ( $5,32 \times 10^{-3}$  U) ont été préparées. Après 15 min d'incubation à 25°C, un volume de 10 µl de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque) (0,5 mM) a été ajouté. La réaction a été ensuite initiée en ajoutant 20 µl d'acétylcholine iodure (0.71 mM) (ou butyrylcholine iodure) (0.2 mM). Parallèlement à cela, des blancs ont également été préparés (les blancs ne contiennent pas de solution enzymatique (AChE ou BChE).

- La réaction d'hydrolyse a été contrôlée par spectrophotométrie à 412 nm.
- L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon.
- L'activité inhibitrice du cholinestérase a été exprimée en équivalents de galanthamine (400%).
- Le pourcentage d'inhibition d'AChE ou BChE a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$(\%) \text{ d'inhibition de AChE ou BChE} = \frac{E - S}{E} \times 100$$

'E' est l'activité de l'enzyme sans extrait.

'S' est l'activité de l'enzyme avec l'extrait.

### III.3.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (*in vitro*)

L'activité anti-inflammatoire de divers extraits de feuilles d'*Eriobotrya japonica* a été étudiée en utilisant la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines.

#### ➤ Le principe d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA)

Le principe consiste à l'inhibition de dénaturation du BSA provoquée par la chaleur (72°C) par les extraits.

L'albumine est la protéine du plasma la plus abondante chez l'homme et d'autres mammifères. L'albumine est essentielle pour maintenir la pression colloïdale osmotique requise pour la distribution appropriée des fluides corporels entre les compartiments intravasculaires et les tissus. La BSA est généralement employée comme une protéine modèle dans plusieurs domaines de recherche comme, entre autres, la biologie moléculaire, la médecine, l'agro-alimentaire et l'environnement (Rojas, 2009).

➤ **Le mode opératoire**

L'activité inhibitrice de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) a été étudiée par la méthode de **Kandikattu. (2013)**, avec quelques modifications. Dans un tube à essai, un volume de 500 µl d'une solution d'extrait de concentration donnée a été mélangé avec 500 µl de solution de BSA (0.2%), Pour chaque concentration d'extrait, un blanc constitué de 500 µl d'extrait et de 500 µl de Tris-Hcl (0,6%) a été préparé (Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait et de Tris-Hcl des résultats obtenus). De même, un control a été préparé en ajoutant un volume de 500 µl de solution de BSA (0.2%) à 500 µl du solvant utilisé dans la préparation des extraits (le résultat obtenu correspond à la dénaturation totale du BSA en absence de substance inhibitrice). Après incubation à 37°C pendant 15 min, les tubes à essai ont été chauffés dans un bain marie à 72°C pendant 5 minutes puis refroidis pendant 10 minutes. Chaque expérience a été réalisée en trois exemplaires.

- L'absorption de ces solutions a été déterminée à une longueur d'onde de 660 nm.
- L'absorbance du blanc a été soustraite de celle de l'échantillon.
- L'activité inhibitrice de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) a été exprimée en équivalents de Diclofénac (500 ppm).
- Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$(\%) \text{ d'inhibition de la dénaturation} = \frac{A_c - A_e}{A_c} \times 100$$

$A_c$  absorbance de control

$A_e$  absorbance des extraits

#### **III.4. Etude statistiques**

Les courbes de variation de l'absorbance en fonction de la concentration ont été générées en utilisant le pourcentage d'inhibition des différentes concentrations étudiées.

- Trois mesures ont été réalisées pour chaque échantillon analysé et les résultats ont été exprimés sous la forme : moyenne  $\pm$  écartype (SD).
- Les valeurs de  $CI_{50}$  (Concentration d'inhibition à 50%) et de  $A_{0,50}$  (la concentration indiquant 0,50 d'absorbance) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de deux courbes : [% inhibition = f (concentrations)] pour la  $CI_{50}$  et [Absorbance = f (concentrations)] pour la  $A_{0,50}$ .

# *Chapitre IV*

## *Résultats et Discussion*

#### IV.1 Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes

##### IV.1.1 Détermination du contenu total en polyphénols

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 13,14 et le tableau 1. L'acide gallique a été utilisé comme standard et la courbe d'étalonnage ayant l'équation suivante :

$$y = 0,0034x + 0,1044 \quad \text{avec } R^2 = 0,9972$$

La quantité des polyphénols a été rapportée en microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme du poids de l'extrait ( $\mu\text{g EAG} / \text{mg d'extrait}$ ).

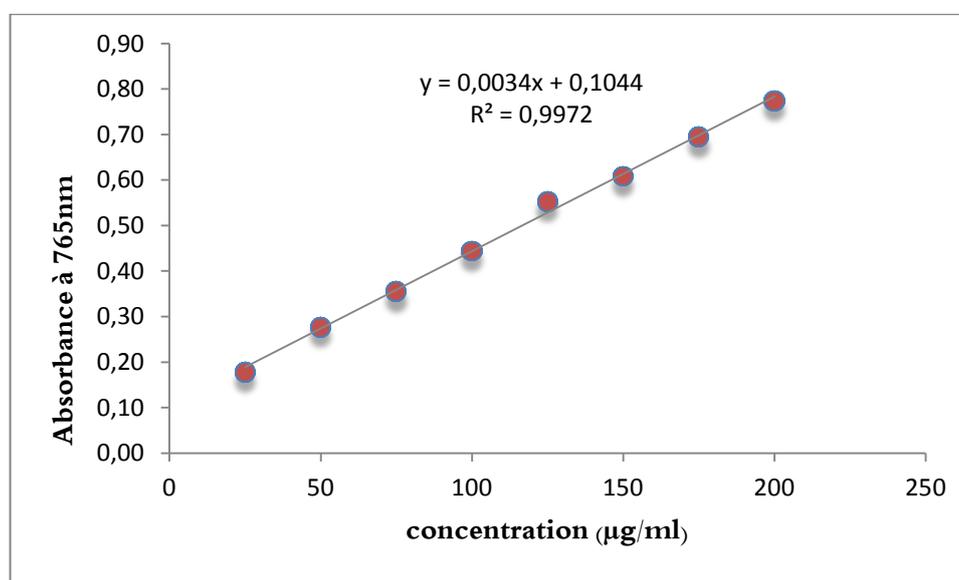
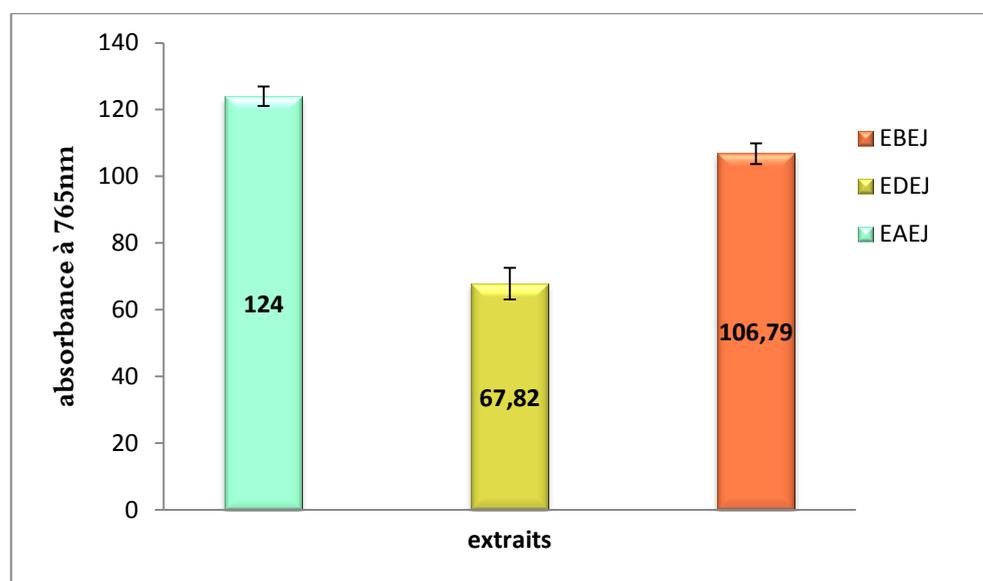


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude du contenu total en polyphénols des extraits d'*Eriobotrya japonica* L

Extraits	Contenu total de composés phénoliques ( $\mu\text{g EAG} / \text{mg d'extrait}$ )
<b>EAEJ</b>	124 $\pm$ 2,94
<b>EDEJ</b>	67,82 $\pm$ 4,73
<b>EBEJ</b>	106,79 $\pm$ 3,08



**Figure 14 :** Représentation graphique des teneurs en phénols totaux des extraits des feuilles *d'Eriobotrya japonica L*

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'extrait EAEJ est le solvant qui a pu d'extraire le maximum de polyphénols avec un taux de  $124 \pm 2,94 \mu\text{g EAG/ mg}$  d'extrait, suivi par les extraits EBEJ et EDEJ avec un taux de  $106,79 \pm 3,08$  et  $67,82 \pm 4,73 \mu\text{g EAG/ mg}$  d'extrait respectivement. Ces derniers sont plus pauvres en polyphénols.

La différence de la teneur en polyphénols des extraits bruts et de leurs fractions résulte de la différence de polarité des solvants organiques, le temps et la température d'extraction, le rapport solide-liquide d'extraction ainsi que la nature chimique et les caractéristiques physiques des échantillons (Dai et Mumper, 2010).

Nous remarquons que l'extrait EAEJ qui a révélé la teneur la plus élevée en phénols totaux avec un taux de  $124 \pm 2,94 \mu\text{g EAG/ mg}$  d'extrait, cela explique que les polyphénols sont des composés très polaire étant donné leur richesse en groupements hydroxyles, donc ils se solubilisent dans les solvants polaires.

Cependant, la faible teneur en phénols totaux enregistrée dans l'extrait EDEJ pourrait s'expliquer par le fait il contient beaucoup de composés phytochimiques

qui engendre un encombrement stérique ce qui empêcherait la révélation des phénols totaux par le réactif de folin-ciocalteu (Garcia et al., 2004).

Selon Hong et al., (2008), l'extrait des feuilles d'*Eriobotrya japonica.L* a laissé apparaître une teneur en phénols totaux de  $54,9 \pm 2,4$  mg équivalent acide gallique/ g d'extrait.

Une teneur en polyphénoles de  $71,94 \pm 11,93$  mg EAG/g d'extrait méthanolique d'*Eriobotrya japonica.L* à été trouvé par Uysal et ces collaborateurs (2016) qui est supérieure de celle de l'extrait dichlorométhane de notre plante ( $67,82 \pm 4,73$   $\mu$ g EAG/mg d'extrait ).

#### IV.1.2 Détermination de la teneur des flavonoïdes

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 15,16 et le tableau 2, La quercétine a été utilisée comme standard et la courbe d'étalonnage ayant l'équation suivante :

$$y = 0,0071x + 0,0274 \quad \text{avec } R^2 = 0,9985$$

La teneur des flavonoïdes a été rapportée en microgramme d'équivalent de la quercétine par milligramme du poids de l'extrait ( $\mu$ g EQ / mg d'extrait).

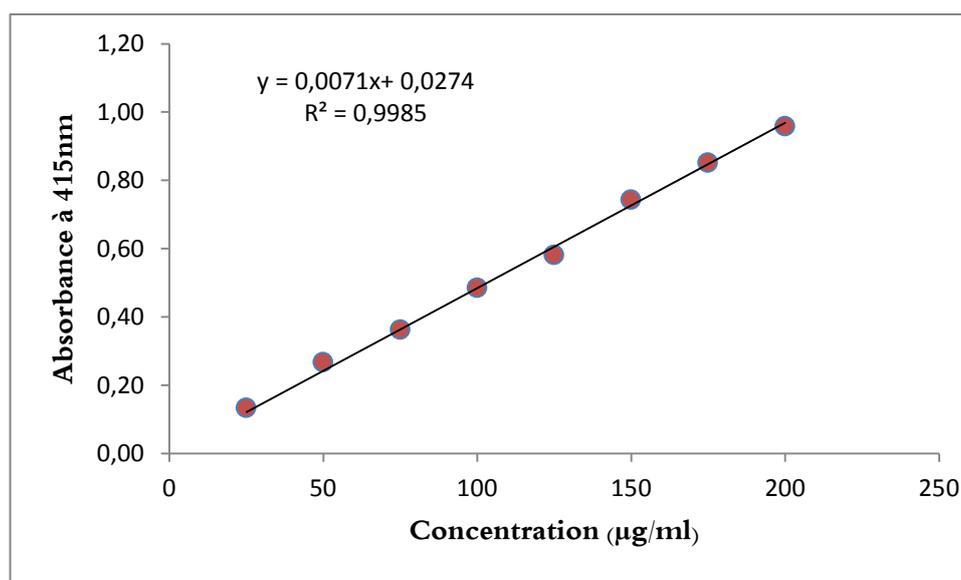
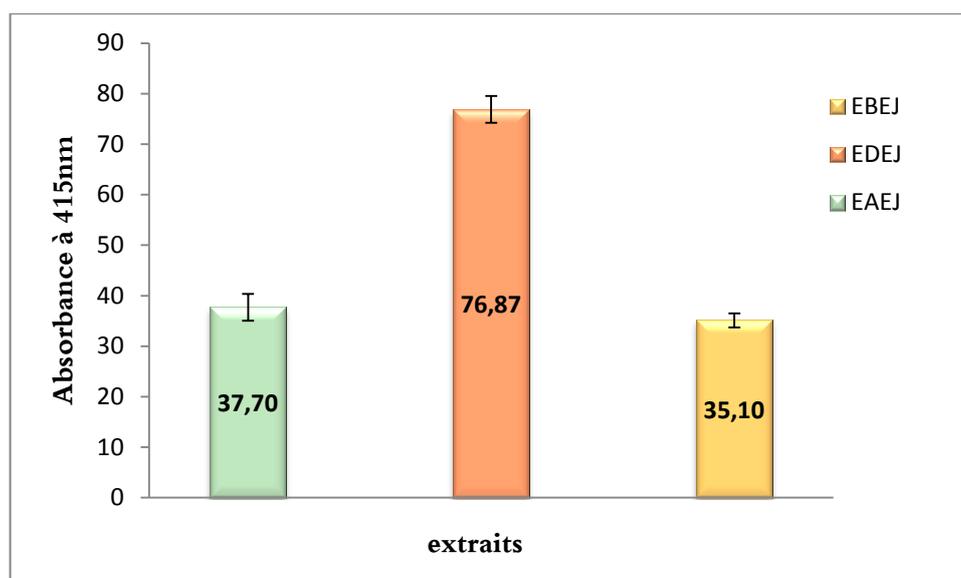


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la quercétine



**Figure 16 :** Représentation graphique des teneurs en flavonoïdes des extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica L*

**Tableau 2 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude du contenu total en flavonoïdes des extraits d'*Eriobotrya japonica L*

Extraits	Flavonoïdes content ( $\mu\text{g EAG/ mg d'extract}$ )
<b>EAEJ</b>	37,70 $\pm$ 2,65
<b>EDEJ</b>	76,87 $\pm$ 2,65
<b>EBEJ</b>	35,10 $\pm$ 1,39

Les résultats obtenus montrent que les taux en flavonoïdes sont appréciables et c'est l'extrait EDEJ qui a donné la teneur la plus élevée (76, 87 $\pm$ 2,65 $\mu\text{g EAG/ mg d'extract}$ ), étant donné que les flavonoïdes constituent de petites molécules riches en groupements hydroxyles donc ils sont très polaires, ils se solubilisent dans les solvants polaires (Siddhuraju et Becker, 2007) .

Il est à noter que la faible quantité en flavonoïdes de l'extrait EBEJ, peut être dû à la présence de plusieurs composés phytochimiques qui empêchent la formation du

complexe flavonoïdes- chlorure d'aluminium, ce qui restreindre la révélation des flavonoïdes (Garcia et al., 2004).

Une teneur en flavonoïde de  $31,94 \pm 0,08$  mg /g d'extrait méthanolique a été trouvée par Uysal et ces collaborateurs. (2016) qui est proche de celle de l'extrait EBEJ ( $35,10 \pm 1,39$  µg EAG/ mg d'extrait) et l'extrait EAEJ ( $37,70 \pm 2,65$  µg EAG/ mg d'extrait) de notre plante.

## **IV.2 Activité antioxydante**

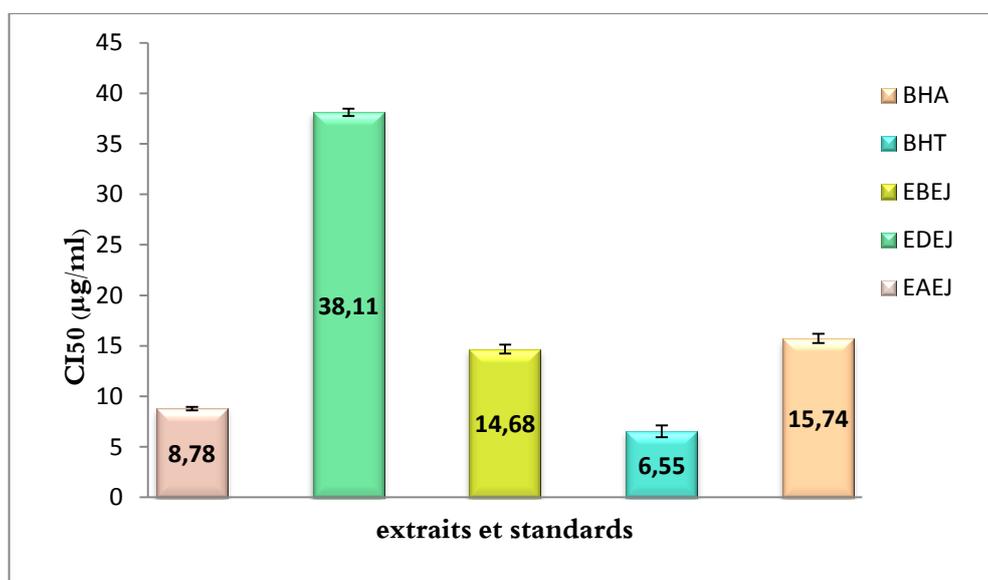
L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits : dichlorométhane (EDEJ), acétate d'éthyle (EAEJ) et butanolique (EBEJ) d'*Eriobotrya japonica* L, a été réalisée par l'utilisation de six méthodes.

### **IV.2.1 Activité antiradicalaire au DPPH**

Dans cette étude, l'activité antiradicalaire d'extraits d'*Eriobotrya japonica* L a été évalué par la mesure des concentrations inhibitrices à 50 % ( $CI_{50}$ ) ; en se basant sur la capacité d'une substance à réduire le radical DPPH ; par rapport à un antioxydant standard (BHA et BHT). Les résultats sont présentés dans le tableau 3 et la figure 17 au dessous :

**Tableau 3 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre d'Activité antiradicalaire au DPPH : valeurs d'Inhibition enregistrées et CI50 calculées

Concentration (µg/ml) Extraits et standards	% Inhibition							CI <sub>50</sub> (µg/ml)
	0,78125 µg	1,5625 µg	3,125 µg	6,25µg	12,5µg	25µg	50µg	
<b>EAEJ</b>	0	0	3,79±2,61	35,05±1,57	77,03±0,84	78,00±1,47	77,20±1,65	8,78±0,17
<b>EDEJ</b>	0	0	0	0	2,58±0,73	30,22±0,61	69,86±0,78	38,11±0,35
<b>EBEJ</b>	0	0	8,46±0,61	11,20±4,33	58,82±3,91	78,89±0,14	77,92±0,37	14,68±0,45
<b>BHT</b>	28,52±1,67	31,30±1,37	37,71±3,01	47,54±0,13	62,16±2,11	77,60±0,83	88,33±0,38	6,55±0,59
<b>BHA</b>	0,09±2,33	3,97±1,92	12,94±4,21	26,68±0,18	47,12±2,95	68,69±1,17	83,69±0,54	15,74 ±0,47



**Figure 17 :** CI<sub>50</sub> obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité antiradicalaire au DPPH de différents extraits d'*Eriobotrya japonica* L

Les résultats obtenus montrent que l'extrait EAEJ (CI<sub>50</sub>= 8,78±0,17 µg/ml) possède une excellente activité antiradicalaire par rapport au standard BHT (CI<sub>50</sub>= 6,55±0,59 µg/ml) et deux fois plus faible que celle du BHA (CI<sub>50</sub>=15,74 ±0,47 µg/ml), et cette activité est moins efficace pour les extraits EBEJ (CI<sub>50</sub>=14,68±0,45 µg/ml) et

EDEJ (CI50=38,11±0,35 µg/ml). Cependant, EBEJ a manifesté une forte activité par rapport au standard BHA.

On constate que c'est l'extrait d'acétate d'éthyle qui a donné une meilleure activité inhibitrice du radical DPPH comparativement aux deux autres extraits et cela serait dû à sa richesse en phénols totaux.

L'étude de **Maher et al. (2015)**, montre que l'extrait des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L a donné un CI50=12 µg / ml. Ce résultat montre qu'il existe une corrélation entre la richesse en composés phénoliques et des flavonoïdes et l'activité antiradicalaire.

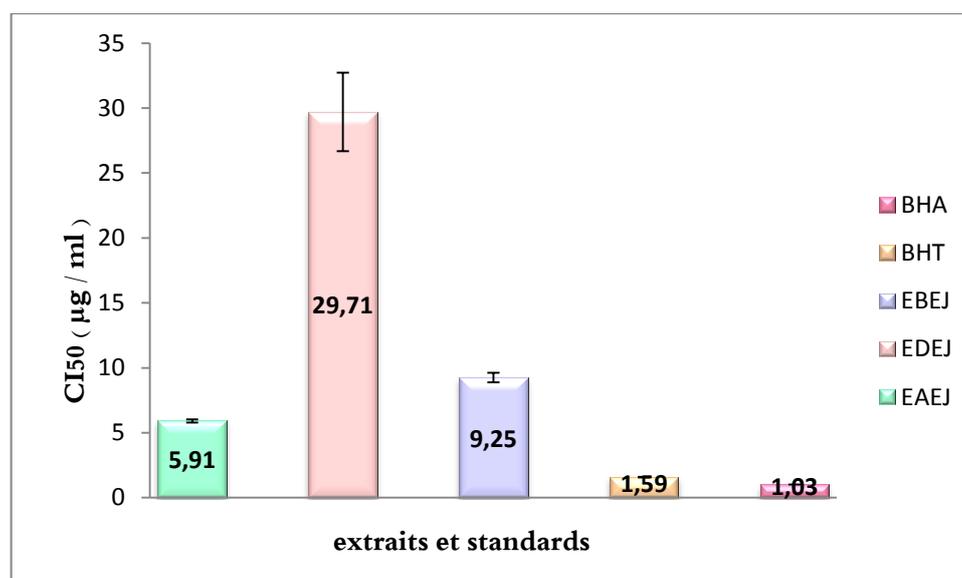
En outre, **Uysal et ses collaborateurs. (2016)**, ont montré que les extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L ont exhibé une inhibition positive du radical DPPH (10.61±1.16 mg / g).

#### **IV.2.2 Activité du piégeage du cation radical ABTS<sup>•+</sup>**

La détermination de la concentration inhibitrice des différents extraits en comparant avec les standards BHA et BHT sont illustrés dans le tableau 4 et la figure 18 ci-dessous :

**Tableau 4 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'activité du piégeage du cation radical  $ABTS^{\bullet+}$ : valeurs d'Inhibition enregistrées et CI50 calculées

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	% Inhibition							CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
	1.5625 $\mu\text{g}$	3.125 $\mu\text{g}$	6.25 $\mu\text{g}$	12.5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	
<b>EAEJ</b>	0,14±1,42	23,92±1,33	53,29±1,50	82,67±2,65	89,12±0,27	89,97±0,00	89,97±0,23	5.91±0,13
<b>EDEJ</b>	0	0	0	14,98±1,52	43,11±5,04	76,76±2,78	88,58±0,84	29,71± 3,02
<b>EBEJ</b>	0	10,32±0,59	33,63±2,22	67,67±1,64	88,96±0,49	88,50±2,36	89,97±0,00	9,25±0,36
<b>BHT</b>	49.22±0.75	59.22±0.59	78.55±3.43	90.36±0.00	92.18±1.27	93.37±0.86	94.87±0.87	1.59±0,03
<b>BHA</b>	83.42±4.09	93.52±0.09	93.58±0.09	93.63±0.16	93.63±0.95	94.20±0.90	95.39±2.62	1.03±0,00



**Figure 18 :** CI50 obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité du piégeage du cation radical  $ABTS^{\bullet+}$  de différents extraits d'*Eriobotrya japonica* L

D'après les résultats obtenus, on constate que la capacité de piégeage du radical ABTS●+ présentée par l'EAEJ ( $CI_{50}=5.91\pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ ) est cinq fois plus faible que le standard BHA ( $CI_{50}=1.03\pm 0.00 \mu\text{g/ml}$ ) et BHT ( $CI_{50}=1.59\pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ ), et deux fois plus fort que l'extrait EBEJ ( $CI_{50}=9,25\pm 0,36 \mu\text{g/ml}$ ), cette capacité est suivie par l'extrait EDEJ ( $CI_{50}=29,71\pm 3,02 \mu\text{g/ml}$ ).

Ceci étant dû à sa richesse en composés phénoliques (phénols totaux, flavonoïdes) qui sont des molécules riches en groupements hydroxyles donneur d'hydrogènes et d'électrons (Jayaprakasha et al., 2008).

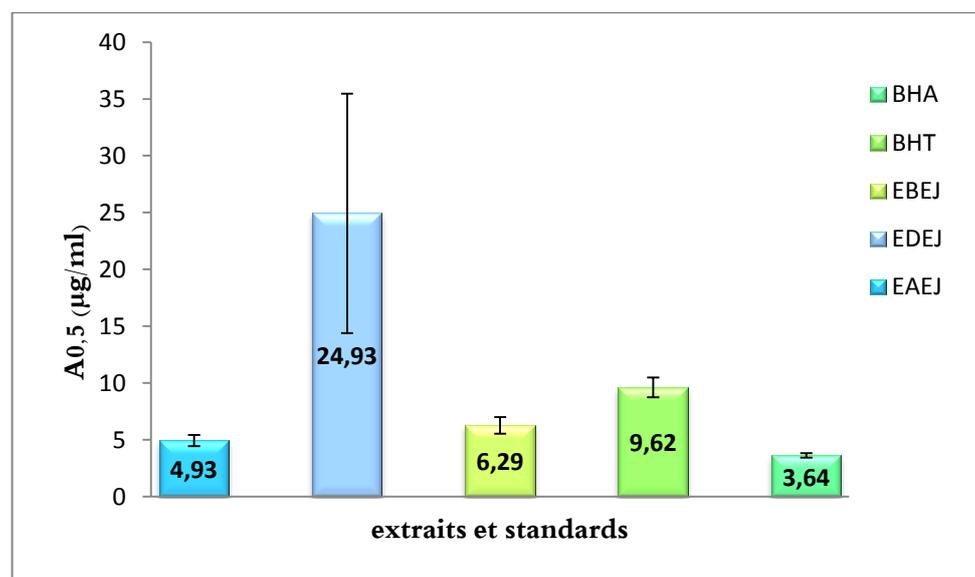
L'étude de Xu et Chen. (2011) a indiquée que l'activité de piégeage des radicaux ABTS de la plante d'*Eriobotrya japonica* L s'échelonnait de 1,32 à 3,30 mol TE/g.

#### IV.2.3 Activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC)

C'est une réaction de réduction du complexe cuivre-néocuproïne [ $Nc_2-Cu^{2+}$ ], le dosage de cette réaction est mesuré à titre de valeurs  $A_{0,50}$  des extraits d'*Eriobotrya japonica* L et des standards BHA et BHT mentionnées dans le tableau 5 et la figure 19.

**Tableau 5 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) : valeurs d'absorbance enregistrées et  $A_{0,5}$  calculées

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )  Extraits et standards	Absorbance							$A_{0,5}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	1.5625 $\mu\text{g}$	3.125 $\mu\text{g}$	6.25 $\mu\text{g}$	12.5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	
<b>EAEJ</b>	0,27 $\pm$ 0,14	0,43 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,34	1,04 $\pm$ 0,20	1,86 $\pm$ 0,07	2,95 $\pm$ 0,10	4,93 $\pm$ 0,49
<b>EDEJ</b>	0,33 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,00	0,42 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,06	0,68 $\pm$ 0,18	1,20 $\pm$ 0,03	24,93 $\pm$ 10,53
<b>EBEJ</b>	0,37 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,16	1,33 $\pm$ 0,51	2,48 $\pm$ 0,16	6,29 $\pm$ 0,73
<b>BHT</b>	0,11 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,07	1,48 $\pm$ 0,09	2,04 $\pm$ 0,14	9,62 $\pm$ 0,87
<b>BHA</b>	0,23 $\pm$ 0,07	0,46 $\pm$ 0,00	0,78 $\pm$ 0,01	1,34 $\pm$ 0,08	2,36 $\pm$ 0,17	3,45 $\pm$ 0,02	3,76 $\pm$ 0,03	3,64 $\pm$ 0,19



**Figure 19 :**  $A_{0,5}$  obtenues dans le cadre de l'étude de Activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC) de différents extraits d'*Eriobotrya japonica*

La présente étude a montré que l'extrait EAEJ ( $A_{0,50}=4,93\pm 0,49$   $\mu\text{g/ml}$ ) possède une excellente activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne par rapport au standard BHA ( $A_{0,50}=3.64\pm 0.19$   $\mu\text{g/ml}$ ) et meilleure que celle du BHT ( $A_{0,50}=9.62\pm 0.87$   $\mu\text{g/ml}$ ), cet extrait est six fois plus actif que celui d'EDEJ ( $A_{0,50}=24,93\pm 10,53$   $\mu\text{g/ml}$ ), cette capacité est suivie par l'extrait EBEJ ( $A_{0,50}= 6,29\pm 0,73$   $\mu\text{g/ml}$ ) par rapport au standard BHA et BHT.

Cette étude nous a permis de confirmer la forte activité de la plante dans laquelle l'extrait acétate d'éthyle a donné une excellente réduction du complexe cuivre-néocuproïne par rapport au standard BHA.

Cette différence d'activité vis-à-vis le complexe cuivre-néocuproïne est due aux plusieurs critères des polyphénols, tels que ; le nombre et la position (positions 3', 4' et 5') de groupes d'hydroxyle aussi bien que le degré de conjugaison de la molécule entière (double liaison C2-C3), le groupe carbonyle en position 4 (oxo) et la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol), qui sont importants pour le transfert facile d'électrons (Apak et al., 2004).

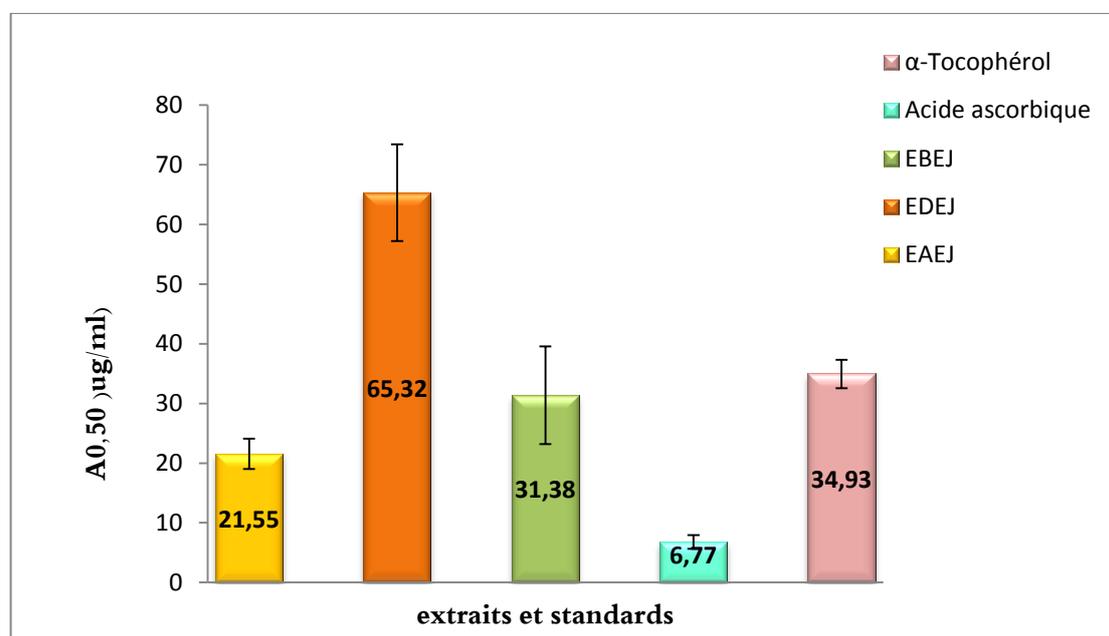
Selon Uysal et ses collaborateurs. (2016), l'absorbance de l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne de l'extrait de la plante d'*Eriobotrya japonica* L et entre ( $0,126 \pm 0,001$  et  $0,685 \pm 0,007$  mg/g).

#### IV.2.4 Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Les valeurs  $A_{0,50}$  ont été calculées puis comparées à celles des standards (acide ascorbique et  $\alpha$ -tocophérol).

**Tableau 6 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité du pouvoir réducteur : valeurs d'absorbance enregistrées et  $A_{0,5}$  calculées

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbance							$A_{0,5}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	3,125 $\mu\text{g}$	6,25 $\mu\text{g}$	12,5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$	200 $\mu\text{g}$	
<b>EAEJ</b>	0,10 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,15	0,96 $\pm$ 0,23	1,18 $\pm$ 0,07	21,55 $\pm$ 2,53
<b>EDEJ</b>	0,09 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,11	65,32 $\pm$ 8,09
<b>EBEJ</b>	0,11 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,07	0,73 $\pm$ 0,13	0,98 $\pm$ 0,17	0,92 $\pm$ 0,20	31,38 $\pm$ 8,20
<b>Acide ascorbique</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,03	0,84 $\pm$ 0,12	0,93 $\pm$ 0,30	1,18 $\pm$ 0,34	1,37 $\pm$ 0,20	1,44 $\pm$ 0,21	6,77 $\pm$ 1,15
<b><math>\alpha</math>-Tocophérol</b>	0,11 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,03	1,37 $\pm$ 0,08	1,81 $\pm$ 0,09	34,93 $\pm$ 2,38



**Figure 20 :**  $A_{0,5}$  obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité du pouvoir réducteur de différents extraits d'*Eriobotrya japonica*

A partir du tableau 6 et de la figure 20, on peut déduire que l'extrait EAEJ présente le meilleur pouvoir réducteur dont la valeur  $A_{0,50}$  calculée est de  $(21,55 \pm 2,53 \mu\text{g/ml})$  ; cette valeur signifie que l'extrait EAEJ a un pouvoir réducteur bien meilleur que celui de l' $\alpha$ -tocophérol, mais qui reste trois fois plus faible que celui de l'acide ascorbique.

L'extrait EBEJ présente un pouvoir réducteur ( $A_{0,50}=31,38 \pm 8,20 \mu\text{g/ml}$ ) proche de celui de l' $\alpha$ -tocophérol, tandis que, l'extrait EDEJ présente un pouvoir réducteur très faible ( $A_{0,50}=65,32 \pm 8,09 \mu\text{g/ml}$ ).

La présence des réducteurs dans les extraits de la plante a permis de réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) présent dans le ferricyanure de potassium en fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$ ).

Bien que, nos extraits soient riches en flavonoïdes, nous constatons qu'il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en flavonoïdes et le pouvoir réducteur ; le pouvoir réducteur est probablement dû à la présence des polyphénols contenant des groupements hydroxyles (donneur d'électron) (Siddhuraju et Becker, 2007) .

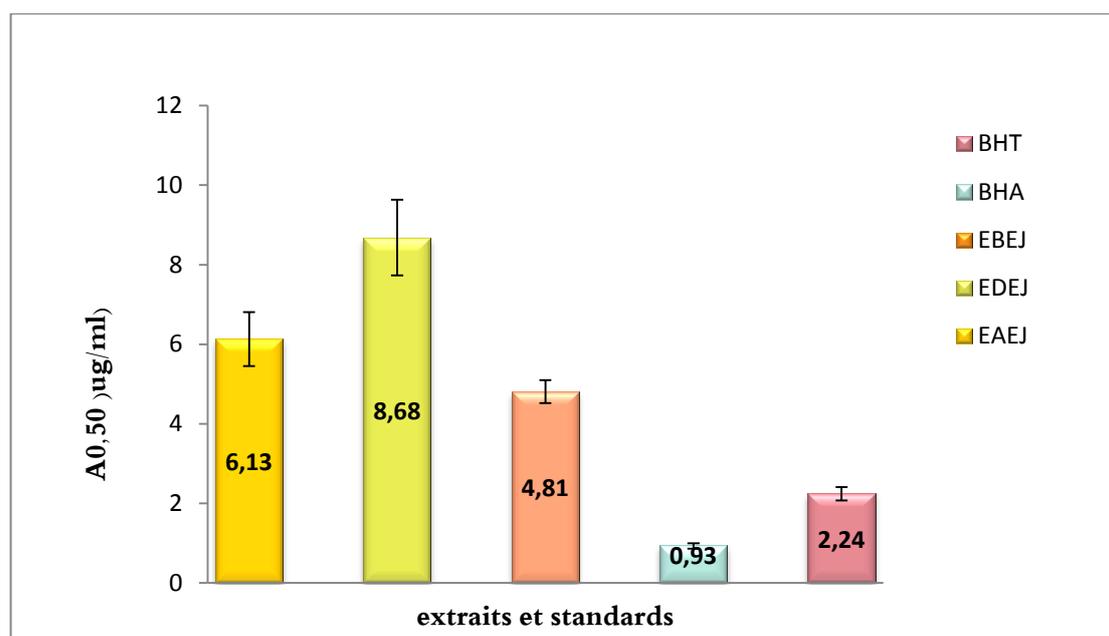
le travail effectué par Uysal *et al.*, (2016) sur l'extrait de la plante *Eriobotrya japonica*) récoltés en Méditerranée région de Turquie a donné la valeur de  $(158.90 \text{ ;mg/g d'extrait})$ , cette valeur est faible par rapport à nos résultats.

#### **IV.2.5 Activité de réduction par la formation du complexe $\text{Fe}^{+2}$ -phénantroline**

Suite à une réaction d'oxydoréduction, un complexe stable rouge-orangé de  $\text{Fe}^{+2}$  coordonné par trois ligands de phénanthroline est formé. Cette réduction est évaluée en mesurant les valeurs  $A_{0,50}$  des extraits de la plante et celles des standards BHA et BHT.

**Tableau 7 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>- phénantroline : valeurs d'absorbance enregistrées et A<sub>0,5</sub> calculées

Concentration (µg/ml)  Extraits et standards	Absorbance							A <sub>0,5</sub> (µg/ml)
	3,125 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	
<b>EAEJ</b>	0,39±0,02	0,51±0,01	0,76±0,13	1,22±0,12	2,54±0,37	3,63±0,36	3,84±0,35	6,13±0,68
<b>EDEJ</b>	0,39±0,04	0,44±0,03	0,58±0,02	0,79±0,04	1,24±0,09	1,66±0,14	3,19±0,43	8,68±0,95
<b>EBEJ</b>	0,44±0,01	0,55±0,03	0,82±0,02	1,24±0,06	2,01±0,07	3,48±0,19	4,07±0,04	4,81±0,29
	<b>0.78125</b>	<b>1.5625</b>	<b>3.125 µg</b>	<b>6.25 µg</b>	<b>12.5 µg</b>	<b>25 µg</b>	<b>50 µg</b>	<b>A<sub>0,5</sub> (µg/ml)</b>
<b>BHA</b>	0,49±0,01	0,59±0,01	0,73±0,02	0,93±0,01	1,25±0,04	2,10±0,05	4,89±0,06	0,93±0,07
<b>BHT</b>	0,47±0,01	0,47±0,01	0,53±0,03	1,23±0,02	1,84±0,01	3,48±0,03	4,84±0,01	2,24±0,17



**Figure 21:** A<sub>0,5</sub> obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>- phénantroline de différents extraits d'*Eriobotrya japonica*

Les résultats obtenus montrent que les trois extraits sont capables de réduire le fer et de former un complexe Fe<sup>+2</sup>-phénantroline. A partir du tableau 7 et de la figure 21, on peut déduire que l'extrait EBEJ présente le pouvoir réducteur le plus important (A<sub>0,50</sub>=4,81±0,29 µg/ml), suivie par l'extrait EAEJ (A<sub>0,50</sub>= 6,13±0,68µg/ml), tandis que, l'extrait EDEJ arrive en troisième position avec A<sub>0,50</sub>=8,68±0,95µg/ml.

Ces résultats montrent aussi que le pouvoir réducteur des ces extraits reste relativement faible par rapport à celui des standards BHT et BHA (A<sub>0,50</sub>=0,93±0,07 et 2,24±0,17 µg/ml respectivement).

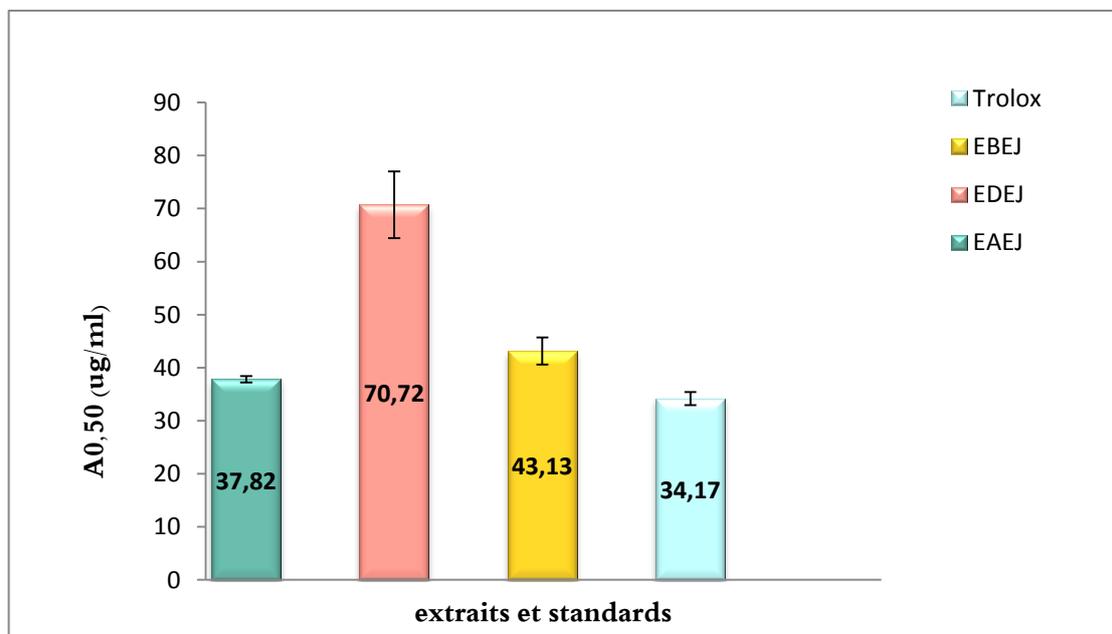
Cette différence de pouvoir réducteur est liée à la capacité réductrice des polyphénols qui dépend du degré d'hydroxylation et du degré de conjugaison des composés phénoliques. Spécifiquement pour les flavonoïdes, il a été reporté que la capacité d'élimination des radicaux libres augmente en cas de présence de : une structure 3',4'-dihydroxy dans le cycle B, une double liaison (C2-C3) en conjonction avec le groupe 4-oxo dans l'hétérocycle, des groupes 3- et 5-hydroxyle dans le cycle A avec une fonction 4-oxo dans les cycles A et C (Pulido et al., 2000).

## IV.2.6 Activité silver nanoparticule (SNP)

Les analyses des résultats ont permis de remonter les valeurs  $A_{0,50}$  des différents extraits. Le Trolox a été utilisé comme standard.

**Tableau 8 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité silver nanoparticules (SNP) : valeurs d'absorbance enregistrées et  $A_{0,5}$  calculées

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbance							$A_{0,5}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	0,781 $\mu\text{g}$	1,562 $\mu\text{g}$	3,125 $\mu\text{g}$	6,25 $\mu\text{g}$	12,5 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	
<b>EAEJ</b>	0,08 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,10	0,25 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01	37,82 $\pm$ 0,58
<b>EDEJ</b>	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,04	70,72 $\pm$ 6,30
<b>EBEJ</b>	0,08 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,03	0,57 $\pm$ 0,05	43,13 $\pm$ 2,56
	<b>1.5625<math>\mu\text{g}</math></b>	<b>3.125<math>\mu\text{g}</math></b>	<b>6.25<math>\mu\text{g}</math></b>	<b>12.5<math>\mu\text{g}</math></b>	<b>25<math>\mu\text{g}</math></b>	<b>50<math>\mu\text{g}</math></b>	<b>100<math>\mu\text{g}</math></b>	$A_{0,5}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>Trolox</b>	0.17 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.00	0.30 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.03	1.04 $\pm$ 0.01	34.17 $\pm$ 1,23



**Figure 22:**  $A_{0,50}$  obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité de silver nanoparticules (SNP) de différents extraits d'*Eriobotrya japonica*

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits sont capables de réduire l'Ag<sup>+</sup> en Ag<sup>0</sup>. A partir du tableau 8 et de la figure 22, on peut déduire que l'extrait EAEJ présente le pouvoir réducteur le plus élevé ( $A_{0,50}=37,82\pm 0,58\mu\text{g/ml}$ ), proche de celui du standard trolox ( $A_{0,50}=34,17\pm 1,23\mu\text{g/ml}$ ), suivie par l'extrait EBEJ dont la valeur  $A_{0,50}=43,13\pm 2,56\mu\text{g/ml}$ . Tandis que, l'extrait EDEJ présente le pouvoir réducteur le plus faible ( $70,72\pm 6,30\mu\text{g/ml}$ ), deux fois plus faible que celui du standard.

L'efficacité de cette réduction dépend du nombre et de la position des groupes phénoliques -OH, ainsi que du niveau de conjugaison global de la molécule polyphénolique. (O'zyu'rek et al., 2011).

### IV.3 Activité enzymatique

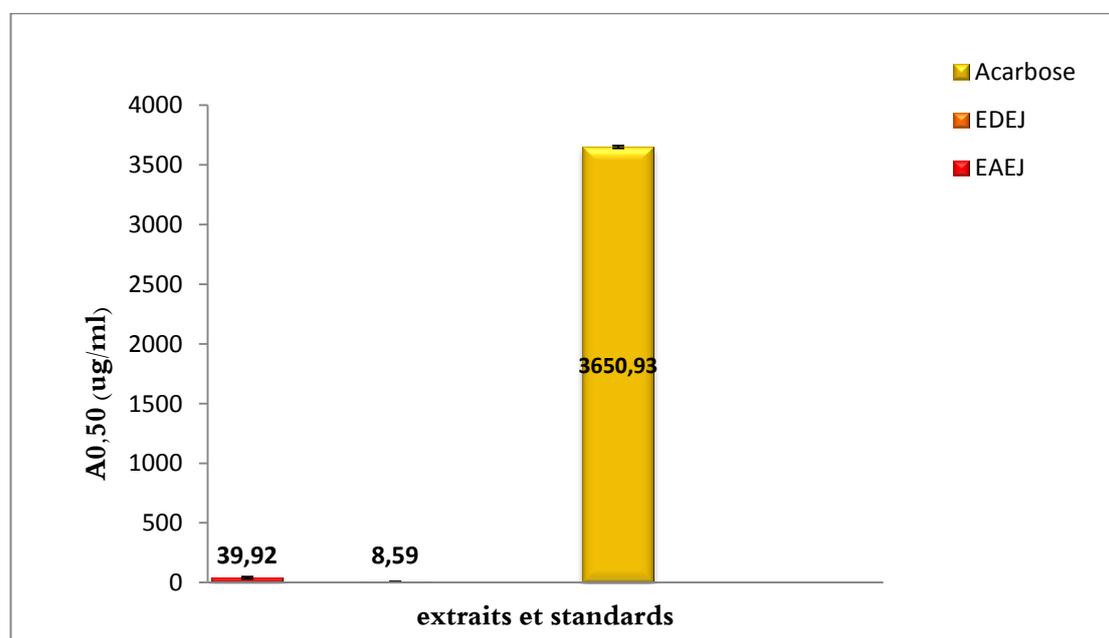
#### IV.3.1 Evaluation de l'activité antidiabétique

L'activité antidiabétique des différentes fractions d'extraits d'*Eriobotrya japonica* a été évaluée en mesurant leurs capacité à inhiber l'enzyme alpha-amylase.

Dans cette étude, l'activité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase des différents extraits d'*Eriobotrya japonica* a été évaluée en comparant les concentrations inhibitrices  $CI_{50}$  des différents extraits à celle du standard « l'acarbose ».

**Tableau 9 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase : pourcentage d'inhibition enregistrées et valeurs IC<sub>50</sub> calculées

Concentration (µg/ml)	% d'inhibition							
	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>EAEJ</b>	33,47±0,00	34,06±0,00	38,94±8,46	54,54±1,50	57,56±5,54	65,15±0,00	70,38±0,56	39,92±8,84
<b>EDEJ</b>	47,97±0,00	53,82±2,10	54,16±3,56	60,39±2,38	65,69±3,01	68,34±8,03	75,11±4,83	8,59±0,71
<b>EBEJ</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
	62,5 µg	125 µg	250 µg	500 µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>Acarbose</b>	7,76±0,17	8,08±0,30	9,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	3650,93±10,70



**Figure 23 :** CI<sub>50</sub> obtenues dans le cadre de l'étude de l'activité inhibitrice d'alpha-amylase de différents extraits d'*Eriobotrya japonica*

Comme illustré dans (le tableau 9 et la figure 23), l'activité inhibitrice d'alpha amylase est seulement enregistrée dans deux extraits (EDEJ et EAEJ).

L'activité de l'extrait EDEJ ( $CI_{50}=8,59\pm 0,71\mu\text{g/ml}$ ) est extrême plus élevée que celle de l'extrait EAEJ ( $CI_{50}=39,92\pm 8,84\mu\text{g/ml}$ ). Cette activité est largement supérieure à celle du standard (Acarbose :  $CI_{50}=3650,93\pm 10,70\mu\text{g/ml}$ ).

L'excellente capacité inhibitrice des extraits (EDEJ et EAEJ) est probablement due à leur richesse en composés phénoliques, notamment les flavonoïdes et les tanins. Ces derniers contiennent des molécules inhibitrices non spécifiques de diverses enzymes hydrolytiques, telles que ; les  $\alpha$ -amylases, les  $\alpha$ -glucosidases et les lipases. Cette inhibition est peut-être associée à leur capacité à se lier fortement aux protéines et aux glucides dont l'interaction entre les tanins et les protéines est le résultat de multiples liaisons hydrogènes. En conséquence de cette interaction, les sites catalytiques des enzymes sont bloqués et leur activité est donc inhibée (Yan et al., 2019).

L'étude réalisée par Fu et al., (2019) sur l'extrait pectic-polysaccharides des feuilles d'*Eriobotrya japonica* a présenté un effet inhibiteur *in vitro* de l' $\alpha$ -amylase avec  $CI_{50}$  entre (15a 88  $\mu\text{g/ml}$ ), l'activité est faible par rapport à nos résultats.

#### IV.3.2 Evaluation de l'activité anticholinestérase

L'activité anticholinestérase de différents extraits de feuilles d'*Eriobotrya japonica* a été évaluée en utilisant la méthode d'inhibition des deux enzymes butyrylcholinestérase et Acetylcholinestérase.

Il est à noter que l'activité anticholinestérase d'extraits d'*Eriobotrya japonica* n'a jamais été étudiée *in vitro*.

Les résultats obtenus sont présentés/résumés dans les tableaux 10 et 11. Ces résultats montrent qu'aucun des trois extraits n'a une activité inhibitrice de la AChE ni de la BChE.

**Tableau 10:** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase : valeurs d'absorbance enregistrées

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>EAEJ</b>	5,31	6,43	<b>EDEJ</b>	48,01	40,03	<b>EBEJ</b>	36,21	1,99
<b>EAEJ</b>	8,81	4,24	<b>EDEJ</b>	46,06	44,48	<b>EBEJ</b>	20,54	3,80
<b>EAEJ</b>	0,73	12,72	<b>EDEJ</b>	43,76	47,37	<b>EBEJ</b>	-48,02	21,11
<b>EAEJ</b>	5,04	6,69	<b>EDEJ</b>	4,18	12,33	<b>EBEJ</b>	1,05	7,26
<b>EAEJ</b>	0,23	11,27	<b>EDEJ</b>	-24,20	29,49	<b>EBEJ</b>	-4,62	22,78
<b>EAEJ</b>	-14,29	43,09	<b>EDEJ</b>	-36,86	36,07	<b>EBEJ</b>	17,20	70,04
<b>EAEJ</b>	-25,49	11,96	<b>EDEJ</b>	-28,74	20,58	<b>EBEJ</b>	-29,05	7,25
<b>Control</b>	-17,42	18,24	<b>Control</b>	-42,62	6,12	<b>Control</b>	-39,96	7,54

**Tableau 11 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase : valeurs d'absorbance enregistrées

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>EAEJ</b>	7,69	23,29	<b>EDEJ</b>	-19,26	4,32	<b>EBEJ</b>	27,93	13,65
<b>EAEJ</b>	8,24	4,72	<b>EDEJ</b>	-19,63	16,73	<b>EBEJ</b>	-19,45	8,18
<b>EAEJ</b>	-3,74	4,01	<b>EDEJ</b>	-2,47	22,39	<b>EBEJ</b>	-19,81	15,97
<b>EAEJ</b>	-17,63	5,36	<b>EDEJ</b>	-43,32	27,58	<b>EBEJ</b>	-35,06	56,69
<b>EAEJ</b>	-21,62	11,85	<b>EDEJ</b>	-40,96	11,71	<b>EBEJ</b>	-51,03	12,92
<b>EAEJ</b>	-16,00	20,48	<b>EDEJ</b>	-36,96	27,00	<b>EBEJ</b>	-65,19	16,22
<b>EAEJ</b>	-6,83	4,95	<b>EDEJ</b>	-42,23	34,53	<b>EBEJ</b>	-61,92	7,10
<b>Control</b>	9,05	16,56	<b>Control</b>	-60,20	1,50	<b>Control</b>	-48,85	14,47

#### IV.4 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (*in vitro*)

L'activité anti-inflammatoire de divers extraits de feuilles d'*Eriobotrya japonica* a été étudiée en utilisant la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines.

La dénaturation des protéines est décrite comme un processus pathologique qui implique la perte de configuration et, par conséquent, la perte de fonctionnalité. Cela rend la réduction de la dénaturation des protéines et par extension, le test de

dénaturation des protéines BSA, idéal pour la détermination du potentiel anti inflammatoire (sridevi et al., 2015).

Les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de BSA des différents extraits ont été calculés puis comparées à celle du standard « Voltarène ». Les résultats de l'effet protecteur des extraits d'*Eriobotrya japonica* contre la dénaturation protéique causée par la chaleur sont représentés ci dessous :

**Tableau 12 :** Récapitulatif des résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'activité d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine : pourcentage d'inhibition enregistrée

Concentration (µg/ml)  Extraits et standards	% d'inhibition				
	15,625 µg/ml	31,25 µg/ml	62,5 µg/ml	125 µg/ml	250µg/ml
<b>EAEJ</b>	45,47±1,60	52,49±3,00	61,46±0,80	69,96±3,29	-
<b>EDEJ</b>	-	11,97±6,17	17,68±0,00	26,23±5,35	58,66±6,17
<b>EBEJ</b>	-	33,77±5,95	37,77±8,44	55,63±8,29	58,87±6,55
<b>Voltarène</b>	-	34,11±0,50	51,37±0,91	76,87±1,24	99,23±0,41

Les extraits d'*Eriobotrya japonica* ont montré une capacité, dose-dépendante, à inhiber la dénaturation des protéines induite thermiquement.

Les résultats obtenus (Tableau 12) montrent que tous les extraits d'*Eriobotrya japonica*, ont une activité inhibitrice de la dénaturation de BSA.

D'après le tableau de pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA, l'extrait EAEJ présente une activité d'inhibition maximale avec un pourcentage de 69,96 % à 125 µg/ml proche de celui du standard Voltarène 76,87% dans la même concentration. Cette activité est suivie par l'extrait EDEJ et EBEJ avec une inhibition maximale de 58,87 %, 58,66 % respectivement.

La dénaturation des protéines est une cause d'inflammation bien documentée, ce mécanisme probablement implique une altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (**mizushima, 1968**).

L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA d'extraits de feuilles d'*Eriobotrya japonica* n'a jamais été démontrée auparavant.

une étude sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'acide tormentique des cellules en suspension d'*Eriobotrya Japonica* a révélé après un teste de Western blot que l'acide tormentique diminuait les expressions inductibles induites par l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et la cyclooxygénase-2 (COX-2) (**changa et al., 2011**).

Les extraits d'*Eriobotrya japonica* sont capables de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est probablement due à la présence de différents composés bioactifs tels que ; les flavonoïdes et les tannins dans les extraits (**Padmanabhan et Jangle, 2012**).

*Conclusion*  
*et*  
*Perspectives*

### Conclusion et perspectives

L'*Eriobotrya japonica* L est l'une des plantes médicinales qui contiennent une variété de métabolites secondaires, y compris les composés phénoliques qui sont caractérisés par des propriétés biologiques importantes, ce qui justifie leur utilisation dans plusieurs domaines.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'extraction des composés phénoliques des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L par macération, puis à l'évaluation *in-vitro* de quelques activités biologiques (antioxydantes, anticholinestérases, antidiabétique et anti-inflammatoires) des extraits obtenus.

La première partie de cette étude concerne l'extraction des composés phénoliques des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L, essentiellement des polyphénols totaux et les flavonoïdes.

- L'extrait EAEJ présente la teneur en polyphénols la plus élevée
- L'extrait EDEJ présente la teneur en flavonoïdes la plus élevée

La deuxième partie consiste à évaluer certaines activités biologiques des différents extraits d'*Eriobotrya japonica*, les résultats obtenus ont montré:

- Un potentiel antioxydant très intéressant ; la meilleure capacité antioxydante a été observée dans le cas de l'extrait EAEJ.
- Une activité antidiabétique remarquable ; l'extrait EDEJ présente la meilleure capacité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase.
- Une activité anti-inflammation " moyenne " ; les résultats ont montré que l'extrait EAEJ présente une activité anti inflammatoire considérable *in vitro*
- Une absence de l'activité anticholinestérase.

Ces activités biologiques sont probablement liées à la richesse de l'espèce en métabolites secondaires, notamment en flavonoïdes.

Ce travail pourrait se poursuivre dans plusieurs directions :

- S'investir dans d'autres parties de la plante, à savoir, les fruits, les fleurs et les graines.
- L'étude *in vivo* de l'effet de cette plante sur le stress oxydant en mesurant l'activité des enzymes antioxydantes (Catalase, Superoxyde dismutase ...).
- L'utilisation d'autres techniques d'extraction afin d'optimiser le rendement ainsi que la qualité des composés phénoliques.
- La quantification et la caractérisation des métabolites secondaires de cette plante.
- L'évaluation d'autres activités biologiques telles que les activités antimicrobiennes, anticancéreuse, antitumorale, analgésiques, anti-carcinogènes...
- La validation de nos résultats *in vitro* par des tests *in vivo*.

*Références*  
*Bibliographiques*

## Références bibliographiques

### « A »

**Adhikamsetty, R.K., Gollapalli, N.R., Jonnalagadda, S.B. (2008).** Complexation kinetics of Fe<sup>2+</sup> with 1, 10-phenanthroline forming ferrioin in acidic solutions. *International Journal of Chemical Kinetics*. 40, 515-523.

**Aggarwal, B.B., Vijayalekshmi, R.V., Sung, B. (2009).** Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 425-430.

**Akrouf, A., Chemli, R.C., Chrief, Hammami M. (2001).** Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. *Flavour and Fragrance*, 16, 337-339.

**Alshaker, H.A., Qinna, N.A., Qadan, F., Bustami, M., Matalka, K.Z. (2011).** Eriobotrya japonica hydrophilic extract modulates cytokines in normal tissues, in the tumor of Meth-A-fibrosarcoma bearing mice, and enhances their survival time. *BMC Complement. Altern. Med.* 11, 9.

**Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004).** Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 7970-7981.

**Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S., Bektaşoğlu, B., Berker, K., Özyurt, D. (2007).** Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* 12, 1496-1547.

### « B »

**Badenes, M.L., Janick, J., Lin, S., Zhang, Z., Wang, W., Liang, G.L. (2013).** Breeding loquat. In: Jules, Janick (Ed.), *Plant Breeding Reviews*, 37, pp. 259-296.

**Badenes, M.L., Martínez- Clavo, J., Yacer, G. (2000).** Analysis of a germplasm collection of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl. *Euphytica*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 187-194.

**Bagora, B. (2015).** Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Thèse de doctorat. universite blaise pascal.

**Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Taguchi, Y., Akazawa, H., Ukiya, M., Kimura, Y., Suzuki, T., Nishino, H. (2005).** Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Biol. Pharm. Bull* ;28:1995-1999.

**Blois, M.S. (1958).** Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958; 181:1199-1200.

**Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. (2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective; *Plant Science*, 161, 839-851.

**Braak, H., Braak, E. (1998).** Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.*, 53: 127-140.

### « C »

**Cai, Y.Z., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74:2157-2184.

**Campbell, C., and Malo, S. E. (1986).** IFAS Fact Sheets 5. The loquat. Univ.

**Chen, J., Li, W.L., Wu, J.L., Ren, B.R., Zhang, H.Q. (2008).** Euscaphic acid, a new hypoglycemic natural product from *Folium Eriobotryae*. *Pharmazie* 63, 765-767. [[Links](#)].

**Cao, Y. W., Jin, R. C., Mirkin, C. A. Science (2002).** 297, 1536- 1540.

**Cha, D.S., Eun, J.S., Jeon, H. (2011).** Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica*. *J Ethnopharmacol.* 134(2):305-12.

**Changa, Chwen-Tzuei ., Huang, b Shyh-Shyun ., Lin, b Shiang-Shiou ., Amagaya, c Sakae ., Ho, d Hui-ya ., Hou, e Wen-Chi ., Shie, b Pei-Hsin ., Wu, f Jin-Bin ., Huang, b Guan-Jhong . (2011).** Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya Japonica* ex vivo and in vivo ; *Food Chemistry* , 127 ,1131-1137.

**Chen, J., Li, W. (2008).** Progress in studies on phytochemistry and biological

activity of Folium Eriobotryae. *Global science books*, 2(3): 18-23.

**Chen, J., Li, W.L., Wu, J.L et al. (2008).** Hypoglycemic effects of a sesquiterpene glycoside isolated from leaves of loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Phytomedicine*. 15(1-2):98-102.

**Choi, Y.G., Seok, Y.H., Yeo, S., Jeong, M.Y., Lim, S. (2011).** Protective changes of inflammation-related gene expression by the leaves of *Eriobotrya japonica* in the LPS-stimulated human gingival fibroblast: Microarray analysis. *J. Ethnopharmacol*;135:636-645.

**Condit, I. J. (1915).** The loquat. California Agr. Expt. Sta. Bul. 250.

**Contrerasguzman, E., Strong, F. (1982).** Determination of tocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 65, 1215- 1226.

**Crismon, M.L. (1998).** Pharmacokinetics and Drug interaction of cholinesterase Inhibitors Administered in Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* , 18(2): 47.

### « D »

**Dai, J., Mumper, R.J. (2010).** Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 15, 7313-7352.

**Demir, S. (1983).** Promising loquat cultivars for the Antalya region. *Bahco* 12:5-16.

**Demir, S. (1987).** Loquat Growing. Tarim Orman ve Kyisleri Bakanligi Narenciye Arastirma Enstitu' su' Mu' du' rlu' gu' 12, 30.

**De, Tommasi .N., Simone ,F . (1991).** Hypoglycemic effects of sesquiterpene glycosides and polyhydroxylated triterpenoids of *Eriobotrya japonica*. *Planta Med*. 57(5):414-6.

**Dhingra, A.K., Chopra, B., Bonthagarala, B. (2018).** Natural Anti-Inflammatory Agents: Recent Progress and Future Perspectives. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics* ;3 (5);1158.

**Dolci, G., Ripari, M., Pacifici, L., Umile, A. (1993).** Analgesic efficacy and the tolerance for Piroxicam-beta- Cyclodextrin compared to Piroxicam, paracetamol and placebo in the treatment of post extraction dental pain. *Minerva Stomatol*; 42: 235-4141.

**Dugan, L.R. (1979).** Natural antioxidants in "Autoxidation in Food and Biological Systems" Eds. MG Simic and M. Karel. Plenum Press, New York: 261-282.

### « E »

**Eddouks, M., Ouahidi, M.L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., Lemhadri, A. (2007).** L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie* 5: 194-203.

**El Amrani, F., Rhallab, A., Alaoui, T., El Badaoui, K., Chakir, S. (2010).** Étude ethnopharmacologique de quelques plantes utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Meknès-Tafilalet (Maroc) ; *Phytothérapie*, 8: 161-165.

**Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.

### « F »

**Feghali, C.A., Wright, T.M. (1997).** Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2(1):d12-d26.

**Ferreres, F., Gomes, D., Valentao, P., Goncalves, R., Pio, R., Chagas, E.A., Seabra, R.M., Andrade, P.B. (2009).** Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chem* 114:1019-1027.

**Flora of China Editorial Committee. (2016).** *Flora of China*. In: *Flora of China* St. Louis, Missouri and Cambridge, Massachusetts, USA: Missouri Botanical Garden and Harvard University Herbaria.[http://www.efloras.org/flora\\_page.aspx?flora\\_id=2](http://www.efloras.org/flora_page.aspx?flora_id=2).

**Forough, M., Farhadi, K., Turkish, J. (2010).** *Eng. Environ. Sci.* 34, 281-287.

**Fratini, A., Pellegrini, N., Nicastro, D. (2005).** de Sanctis, O. *Mater. Chem. Phys* 94, 148-152.

**Frijehlich, O., Schreier, P. (1990).** Volatile constituents of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit *J. Food Sci.*, 55(1), 176-180.

**Fujisaki, M. (1994).** Loquat. p. 56-59. In: Organizing Committee, 24 Int. Hart. Congr. Publ. Committee (eds.), Horticulture in Japan. Chuo Printing Co., Japan.

**Fu ,X.M., Kong ,W.B., Peng G., Zhou, J.Y., Azam, M., Xu, C.J., Grierson, D., Chen, K.S. (2012).** Plastid structure and carotenogenic gene expression in red- and white-fleshed loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits. *J. Exp. Bot*; 63:341–354.

**Fu, Y., Yuan, Q., Lin, S., Liu, W., Du, G., Zhao, L., Zhang, Q., Lin, D.R., Liu, Y.T., Qin, W., Li, D.Q., Wu, D.T. (2019).** Physicochemical characteristics and biological activities of polysaccharides from the leaves of different loquat (*Eriobotrya japonica*) cultivars, *Int. J. Biol. Macromol.* 135 274–281.

### « G »

**Garcia-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C et Pivas-Gonzalo, J.C. (2004).** Evaluation of antioxidant properties of fruits. *Food chem*, 84:13-18.

**Giacobini, E., Neurochem. (2003).** Res. 28 515-522.

**Glatz, Z. (2006).** Determination of enzymatic activity by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B.* 841, 23-37.

### « H »

**Haioun, A., Zohra, H.F. (2015).** Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale Algérienne *Anethium graveolens* et leur effet cardioprotectrice contre la toxicité de la 152 Anethume *Graveolens*. Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine, Algérie. 29–36 p.

**Hajjaj, G. (2017).** Screening phytochimique, étude toxicologique et valorisation pharmacologique de *matricaria chamomilla* l. et de *l'ormenis mixta* l. (*asteraceae*). Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Maroc. 216 p.

**Haliwell, B ., Gutteridge, J.M.C. (1989).**eds. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford, 543 p.

**Herrmann, K. (1976).** Flavonoids and flavones in food plants: a review. *J Food Technol* 11:433–448.

**Herrmann, K. (1993).** In pflanzlichen lebensmitteln vorkommende flavonoide als antioxidantien. *Gordian* 93:108–111 .

**Hong, Y., Lin, S., Jiang, Y and Ashraf, M. (2008).** Variation in Contents of Total Phenolics and Flavonoids and Antioxidant Activities in the Leaves of 11 *Eriobotrya* Species. *Plant Foods Hum Nutr*, 63: 200–204.

**Huang, Y., Li, J., Cao, Q., Yu, S.C., Lv, X.W., Jin, Y., Zhang, L., Zou, Y.H., Ge, J.F. (2006).** Anti-oxidative effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf in chronic bronchitis rats. *Life Sci*. 78, 2749-2757.

**Huang, Y., Li, J., Meng, X.M., Jiang, G.L., Li, H., Cao, Q., Yu, S.C., Lv, X.W., Cheng, W.M. (2009).** Effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf and MAPK signal transduction pathway on inducible nitric oxide synthase expression in alveolar macrophage of chronic bronchitis rats. *Am. J. Chin. Med.* 37, 1099-1111.

**Hu, J.P., Calomme, M., Lasure, A., De, Bruyne. T., Peters, L., Vlietinck, A., Van den Berghe D.A. (1995).** Structure–activity relationship of flavonoids with superoxide scavenging activity. *Biol Trace Element Res* 47:327–331.

**Husain, S.R., Cillard, J., Cillard, P. (1987)** .Hydroxyl radical-scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26:2489–2491.

**Huxley, A. (ed.). (1992).** The new Royal Horticultural Society dictionary of gardening. Macmillan, London. p. 196.

### « I »

**Ibarz, A., Garvin, A., Costa, J. (1995).** Flow behaviour of concentrated loquat juice *Ahmentaria.*, 268, 65-68.

**Ichinose, I. (1995).** The origin and development of loquat (in Japanese). Series of Agr. Tech. 4 (Suppl.):1-5.

### « J »

**Janick, J. (2007).** Genetic alteration associated with fruit domestication. Proceedings of the Second International Symposium on Loquat. *Acta Hort.* 750, 27–35.

**Janick, J., Paull, R. E. ( 2008).** The encyclopedia of fruit & nuts, CABI.xviii + 954 pp.

**Jayaprakasha, G.K., Girenavar, B and Patil, B.S. (2008).** Antioxidant capacity of pummel and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. *LWT*, 41:376-384.

**Jian, T., Ao, X., Wu, Y., Lv, H., Ma, L., Zhao, L., Tong, B., Ren, B., Chen, J., Li, W. (2017).** Total sesquiterpene glycosides from Loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf alleviate

high-fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease through cytochrome P450 2E1 inhibition. *Biomed. Pharmacother.* 91, 229-237.

**Jian, T., Wu, Y., Ding, X., Lv, H., Ma, L., Zuo, Y., Ren, B., Zhao, L., Tong, B., Chen, J., Li, W. (2018).** A novel sesquiterpene glycoside from Loquat leaf alleviates oleic acid-induced steatosis and oxidative stress in HepG2 cells. *Biomed. Pharmacother.* 97, 1125-1130.

**Jonathan, H., Crane, H., Lilia, C.M. (2006).** Loquat Growing in the Florida Home Landscape.

« **K** »

**Kalkman, C. (2004).** Rosaceae. In: Flowering plants, Dicotyledons: Celastrales, Oxalidales, Rosales, Cornales, Ericales. Volume 6. Springer-Verlag New York, pp. 343-386.

**Kandikattu, K., Bharath Rathna Kumar, P., Venu Priya, R., Sunil Kumar, K., Ranjith Singh.B.Rathore. (2013).** EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF CANTHIUM PARVIFLORUM BY IN-VITRO METHOD. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*; 1(5): 729-730.

**Kang, S.C., Lee, C.M., Choi, H., Lee, J.H., Oh, J.S., Kwak, J.H., Zee, O.P. (2006).** Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. *Phytother Res.* 20(11):1017-9.

**Kapoor, S., Lawless, D., Kennepohl, P., Meisel, D., Serpone, Langmuir, N. (1994).** 10, 3018-3022.

**Kar, A. (2007).** Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie. Ed 2: New Age International Publishers, p. 1-30.

**Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan, K.S., Apak, R. (2009).** Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. *Food Chem* 120:1201-1209.

**Khadhri, A., Mokni, E.R and Smiti, S. (2013).** Composes phenoliques et activites antioxydantes de deux extraits de chardon à glu : *Atractylis gummifera*. *Sci Nat.* 39:44-52.

**Khaydarov, R. R., Khaydarov, R. A., Estrin, Y., Evgrafova, S., Scheper, T., Endres, C., Cho, S. Y. (2009).** In *Nanomaterials: Risks and Benefits*; Linkov, I., Steevens, J., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands; pp 287–297.

**Kikuchi, T., Akazawa, H., Tabata, K., Manosroi, A. (2011).** 3-O-(E)-p-coumaroyl tormentic acid from *Eriobotrya japonica* leaves induces caspase-dependent apoptotic cell death in human leukemia cell line. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 59(3):378-81.

**Kim, J., Harikrishnan, R., Kim, M., Jang, I., Kim, D., Hong, S., Balasundaram, C and Heo, M. (2011).** Enhancement of *Eriobotrya japonica* extracts on non-specific immune response and disease resistance in kelp grouper *Epinephelus bruneus* against *Vibrio carchariae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31 : 1193-1200.

**Kim, J.Y., Hong, J.H., Jung ,H.K., Jeong, Y.S., Cho, K.H.( 2012).** Grape skin and loquat leaf extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-diabetic activity in vitro and in vivo in hypercholesterolemic zebrafish. *Int. J. Mol. Med*;30:606–614.

**Kim, M., You, M., Rhyu, D., Jeong, K., Kim, Y., Baek, H., Kim, H. (2011).** Oral administration of loquat suppresses DMBA-induced breast cancer in rats. *Food Sci. Biotechnol*, 20, 491–497.

**Kim, S.H., Kwon, Y.E., Park, W.H., Jeon, H., Shin, T.Y. (2009).** Effect of leaves of *Eriobotrya japonica* on anaphylactic allergic reaction and production of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 31, 314–319.

**Komiya, T., Achiwa, Y., Katsuzaki, H., Imai, K., Sakurai, S., Urakawa, K., Ohnishi, K., Adachi, T., Yamada, T., Hibasami, H. (1998).** Effect of oleanolic and ursolic acids isolated from Loquat (*Eriobotrya*) on the growth of human lymphoid leukemia cells. *Food Sci. Technol. Int*, 4, 282–284.

### « L »

**Ladoh, Y., Dibong, S., Nyegue, M., Djembissi, T., Lenta, N., Mpondo, M., Yinyang, J., and Wansi, J. (2015).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*.84, 7636.

**Lee, C.H., Wu, S.L., Chen, J.C., Li, C.C. (2008).** *Eriobotrya japonica* leaf and its triterpenes inhibited lipopolysaccharide-induced cytokines and inducible enzyme

production via the nuclear factor-kappaB signaling pathway in lung epithelial cells. *Am J Chin Med.* 36(6):1185-98.

**Leelaprakash, G. (2011).** Dass SM. *In vitro* anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *J Drug Dev Res*;3:189-96.

**Liang, H., Wang, Y., Wang, Q., Ruan, M.S., Chromatogr, J., Biomed, B.(2013).** *Sci. Appl.* 724 381–388.

**Li, F., Li, Y., Li, Q., Shi, X and Guo, Y. (2017).** Acute and Subacute Oral Toxicity Evaluation of *Eriobotrya japonica* Leaf Triterpene Acids in ICR Mice. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, 9.

**Lin, J.Y., Tang, C.Y. (2008).** Strawberry, loquat, mulberry, and bitter melon juices exhibit prophylactic effects on LPS-induced inflammation using murine peritoneal macrophages. *Food Chem*; 107:1587–1596.

**Lin, S., Huang, X., Cuevas, J., Janick, J. (2007).** Loquat: an ancient fruit crop with a promising future. *Chronica Hort.* 47 (2), 12–15.

**Lin, S.Q., Sharpe, R.H., Janick, J. (1999).** Loquat: botany and horticulture. *Horticultural Reviews* 23, 233–276.

**Lin, S. (2007).** World loquat production and research with special reference to China. Proceedings of the Second International Symposium on Loquat. *Acta Hort.* 750, 37–43.

**Lin, S., Zhang, G., Liao, Y., Pan, J., and Gong, D. (2015).** Dietary Flavonoids as Xanthine Oxidase Inhibitors: Structure–Affinity and Structure–Activity Relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 63, 7784–7794.

**Lin, W.-W., Karin, M. (2007).** A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 117, 1175–1183.

**Li, S.Z. (1578).** *Compendium of Materia Medica*. People's Medical Publishing House; Beijing, China.

**Liu, Y., Zhang, W., Xu, C and Li, X. (2016).** Biological Activities of Extracts from Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.): A Review. *Int. J. Mol. Sci*, 17 (1983): 15.

**Li, W.L., Wu, J.L., Ren, B.R., Chen, J., Lu, C.G. (2007).** Pharmacological studies on anti-hyperglycemic effect of *Folium Eriobotryae*. *Am. J. Chin. Med.* 35, 705–711.

**Lorence, D. H., Flynn, T. W., Wagner, W. L. (1995)** . Contributions to the flora of Hawai'i. III. New additions, range extensions, and rediscoveries of flowering plants. Bishop Museum Occasional Papers, (No. 41), 19-58.

**Lü, H., Chen, J., Li, W.L., Ren, B.R., Wu, J.L., Zhang, H.Q. (2009)**. Hypoglycemic effect of the total flavonoid fraction from *Folium Eriobotryae*. *Phytomedicine* 16, 967-971.

### « M »

**Macheix, J.J., Fleurit, A., Billot, J. (1990)**. Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton.

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

**Maher, K., Yassine, B.A., Sofiane, B. (2015)**. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Eriobotrya japonica* leaves extracts. *Afr Health Sci.* 15(2):613-20.

**Matalka, K.Z., Abdulridha, N.A., Badr, M.M., Mansoor, K., Qinna, N.A., Qadan, F. (2016)**. *Eriobotrya japonica* Water Extract Characterization: An Inducer of Interferon-Gamma Production Mainly by the JAK-STAT Pathway. *Molecules* , 21, 722.

**Mebirouk, R. (2017)**. Recherche et évaluation des activités biologiques de trois extraits d'*Helix aspersa* (aqueux, hydro alcoolique et organique) : Activités anti-inflammatoire, anti tumorale et antiangiogénique. Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri Constantine, Algérie. 172 p.

**Miller, N.J., Diplock, A.T., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993)**. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science.*84:407-412.

**Mizushima, Y. (1966)**. Screening test for antirheumatic drugs. *Lancet.*288:443.

**Mizushima, Y., and Kobayashi, M. (1968)**. Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with same biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 20 (1)169-173.

**Molyneux, P. (2004)**. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology.* 26, 211-219.

**Morton, J. F. (ed.). (1987).** Loquat. p. 103-108. In: Fruits of warm climates. Creative Resource Systems, Winterville, FL.

**Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., Böhm, V. (2010).** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 992–999.

**Muramoto, K., Quan, R.D., Namba, T., Kyotani, S., Miyamura, M., Nishioka, Y., Tonosaki, K., Doi, Y.L., Kaba, H. (2011).** Ameliorative effects of *Eriobotrya japonica* seed extract on cellular aging in cultured rat fibroblasts. *Journal of Natural Medicines* 65, 254–261.

### « N »

**Nishioka, Y., Yoshioka, S., Kusunose, M., Cui, T., Hamada, A., Ono, M., Miyamura, M., Kyotani, S. (2002).** Effects of extract derived from *Eriobotrya japonica* on liver function improvement in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25, 1053–1057.

**Noack, Melissa. (2016).** IL-17/Th17 au cours de l'inflammation chronique : ciblage des interactions cellulaires. these de doctorat . l'universite de lyon.

### « O »

**Orliaguet, G., Gall, O., Benabess-Lambert, F. (2013).** Nouveautés concernant les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*. 17(5):228 – 237.

**Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Simons, A. (2009).** Agroforestry Database: a tree reference and selection guide. Version 4. In: Agroforestry Database: a tree reference and selection guide. Version 4 . Nairobi, Kenya: World Agroforestry Centre.<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>.

**Opie, E.L. (1962).** On the relation of necrosis and inflammation to denaturation of proteins. *J Exp Med*.115:597-608.

**Ouédraogo, N., Lompo, M., Sawadogo, R.W., Tibiri, A., Hay, A.E., Koudou, J., Dijoux, M.G., Guissou, I.P. (2012).** Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*,10:286–292.

**Ouyang, X., Li, X., Lu, W., Zhao, X., and Chen, D. (2018).** A Null B-Ring Improves the Antioxidant Levels of Flavonol: A Comparative Study between Galangin and 3,5,7-Trihydroxychromone. *Molecules*. 23, 3083.

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

**Özyürek, M., Güçlü, K., and Apak, R. (2012).** The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends in Analytical Chemistry*. 30, 652-664.

**Özyürek, Mustafa ., Güngör, Nilay., Baki, Sefa ., Güçlü, Kubilay., and Apak, Resat . (2012).** Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols, *Analytical Chemistry*.

### « P »

**Padmanabhan, P., and Jangle, S. N. (2012).** evaluation of *in-vitro* anti-inflammatory activity of herbal preparation, a combination of four medicinal plants. *Journal of Basic and Applied Medical Sciences ISSN*. 2277-2103.

**Pareek, S., Benkeblia, N., Janick, J., Cao, S and Yahia, E.M. (2014).** Postharvest physiology and technology of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit. *JSCI Food Agric*, 94:1495-1504.

**Parimisetty, Avinash. (2015).** Propriétés anti-inflammatoires de facteurs produits par le tissu adipeux - Applications potentielles dans la neurodégénérescence. Thèse de doctorat. Université de La Réunion.

**Philibert, Dabry de Thiersant. (1874).** La matière médicale chez les Chinois, G. Masson, 1er janvier.

**PIER. (2016).** Pacific Islands Ecosystems at Risk. In: Pacific Islands Ecosystems at Risk Honolulu, Hawaii, USA: HEAR, University of Hawaii.

**Pisoschi, A.M., Negulescu, G.P. (2011).** Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 01, 1-10.

**Polat, A.A., Caliskan, O. (2007).** Loquat production in Turkey. Proceedings of the Second International Symposium on Loquat. *Acta Horti*. 750, 49-53.

**popenoe, W. (1920).** Manual of tropical and subtropical fruits. Macmillan, New York.

**Prior, R.L., Wu, X., 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.

**Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000).** Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/ Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 3396-3402.

### « R »

**Ramanathan, L., Das, N.P. (1993).** Effect of natural copper chelating components on the pro-oxidant activity of ascorbic acid in steam-cooked ground fish. *Int J Food Sci Technol* 28:279-288.

**Rana, N., walia, A., Gaur, A., Natl, A. (2013).** *Acad. Sci. Lett.* 36: 9-17.

**Re, R., Pelligrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolouration assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1231-1237.

**Ribéreau-Gayon, P. (1968).** Notions générales sur les composés phénoliques. In « Les composés phénoliques des végétaux ».Ed *Dunod*, p :1-27.

**Rice-Evans, CA., Miller, N.J. (1996).** Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc T* 24:790-795.

**Robak, J., Gryglewski, R.J. (1988).** Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 37:837-841.

**Roginsky, V., Lissi, E.A. (2005).** Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92, 235-254.

**Rojas, Luis Lartundo. (2009).** Influence de l'adsorption de protéine (BSA) sur le comportement électrochimique et la composition de surface d'un alliage Fe-17Cr en solution aqueuse. THESE DE DOCTORAT . L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI).

### « S »

**Sakuramata, Y., Oe, H., Kusano, S., Aki, O. (2004).** Effects of combination of Caiapo with other plant-derived substance on anti-diabetic efficacy in KK-Ay mice. *Biofactors*. 22, 149–152.

**Sandberg, F., Corrigan, D. (2001).** *Natural Remedies. Their Origins and Uses.* Abingdon: Taylor & Francis.

**Schetter, A.J., Heegaard, N.H.H., Harris, C.C. (2010).** Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 31, 37–49.

**Sethi., Brahmli, Kaur. (2006).** "Synthesis and Analysis of an  $\alpha$ -Amylase Inhibitor and an Antimicrobial Peptide". *Senior Honors Theses & Projects*. 32.

**Shaw, P. E. (1980).** Loquat. p. 479-491. In: S. Nagy and P. E. Shaw (eds.), *Tropical and subtropical fruits*. A vi, Westport, CT.

**Shih, C.C., Ciou, J.L., Lin, C.H., Wu, J.B., Ho, H.Y. (2013).** Cell suspension culture of *Eriobotrya japonica* regulates the diabetic and hyperlipidemic signs of high-fat-fed mice. *Molecules*. 18, 2726–2753.

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

**Sies, H. (1991).** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 91, 31S-38S.

**Simic, M.G., Karel, M. (1979).** Porter WL. Recent trends in food applications of antioxidants, in "Autoxidation in Food and Biological Systems" eds. M.G. Simic and M. Karel Plenum Press, New York : 295-365.

**Singh, S., Singh, R., Kushwa, A.S., Gupta, G. (2014).** Neuroprotective role of antioxidant and pyranocarboxylic acid derivative against AlCl<sub>3</sub> induced Alzheimer's disease in rats. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2 (7): 571-578.

**Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152–178.

**Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–158.

- Song, F.L., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L., Li, H.B. (2010).** Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *Int. J. Mol. Sci.*11:2362–2372.
- Sridevi, G., Sembulingam, K., Muhammed, I., Srividya, S., Prema, S. (2015).** Evaluation of in- vitro anti-inflammatory activity of *Pergularia daemia*. *World J. Pharm. Res.*, 4(6), 1100-1108.
- Stevens, P. F. (2019).** Angiosperm Phylogeny Website. Version 14. In: Angiosperm Phylogeny Website. Version 14 . St. Louis, Missouri, USA: Missouri Botanical Garden.<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Sun, G., Liu, Y., Zhu, J., Iguchi, M., Yoshioka, S., Miyamura, M., Kyotani, S. (2010).** Immunomodulatory effect of *Eriobotrya japonica* seed extract on allergic dermatitis rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*56:145–149.
- Szydłowskaczerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., and Szlyk, E. (2008).** Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta.* 76, 899-905.

### « T »

- Takahama, U. (1984).** Hydrogen peroxide dependent oxidation of quercetin by intact spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 74:852–857.
- Takahama, U. (1985).** Inhibition of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation by quercetin: mechanism of antioxidative function. *Phytochemistry* 24:1443–1446.
- Takuma, D., Guangchen, S., Yokota, J., Hamada, A., Onogawa, M., Yoshioka, S., Kusunose, M., Miyamura, M., Kyotani, S., Nishioka, Y. (2008).** Effect of *Eriobotrya japonica* seed extract on 5-fluorouracil-induced mucositis in hamsters. *Biol. Pharm. Bull.* 2008;31:250–254.
- Taviano, MF., Marino, A., Trovato, A., Bellinghieri, V., Melchini, A., Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Mondello, L., Guvenc, A., De-Pasquale, R., Miceli, N. (2013).** *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. "berries" from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 22-29.
- Tonelli, N., Gallouin, F. (2013).** Des fruits et des graines comestibles du monde entier. *lavaisier SAS* : 728.

**Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., and Ulubelen, A. (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103, 816-822.

### « U »

**Uysal, S., Zengin, G., Aktumsek, A and Karatas, S. (2016).** Chemical and biological approaches on nine fruit tree leaves collected from the Mediterranean of Turkey. *Journal of functional foods*, 22: 518-532.

### « V »

**Vilanova, S., Badenes, M.L., Martínez-Calvo, J., Llácer, G. (2001).** Analysis of loquat germplasm (*Eriobotrya japonica Lindl*) by RAPD molecular markers. *Euphytica* 121, 25-29.

**Vinson, J., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J. (2005).** Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J Am Coll Nutr* 24:44-50.

**Voss, C., Sepulveda-Boza, S., Zilliken, F.W. (1992).** New isoflavonoids as inhibitors of porcine 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 44:157-162.

### « W »

**Wandhammer, Marielle. (2012).** Etude structurale de l'inhibition des cholinestérases par les neurotoxiques organophosphorés : stratégie de réactivation. Thèse de doctorat. Université de strasbourg .

**Webb, C. J., Sykes, W. R., Garnock-Jones, P. J. (1988).** Flora of New Zealand, Volume IV: Naturalised pteridophytes, gymnosperms, dicotyledons, Christchurch, New Zealand: Botany Division, DSIR. 1365pp.

**Weeds of Australia. (2016).** Special edition of Environmental Weeds of Australia for Biosecurity Queensland. The University of Queensland and Department of Primary Industries and Fisheries.

**Weeds of New Zealand. (2016).** Information Sheet for loquat *Eriobotrya japonica*. New Zealand: Weedbusters.

**White, P.J., Xing, Y. (1997).** Antioxidants from cereals and legumes. In: Shahidi F (ed) Natural antioxidants, chemistry, health effects, applications. AOCS Press, Champaign, pp 25–63.

**wilfried guy sostène sika. (2020).** la prescription des anti-inflammatoires par voie generale en endodontie : etude retrospective des dossiers de patients reçus au service d'odontologie conservatrice et endodontie du centre de consultation et de traitements odonto-stomatologiques (cctos) du chu de cocody. These. université félix houphouët boigny.

### « X »

**Xu, H., Chen, J. (2011).** Commercial quality, major bioactive compound content and antioxidant capacity of 12 cultivars of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits. J. Sci. Food Agric. 91:1057–1063.

### « Y »

**Yang, X.W., Huang, M.Z., Jin, Y.S., Sun, L.N., Song, Y., Chen, H.S. (2012).** Phenolics from *Bidens bipinnata* and their amylase inhibitory properties. Fitoterapia. 83, 1169-1175.

**Yan, J.K., Wu, L.X., Qiao, Z.R., Cai, W.D., Ma, H. (2019).** Effect of different drying methods on the product quality and bioactive polysaccharides of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) slices, Food Chem. 271, 588–596.

**Yokota, J., Takuma, D., Hamada, A., Onogawa, M., Yoshioka, S., Kusunose, M., Miyamura, M., Kyotani, S., Nishioka, Y. (2008).** Gastroprotective activity of *Eriobotrya japonica* seed extract on experimentally induced gastric lesions in rats. Journal of Natural Medicines 62, 96–100.

**Yu, D. J. (ed.). (1979).** The taxonomy of Chinese fruit trees (in Chinese). Agri. Press, Beijing. p. 309-316.

### « Z »

**Zara, Phyu Phyu Khine ., Morishitab, Akiko ., Hashimotoa, Fumio, b ., Sakaob, Kozue ., Fujiic, Makoto ., Wadaa., Koji, d., Hou, De-Xing . (2014).** Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of loquat (*Eriobotrya japonica*) tea , journal of functional Food ,6,523-533.

**Zar, P.P., Yano, S., Sakao, K., Hashimoto, F. (2014).** In vitro anticancer activity of loquat tea by inducing apoptosis in human leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 78(10):1731-7.

**Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., and Ceylan, O. (2014).** A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* 53, 244–251.

**Zhang, W.N., Zhao, X.Y., Sun, C.D., Li, X., Chen, K.S. (2015).** Phenolic composition from different loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars grown in China and their antioxidant properties. *Molecules.* 20:542–555. doi: 10.3390/molecules20010542.

**Zhang, H. Z. (1987).** History of loquat cultivation (in Chinese). *World Agr.* 1987(6):54-56. Zhang, H. Z., S. A. Peng, L. H. Cai, and D. Q. Fang. 1990. The germ plasm resources of the genus *Eriobotrya* and their special reference on the origin of *E. japonica* Lindl. *Acta Hort. Sinica* 17:5-12.

**Zhao, L., Chen, J., Lü, H., Ao, X., Ren, B., Li, W. (2015).** A new sesquiterpene glycoside from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *Nat. Prod. Commun.* 51, 1103-1106.

# *Annexes*

## Annexes

### Annexe I : matériels et instruments utilisés

#### 1. Matériel du laboratoire

Ampoule à décanter, tubes eppendorf, micropipettes de volumes différents, microplaques, ballons, béchers, erlenmeyers, éprouvettes, flacons, spatules, portoirs, verres de montre.

#### 2. Instruments

- Rotavap (BUCHI).
- Balance de précision (KERN).
- Lecteur de microplaque (PerkinElmer).
- Etuve (Memmert).
- pH mètre (METTLER TOLEDO).

### Annexe II : Réactifs des activités antioxydantes

Réactifs	Compositions	Quantités
<b>DPPH'</b>	DPPH	6 mg
	Méthanol	100 ml
<b>ABTS<sup>•+</sup> (7 mM)</b>	ABTS	19,2 mg
	H <sub>2</sub> O	5 ml
	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (2.45 mM)	3,3 mg
	H <sub>2</sub> O	5 ml
<b>Néocuproïne</b>	Néocuproïne	0,039 g
	Ethanol	25 ml
<b>Phénantroline (0.5%)</b>	1,10- Phénantroline monohydraté	0,05g
	Méthanol	q.s. P10 ml
<b>SNP</b>	Ag NO <sub>3</sub>	50 ml
	Trisodium citrate	5 ml

**Annexe III : Réactifs des activités enzymatiques et substrats**

Solutions	Compositions	Quantités
<b>Enzyme <math>\alpha</math>-amylase (1U)</b>	Enzyme $\alpha$ -amylase	1 mg
	Tampon phosphate (pH 6,9)	9ml
<b>Amidon (0.1%)</b>	Amidon	0,1 g
	H <sub>2</sub> O	q.s. P100ml
<b>BChE</b>	BChE	1 mg
	Tampon phosphate (pH 8)	22,6 ml
<b>Chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM)</b>	Chlorure de butyrylthiocholine	4 mg
	H <sub>2</sub> O	4 ml
	Tampon phosphate (pH 8)	4 ml
<b>AChE</b>	AChE	1 mg
	Tampon phosphate (pH 8)	22,6 ml
<b>Chlorure d'acétylthiocholine (0,2 mM)</b>	Chlorure d'acétylthiocholine	4 mg
	H <sub>2</sub> O	4ml
	Tampon phosphate (pH 8)	4ml

**Annexe IV : Réactifs de l'activité anti-inflammatoire**

Réactifs	Compositions	Quantités
<b>Tampon Tris-Hcl (PH 6,6)</b>	Tris	1,2144 mg
	H <sub>2</sub> O	200 ml
	Hcl	
<b>BSA</b>	BSA	0,2 g
	Tris-Hcl	100 ml

## Annexe V : Standards

standards	Compositions	Quantités
<b>Acide gallique</b>	Acide gallique Méthanol	0,5 mg 5 ml
<b>Quercétine</b>	Quercétine Méthanol	1 mg 5 ml
<b>BHA</b>	BHA Méthanol	0,5 mg 1 ml
<b>BHT</b>	BHT Méthanol	0,5 mg 1 ml
<b>Acide ascorbique</b>	Acide Ascorbique Méthanol	4 mg 1 ml
<b><math>\alpha</math>-Tocophérol</b>	$\alpha$ -Tocophérol Méthanol	4 mg 1 ml
<b>Acarbose</b>	Acarbose Méthanol	4 mg 1 ml
<b>Galantamine</b>	Galantamine Méthanol	4 mg 1 ml

## Annexe VI : Solutions chimiques

Solutions chimiques	Compositions	Quantités
Réactif de Folin-Ciocalteu dilué 10 fois	FCR concentré (2M) H <sub>2</sub> O	1ml q.s. P10 ml
Carbonate de sodium anhydre (7,5%)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	7,5 g q.s. P100 ml
Acétate de potassium (1M)	CH <sub>3</sub> COOK H <sub>2</sub> O	9,80 g 100 ml
Nitrate d'aluminium	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , 9H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	10g 100ml
Acétate d'ammonium	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1,927 g 25 ml
Chlorure de cuivre II dihydraté	CuCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	0,042625 g 25 ml
Tampon phosphate pH 6,6	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	62,5 ml 37,5 ml
Ferricyanide de potassium (1%)	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	1 g q.s. P100 ml
Acide trichloracétique (10%)	TCA H <sub>2</sub> O	1 g q.s. P10 ml
Chlorure de fer III anhydre (0.1%)	FeCl <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	0,1 g q.s. P100 ml
Chlorure de fer III anhydre (0.2%)	FeCl <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	0,02g q.s. P10 ml
Chlorure de fer III tetrahydraté (0,2 mM)	FeCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	4 mg 100 ml
Tampon phosphate (pH 6.9) (0.2 M)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	51 ml 49 ml
Acide hydrochlorique (1M)	HCl H <sub>2</sub> O	4.17 ml 45.83 ml
Iodure de potassium iode (IKI)	KI H <sub>2</sub> O Iodine (5mM)	3 g 100 ml 127 mg
Tampon phosphate (pH 8) (100 mM)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,3 94,5
DTNB	DTNB Tampon phosphate (pH 7) NaHCO <sub>3</sub> Tampon phosphate (pH 8)	16 mg 4 ml 7,5 mg 4 ml
Tampon phosphate (pH 7)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	39 ml 61 ml



Figure A : Appareils de broyage



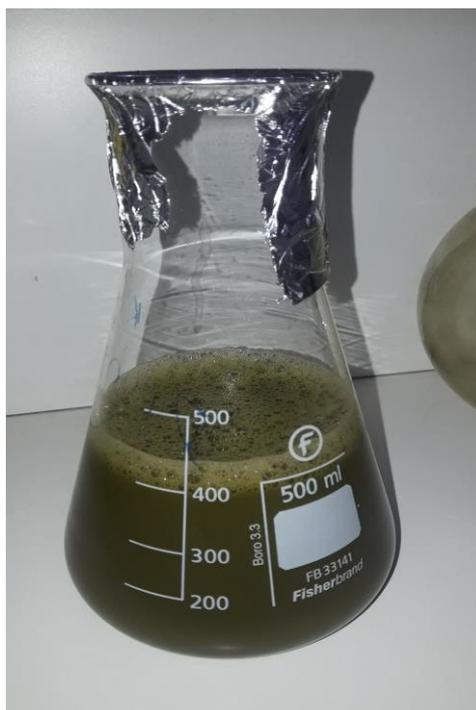
Figure B : Rotavap de marque BUCHI



**Figure C :** Bain-marie marque MEMMERT



**Figure D :** les tubes à essais de l'activité anti - inflammatoire



**Figure E :** L'extract brut de la plante



**Figure F :** Extraction par solvant chloroformique



**Figure G :** Extraction par le solvant d'acétate d'éthyle



**Figure H :** Extraction par le solvant butanolique

# *Résumé*

### Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés naturels à partir de sources naturelles, le présent travail s'intéresse à l'étude phytochimique et biologique de la plante *Eriobotrya japonica* L qui est une plante médicinale appartient à la famille des Rosacées.

La première partie de cette étude concerne la macération des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L, l'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes, les résultats obtenus montrent que la teneur en polyphénols la plus importante est obtenue par l'extrait d'acétate d'éthyle avec un taux de  $(124 \pm 2,94 \mu\text{g EAG/ mg d'extract})$ . La détermination quantitative des flavonoïdes révèle que l'extrait butanolique présente la teneur la plus élevée  $(76,87 \pm 2,65 \mu\text{g EAG/ mg d'extract})$ .

La deuxième partie consiste à étudier certaines activités biologiques, en commençant par l'activité antioxydante, où six tests ont été réalisés ; à savoir, l'activité antiradicalaire au DPPH, l'activité du piégeage du cation radical ABTS•+, l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC), l'activité du pouvoir réducteur (FRAP), l'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>2+</sup>-phénantroline et l'activité silver nanoparticule (SNP) indiquent que les extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica* ont exhibé une importante activité.

En outre, l'activité antidiabétique montre que l'extrait dichlorométhane présente la meilleure capacité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase avec  $\text{CI}_{50} = 8,59 \pm 0,71 \mu\text{g/ml}$ . Concernant l'activité anti-inflammatoire, l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une excellente activité inhibitrice de la dénaturation de BSA ( $\text{CI}_{50} = 26,765 \pm 5,774 \mu\text{g/ml}$ ), il est à noter que notre plante n'a pas une activité anticholinestérase.

On conclut, d'après les résultats obtenus que notre plante est très riche en composé phénolique, ce qui explique d'ailleurs leur pouvoir antidiabétique, anti-inflammatoire et notamment le excellent pouvoir antioxydant de notre plante.

**Mots clés :** Antioxydante ; Anti-inflammatoire ; Anticholinestérase; Antidiabétique; Composés phénoliques ; *Eriobotrya japonica* ; Plante médicinale.

### Abstract

As part of the search for new natural compounds from natural sources, the present work focuses on the phytochemical and biological study of the plant *Eriobotrya japonica* L which is a medicinal plant belonging to the Rosaceae family.

The first part of this study concerns the maceration of the leaves of *Eriobotrya japonica* L, the extraction of total polyphenols and flavonoids, the most important polyphenol content is obtained by ethyl acetate extract with a rate of (124±2.94 µg EAG/ mg extract). The quantitative determination of flavonoids reveals that the butanolic extract has the highest content (76, 87±2.65µg EAG/ mg extract).

The second part consists of studying certain biological activities, starting with antioxidant activity, where six tests were performed ; namely, DPPH antiradical activity, ABTS+ radical cation scavenging activity, copper-neocuproin complex reduction activity (CUPRAC), reducing power activity (FRAP), reducing activity through the formation of the Fe+2-phenantroline complex and silver nanoparticle activity (SNP) indicate that the extracts from the leaves of *Eriobotrya japonica* exhibited significant activity.

In addition, the antidiabetic activity shows that the dichloromethane extract shows the best inhibitory capacity of the alpha-amylase enzyme with  $CI_{50}=8.59\pm 0.71\mu\text{g/ml}$ . Concerning the anti-inflammatory activity, the ethyl acetate extract showed an excellent inhibitory activity of BSA denaturation ( $IC_{50}=26.765\pm 5.774\mu\text{g/ml}$ ), it is noted that our plant does not have an anticholinesterase activity.

It was concluded, from the results obtained, that our plant is rich in phenolic compounds, which explains their biological effect in several activities (antioxidant, antidiabetic, anticholinesterases and anti-inflammatory). And it has been confirmed that the antioxidant activity is the best among the others.

**Keywords:** Antioxidant; Anti-inflammatory; Anticholinesterases; Antidiabetic; Phenolic compounds; *Eriobotrya japonica*; Medicinal plant.

## المخلص

كجزء من البحث عن مركبات طبيعية جديدة من مصادر طبيعية ، يهتم العمل الحالي بالدراسة الكيميائية النباتية والبيولوجية للنبات زعرور اليابان وهو نبات طبي ينتمي إلى عائلة Rosaceae.

يتعلق الجزء الأول من هذه الدراسة بنقع أوراق نبات زعرور اليابان ، واستخراج البوليفينول والفلافونويد، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن أعلى محتوى من مادة البوليفينول تم الحصول عليه من مستخلص أسيتات الإيثيل بمعدل ( $2.94 \pm 124$  ميكروغرام / ملغ من المستخلص). يكشف التحديد الكمي لمركبات الفلافونويد أن مستخلص البيوتانول يحتوي على أعلى محتوى ( $2.65 \pm 76.87$  ميكروغرام من مستخلص EAG / ملغ).

الجزء الثاني يتكون من دراسة بعض الأنشطة البيولوجية ، بدءاً من النشاط المضاد للأكسدة ، حيث تم إجراء ستة اختبارات ؛ النشاط المضاد للجذور الحرة DPPH ، نشاط تنظيف الكاتيون الجذري ABTS ، تقليل نشاط مركب النحاس-النيوكوبروين (CUPRAC) ، نشاط الطاقة المختزلة (FRAP) ، نشاط الاختزال عن طريق تكوين مركب Fe+ 2-phenanthroline ونشاط جسيمات الفضة النانوية (SNP) ، أشارت إلى أن مستخلصات أوراق نبات زعرور اليابان أظهرت نشاطاً كبيراً.

بالإضافة إلى ذلك ، يُظهر النشاط المضاد لمرض السكري أن مستخلص ثنائي كلورو ميثان يُظهر أفضل قدرة مثبطة لأنزيم ألفا أميليز ب ( $8.59 \pm 0.71$  IC50 ميكروغرام / مل) . فيما يتعلق بالنشاط المضاد للالتهابات ، أظهر مستخلص أسيتات الإيثيل نشاطاً مثبطاً ممتازاً لتَغْيِير طبيعة BSA ( $26.765 \pm 5.774$  IC50 ميكروغرام / مل) ، لوحظ أن نباتنا لا يحتوي على نشاط مضادات الكولين.

استنتجنا من النتائج التي تم الحصول عليها أن نباتنا غني بالمركبات الفينولية ، وهو ما يفسر أيضاً قوتها المضادة للسكري والالتهابات وخاصة القوة الممتازة المضادة للأكسدة.

الكلمات الرئيسية: مضادات الأكسدة ؛ مضاد التهاب؛ مضادات الكولين. مضاد لمرض السكر. مركبات فينولية؛ زعرور اليابان؛ نبات طبي.

## Etude phytochimique et l'évaluation *in vitro* des activités antioxydantes, anticholinestérase, antidiabétique et anti-inflammatoire des extraits d'*Eriobotrya japonica*

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie moléculaire et santé.

### Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés naturels à partir de sources naturelles, le présent travail s'intéresse à l'étude phytochimique et biologique de la plante *Eriobotrya japonica* L qui est une plante médicinale appartient à la famille des Rosacées.

La première partie de cette étude concerne la macération des feuilles d'*Eriobotrya japonica* L, l'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes, les résultats obtenus montrent que la teneur en polyphénols la plus importante est obtenue par l'extrait d'acétate d'éthyle avec un taux de (124±2, 94 µg EAG/ mg d'extrait). La détermination quantitative des flavonoïdes révèle que l'extrait butanolique présente la teneur la plus élevée (76, 87±2, 65µg EAG/ mg d'extrait).

La deuxième partie consiste à étudier certaines activités biologiques, en commençant par l'activité antioxydante, où six tests ont été réalisés ; à savoir, l'activité antiradicalaire au DPPH, l'activité du piégeage du cation radical ABTS•+, l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne (CUPRAC), l'activité du pouvoir réducteur (FRAP), l'activité de réduction par la formation du complexe Fe+2-phénantroline et l'activité silver nanoparticule (SNP) indiquent que les extraits des feuilles d'*Eriobotrya japonica* ont exhibé une importante activité.

En outre, l'activité antidiabétique montre que l'extrait dichlorométhane présente la meilleure capacité inhibitrice de l'enzyme alpha-amylase avec CI50=8, 59±0, 71µg/ml. Concernant l'activité anti-inflammatoire, l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une excellente activité inhibitrice de la dénaturation de BSA (CI50=26,765±5,774µg/ml), il est à noter que notre plante n'a pas une activité anticholinestérase.

On conclut, d'après les résultats obtenus que notre plante est très riche en composé phénolique, ce qui explique d'ailleurs leur pouvoir antidiabétique, anti-inflammatoire et notamment l'excellent pouvoir antioxydant de notre plante.

**Mots clés :** Antioxydante ; Anti-inflammatoire ; Anticholinestérase; Antidiabétique; Composés phénoliques ; *Eriobotrya japonica* ; Plante médicinale.

### Jury d'évaluation :

<b>Présidente du jury :</b>	MOKRANI E.	(MAA- UFM Constantine).
<b>Rapporteur :</b>	KLIBET F.	(MCB- UFM Constantine).
<b>Examinatrice :</b>	TENIOU S.	(MAA- UFM Constantine).

**Date de soutenance : 27/09/2020**