



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم :الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département : 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 Moléculaire et Santé*

Intitulé :

**Etude de l'activité biologique in vitro et in vivo des extraits
Méthanolique et Aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus L***

Présenté et soutenu par : *CHETIBI CHOUBEILA*

Le : 05/06/2016

DIAB SOUAD

Jury d'évaluation :

Président : M^r NECIB YUCEF (Pr- UFM Constantine).

Rapporteur : M^{elle} DJEMAI ZOUGHLACHE SOUMIA (M-A- UFM Constantine).

Examineur : M^{elle} BAHY AHLEM (MC-B-UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*



Remerciements

Remerciements



*Nous devons remercier avant tout **Allah** le tout puissant pour toute la volonté et le courage.*

*Nous tenons à remercier notre encadreur **M^{elle} DAMAI ZOUGHLACHE SOUMAYA** pour sa patience et ces conseils précieuses tout au long la réalisation de ce travail.*

*Nous avons remercié également les membres de jury **M^r NECIB YUCEF et M^{elle} BAH AHLEM** pour leur temps consacré durant la lecture et l'évaluation de ce travail.*

*Merci à tous les membres de département de biochimie et biologie cellulaire et moléculaire. Nos remerciements s'adressent également aux responsables du laboratoire de la biochimie de l'université Constantine 1 sans oublier le laboratoire d'hôpital de Cheriaa **CHBOUKI MOUHAMED** qui nous aident beaucoup pour la réalisation du partie pratique consacré dans ce mémoire.*

Ainsi nous tenons à remercier également nos collègues : Mouloud, Mahmoud et Mouhamed.

Un grand remerciement à tous les responsables de bloc de science.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A tous les personnes qui m'encouragent toujours aux moments
difficiles :*

Avant tous à mon grand père Abd el Madjid

A mon père Yahia la source du courage

*A ma mère Nadjet la fleur de mes espérances et la source de la
tendresse*

A ma chère sœur Houda

A mes chers frères : Mouhamed et Nour el Islem

A toute ma famille et sur tout Salwa, Oumayma

Exceptionnellement à le plus chère à mon cœur Bilel

A mes amies les plus proches Amira, Amina, Anissa, Rima.

A mes autre amies sans exception

A mon binôme Souad

Chetibi Choubeila



Dédicace

Je dédie ce travail ...

*A vous, mes chers parents, votre existence illumine
mes chemins, vos paroles clarifient mes doutes, vos
prières guident mes pas, sans vous ce travail
n'aurait pas vu la lumière.*

*A mes sœurs , ABLA ,HANAN et son marie Kamel et leur enfants
AbdArahmane, Mouhamed Amine, AbdElalim, MOCHIRA et son
marie Wahid et leur enfant Anfele et HANA , qui m'ont aidées à
surmonter le stress, et en qui j'ai trouvé refuge dans les moments
difficiles.*

*A mes frères HALIM et sa épouse Siham , ISAM et AMMARE pour
leur apport considerable dans ce travail
Et pour son soutien moral.*

A mes chères MAHBOBA, FATOM et SADA.

*A mes collègues: Choubiela, Salwa ,Najah , Houda, Monjia ,Samira,
Amel, Ahlam, Maryam, Amina Yamina, Hiba, Sara, Wafa, Warda,
Nawel, Najla, Aycha, Malika, Khadija, Rima, Rim, Touta, Nada,
Amira ,Salima, Hada, Selaf.*

*A tous mes proches, à tous ceux sans lesquels je
n'aurais pas achevé ce travail.*

Diab Souad

Résumé

Les extraits naturels connus par leur richesse en molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante in vitro et in vivo des extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus*.

L'analyse qualitative de ces extraits par les tests préliminaires et la CCM a révélé la présence des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tanins ; ceci est confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage, des composés phénoliques, des flavonoïdes et des tanins dont les valeurs sont : pour les composés phénoliques dans l'extrait MET ($48.54 \pm 3.514 \mu\text{g Eq AG / mg d'extrait}$) et l'extrait AQ ($45.19 \pm 0.396 \mu\text{g Eq AG / mg d'extrait}$), les flavonoïdes dans l'extrait MET ($3.710 \pm 0.555 \mu\text{g Eq Q / mg}$) et l'extrait AQ ($6.786 \pm 0.041 \mu\text{g Eq Q / mg}$), et les tanins dans l'extrait MET ($0.063 \pm 0.046 \mu\text{g Eq CT / mg}$), pour l'extrait AQ ($0.190 \pm 0.003 \mu\text{g Eq CT / mg}$).

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium a révélé une grande activité anti oxydante de l'extrait MET par comparaison avec l'extrait AQ.

L'analyse in vivo faite sur 16 rattes Albinos Wistar est basée sur l'étude des effets nocifs de plomb sur quelques paramètres biochimique, et le rôle de l'extrait MET (200mg/kg) de *Zizyphus lotus* en réduisant ou éliminant les effets cytotoxiques induit par le plomb.

Les résultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimique, et pondéraux caractérisés surtout par une augmentation significative de la concentration sérique du glucose, transaminase (AST, ALT), l'urée, l'acide urique et la créatinine, et une augmentation non significative de PAL chez les rattes traitées par plomb seul par rapport aux témoins.

Par ailleurs la supplémentation de l'extrait méthanolique de *Zizyphus lotus* a modifié les effets toxiques du plomb et il est considéré comme un antioxydant fort et efficace contre le stress oxydant induit par le plomb.

Mots clés : *Zizyphus lotus*, activité antioxydante, molybdate, composés Phénoliques, flavonoïdes, tanins, plomb, l'extrait méthanolique, l'extrait aqueux.

Abstract

Natural extracts known by their wealth of biological active molecules. In this study, we have tried to evaluate the antioxidant activity in vitro and in vivo of methanolic and aqueous extracts from the roots bark of *Zizyphus lotus*.

The qualitative analysis of these extracts by tests screening and TLC has shown the presence of phenolics compounds, flavonoids, tannins. This is confirmed by a quantitative analysis based on the dosage of phenolics, flavonoids and tannins which values are: for phenolic compounds in the extract MET ($48.54 \pm 3.514 \mu\text{gEAG} / \text{mg extract}$) and extracts AQ ($45.19 \pm 0.396 \mu\text{g EAG} / \text{mg extract}$), flavonoids in the MET extract ($3.710 \pm 0.555 \mu\text{g EQ} / \text{mg}$) and AQ extract ($6.786 \pm 0.041 \mu\text{g EQ} / \text{mg}$), and tannins in 'MET extract ($0.063 \pm 0.046 \mu\text{g ECT} / \text{mg}$) for AQ extract ($0.190 \pm 0.003 \mu\text{g ECT} / \text{mg}$).

The study of antioxidant activity by the ammonium phosphomolybdenum method revealed high antioxidant activity of the extract MET compared to AQ extract.

The in vivo analysis by 16 rats Wistar Albinos is based on the study of harmful effects of lead on some biochemical parameters, and the role of MET extract (200mg / kg) of *Zizyphus lotus* in reducing or eliminating the cytotoxic effects which are produced by lead.

The results also showed significant difference in biochemical parameters, weight, especially characterized by a significant increase in serum glucose, transaminase (AST, ALT), urea, creatinin, uric acid, and an increase not significantly in PAL in rats treated only with lead compared to controls.

Moreover supplementation of methanolic extract of *Zizyphus lotus* changed the toxic effects of lead and is considered a safe and effective antioxidant against oxidative stress induced by lead.

Key words: *Zizyphus lotus*, antioxidant activity, molybdate, Phenolic compounds, flavonoids, tannins, lead, methanol extract, aqueous extract.

المُلخَص

تعرف المستخلصات النباتية بغناها بالجزيئات النشطة بيولوجيا و في هذا الصدد قمنا بتقييم النشاطية ضد الأكسدة للمستخلص الميثانولي و المائي للحاء جذور نبات السدر.

كشف التحليل النوعي لهذين المستخلصين بواسطة الاختبارات التمهيدية و كروماتوغرافيا الطبقات الرقيقة عن وجود المركبات الفينولية, الفلوفونويدات, الصباغ, و هذا ما أكد بواسطة التحليل الكمي المعتمد أساسا على حساب تراكيز المركبات الفينولية, الفلوفونويدات, الصباغ بحيث كانت قيم المركبات الفينولية كالتالي في المستخلص الميثانولي ($48.51 \pm$ 3.514 ميكروغرام مكافئ الغاليك/مغ) و المستخلص المائي (45.19 ± 0.396 ميكروغرام مكافئ الغاليك/مغ) الفلوفونويدات في المستخلص الميثانولي (3.710 ± 0.555 ميكروغرام مكافئ الكارستين/مغ) و المستخلص المائي (6.786 ± 0.041 ميكروغرام مكافئ الكارستين/مغ) و الصباغ في المستخلص الميثانولي (0.093 ± 0.046 ميكروغرام مكافئ الكاتيشين/مغ) و المستخلص المائي (0.190 ± 0.03 ميكروغرام مكافئ الكاتيشين).

أظهرت دراسة النشاطية ضد الأكسدة بطريقة فسفوملبدات الانيوم فعالية كبيرة للمستخلص الميثانولي مقارنة مع المستخلص المائي.

تعتمد الدراسة الحيوية على 16 فارة من سلالة البيبوس ويستار على معرفة مدى التأثير السام لعنصر الرصاص على بعض المؤشرات البيوكيميائية ومدى الدور الوقائي للمستخلص الميثانولي (200مغ/كغ) للحاء جذور نبات السدر في الحد أو القضاء على الآثار السمية الناتجة عن الرصاص.

أظهرت النتائج أيضا تغيرات معنوية في المؤشرات البيوكيميائية والتي تجلت في زيادة معنوية في التركيز المصلي لسكر الغلوكوز, إنزيمات ناقلات الأمين, اليوريا, حمض ليوري, والكرياتنين, وزيادة غير معنوية للفوسفاتاز القاعدي لدى الفئران المعاملة بالرصاص مقارنة مع المجموعة الشاهدة.

في حين إضافة المستخلص الميثانولي لنبات السدر أدى الى تعديل التأثير السمي للرصاص ويعتبر كمضاد أكسدة قوي وفعال ضد الإجهاد التاكسدي المحرض بواسطة الرصاص.

الكلمات المفتاحية: السدر, النشاطية ضد الأكسدة, موليبديات, المركبات الفينولية, الفلوفونويد, الصباغ, الرصاص, المستخلص الميثانولي, المستخلص المائي.

Abréviation

ABS : Absorbance

AG : Acide galique

ALAT : Alanine aminotransférase

AlCl₃ : trichlorure d'aluminium

AQ : extrait aqueux

ASAT : Aspartate aminotransférase

BAW: n-Butanol/Acide acétique/eau

CA : Catéchine

CCM: Chromatographie sur couche mince

D.O : Densité optique

ERO : espèces réactifs de l'oxygène

MET : extrait méthanolique

PAL : Alcaline phosphatase

Pb : Plomb

Pb/MET : Plomb/ extrait méthanolique

Q : Quercétine

RF : Rapport frontal

TGO : Aspartate aminotransférase

TGP : Aminotransférase

UV : Ultra violet

µg Eq AG/mg d'extrait: microgramme d'équivalent acide gallique par milligramme d'extrait

µg Eq CT/mg d'extrait : microgramme d'équivalent catéchine par milligramme d'extrait

µg Eq Q/mg d'extrait : microgramme d'équivalent quercétine par milligramme d'extrait

Liste des tableaux

N° de tableau	Titre des tableaux	Page
Tableau 01.	Pourcentage des compositions primaires des <i>Zizyphus lotus</i>	3
Tableau 02.	Composition chimiques de différents organes végétaux du <i>Zizyphus lotus</i>	4
Tableau 03.	Les principales classes des composés phénoliques.....	7
Tableau 04.	Espèces réactives de l'oxygéné.....	14
Tableau 05.	Les composés inorganiques et organiques du plomb.....	19
Tableau 06.	Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment.....	32
Tableau 07.	Aspect et couleur de l'extrait AQ et MET des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i>	41
Tableau 08.	Résultats des tests préliminaires de quelque métabolite secondaire de l'extrait Méthanolique et Aqueux du <i>Zizyphus lotus</i>	41
Tableau 09.	Rapports frontaux et couleurs après révélation.....	43
Tableau 10.	Teneur des composés phénoliques.....	44

Listes des figures

N° de figure	Titre des figures	Page
Figure 01.	Fruit de <i>Zizyphus lotus</i> L.....	01
Figure 02.	<i>Zizyphus lotus</i> L.....	01
Figure 03.	Feuilles de <i>Zizyphus lotus</i> L.....	01
Figure 04.	Fleurs de <i>Zizyphus lotus</i> L.....	01
Figure 05.	Aire de répartition du <i>Zizyphus lotus</i> L en Algérie.....	03
Figure 06.	Squelette de base de classification des flavonoïdes.....	08
Figure 07.	Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes.....	09
Figure 08.	Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes.....	09
Figure 09.	Structure des tanins hydrolysables.....	11
Figure 10.	Structure des tanins condensés.....	12
Figure 11.	Déséquilibre entre les antioxydants et les radicaux libres	14
Figure 12.	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	15
Figure 13.	Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques.....	16
Figure 14.	Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR.....	18
Figure 15.	L'action du plomb sur la biosynthèse de l'hème.....	23
Figure 16.	Les racines des <i>Zizyphus lotus</i>	25
Figure 17.	Différentes étapes de préparation de l'extrait Méthanolique.....	26
Figure 18.	Le Lyophilisateur	26
Figure 19.	Différentes étapes de préparation de l'extrait Aqueux	27
Figure 20.	La réaction entre la vanilline est les tanins condensés	30
Figure 21.	Méthode de gavage et l'injection intra péritonéal chez la ratte.....	33
Figure 22.	Méthode de prélèvement de sang par ponction du sinus rétro-orbitale	33
Figure 23.	Schéma récapitulatif du protocole expérimental.....	34

Figure 24. Chromatographie sur couche mince d'extrait Méthanolique et Aqueux des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i>	42
Figure 25. Teneur des composés phénoliques, flavonoïdes, tanins en µg E standard/ mg d'extrait.....	44
Figure 26. Droite d'étalonnage de l'acide gallique	45
Figure 27. Droite d'étalonnage de la quercétine	45
Figure 28. Droite d'étalonnage de la catéchine	46
Figure 29. Activité antioxydante des différents concentrations de l'extrait MET et AQ..	46
Figure 30. Variation du poids corporel en (g) chez les rattes témoins et traitées par l'extrait MET, le plomb et la combinaison (MET/Pb) après 8 jours de traitement.....	48
Figure 31. Variation de la concentration sérique de glucose, l'urée, créatinine, l'acide urique, chez les rattes témoins et traitées par l'extrait MET, le plomb et la combinaison (MET/Pb) après 8 jours de traitement.....	51
Figure 32. Variation de l'activité enzymatique de TGO, TGP, PAL, chez les rattes témoins et traitées par l'extrait méthanolique, le plomb et la combinaison (MET/Pb) après 8 jours de traitement.....	54

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I. Généralités sur le *Zizyphus lotus*

I.1. Description botanique.....	1
I.2. Nomenclatures du <i>Zizyphus lotus</i>	2
I.2.1. Nom scientifique.....	2
I.2.2. Synonymes.....	2
I.2.3. Noms régional.....	2
I.2.4. Classification botanique.....	2
I.3. Répartition géographique.....	2
I.3.1. Dans le monde.....	2
I.3.2. En Algérie.....	2
I.4. Composition biochimique du <i>Zizyphus lotus</i>	3
I.4.1. Métabolites primaires.....	3
I.4.2. Métabolites secondaires.....	3
I.5. Activités biologiques et thérapeutiques de <i>Zizyphus lotus L.</i>	4
I.5.1. Activités anti-inflammatoires et analgésiques.....	4
I.5.2. Activités antiulcérogènes.....	5
I.5.3. Activités antimicrobiennes.....	5

Chapitre II. Les composés phénoliques

II.1. Définition des polyphénols.....	6
II.2. Classification des structures des phénoliques.....	6
II.3. Les flavonoïdes.....	7
II.3.1. Structure chimique et classification.....	7
II.3.2. L'activités biologique des flavonoïdes.....	8
II.4. Les tanins.....	11
II.4.1. Classification des tanins.....	11
II.4.1.1. Les tanins hydrolysables.....	11
II.4.1.2. Les tanins condensés.....	12
II.4.2. Activités biologiques des tanins.....	12

Chapitre III. Le stress oxydatif

III.1. Stress oxydatif.....	14
III.2. Les espèces réactives oxygénées.....	14
III.3. Le radical libre (RL).....	15
III.4. Les antioxydant.....	15
III.4.1. Antioxydants enzymatiques.....	15
III.4.2. Antioxydants non enzymatiques.....	16
III.5. Les conséquences du stress oxydatif.....	17

Chapitre IV. L'acétate de plomb

IV. Plomb.....	19
IV.1. Propriétés physico-chimiques du plomb.....	19
IV.1.1. Propriétés physiques.....	19

IV.1.2. Propriétés chimiques.....	19
IV.2. Les composés toxiques du plomb.....	19
IV.3. Les principales sources d'exposition au plomb.....	20
IV.3.1. Les sources d'exposition professionnelle.....	20
IV.3.2. Les sources d'exposition non professionnelle.....	20
IV.4. Toxicocinétique.....	20
IV.5. L'intoxication du plomb.....	22
IV.5.1. L'intoxication aiguë.....	22
IV.5.2. L'intoxication chronique.....	22
IV.6. Le mécanisme d'action de plomb.....	22
IV.7. Les effets toxiques de plomb.....	22
IV.7.1. L'effet de plomb sur la synthèse de l'hème.....	23
IV.7.2. L'effet de plomb sur le foie.....	24
IV.7.3. L'effet de plomb sur les reins.....	24

Partie II

Etude expérimental

Chapitre I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel.....	25
I.1.1. Matériel végétale.....	25
I.2. Méthodes.....	25
I.2.1. Préparation des extraits Méthanolique et Aqueux à partir des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i>	25
I.2.2. Analyse des extraits et Méthanolique et Aqueux du <i>Zizyphus lotus</i>	27
I.2.2.1. Analyse qualitative des extraits du <i>Zizyphus lotus</i>	27

I.2.2.1.1. Tests préliminaires.....	27
I.2.2.1.2. Chromatographie sur couche mince.....	28
I.2.2.2. Analyse quantitative de les extrait MET et AQ d'écorces des racines des <i>Zizyphus</i> lotus.....	29
I.2.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	29
I.2.2.2.2. Dosage des Flavonoïdes.....	29
I.2.2.2.3. Dosage des tanins condensés.....	29
I.2.2.3. Activités biologique.....	30
I.2.2.3.1. Activité antioxydant par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium....	30
I.3. Matériel biologique et condition d'élevage.....	32
I.4. Traitement des rattes.....	32
I.5. Prélèvement sanguin.....	33
I.6. Dosage des paramètres biochimiques.....	35
I.6.1. Dosage du glucose.....	35
I.6.2. Dosage de l'urée.....	35
I.6.3. Dosage de l'acide urique.....	36
I.6.4. Dosage de créatinine.....	37
I.6.5. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT/ TGO).....	38
I.6.6. Dosage de l'alaline aminotransférase (ALAT/TGP).....	38
I.6.7. Dosage de l'alcaline phosphatase (PAL).....	39
I.7. Analyses statistique.....	40

Chapitre II. Résultats et discussion

II.1. Préparation d'extrait aqueux et méthanolique à partir des écorces des racines du <i>Zizyphus</i> <i>lotus</i>	41
--	----

II.2. Analyse des extraits aqueux et méthanolique des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i>	41
.....	41
II.2.1. Analyse qualitative de l'extrait AQ et MET.....	41
II.2.1.1. Tests préliminaire.....	41
II.2.1.2. Chromatographie sur couche mince.....	42
II.2.2. Analyse quantitative de l'extrait méthanolique et aqueux des écorces des racines du <i>Zizyphus lotus</i>	43
II.3. Activités biologiques.....	46
II.3.1. Activité antioxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium.....	46
II.4. Etude de l'effet protecteur d'extrait méthanolique de <i>Zizyphus lotus</i> contre le stress oxydant induit par le plomb.....	48
II.5. Influence du traitement sur les variations du poids corporel.....	48
II.6. Influence du traitement sur les variations des paramètres biochimiques sériques.....	49
II.7. Influence du traitement sur les variations de l'activité sériques de quelque marqueur enzymatique.....	52
Conclusion générale.....	55
Référence bibliographique.....	57
Annexe.....	66

Introduction

générale

Introduction générale

Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé (Carillon, 2000). A l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques.

Les radicaux libres (RL) en général et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) en particulier sont impliqués dans plusieurs pathologies humaines : de l'inflammation, cancer, le diabète en conséquence de leur action directe en réagissant avec la plupart des macromolécules.

Les métaux lourds sont parmi les facteurs qui provoquent la formation des radicaux libres, ils sont des polluants définis comme des substances chimiques responsables d'une pollution comme le plomb, cadmium et le mercure peuvent eux générer une grande variété d'effets néfastes au niveau de la cellule, du tissu ou de l'organe (Divine et al., 1999).

Le plomb est un métal lourd le plus toxique, et quelque soit sa concentration dans l'organisme, il peut causer une très grande variété de perturbations psychophysiologiques.

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances actives douées d'activités biologiques et qui l'arme permettant de faire face au stress oxydant et ses dégâts au niveau des organes de l'être vivant.

La présente étude a porté sur la recherche de constituants chimiques et sur l'évaluation *in vitro et in vivo* des activités antioxydantes d'extrait méthanolique et aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus* (Sedra). Cette plante largement utilisée dans la médecine traditionnelle comme adoucissant dans le traitement de la gorge et les irritations bronchopulmonaires, un émollient dans le traitement des furoncles. D'ailleurs, elle possède plusieurs activités thérapeutiques : anti-inflammatoire, analgésique, anti-ulcérogénique et antimicrobiennes.

Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

Etude *in vitro* qui comporte :

- ✓ Analyse qualitative de l'extrait méthanolique et aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus* par les tests préliminaires et la CCM.
- ✓ Analyse quantitative du contenu en polyphénols, flavonoïdes et tanins de l'extrait méthanolique et aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus*.

- ✓ Etude de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique et aqueux, en utilisant la méthode de phosphomolybdate d'ammonium.

Etude in vivo:

En explorant l'impact du plomb sur certains aspects pondéraux, biochimique chez les rattes *Wistar*, et en évaluant les effets de *Zizyphus lotus* associé, afin d'établir si cette plante peut protéger contre les effets cytotoxique du plomb.

Dans ce contexte, notre étude tend à mettre en évidence les effets protectifs de l'extrait méthanolique du *Zizyphus lotus* sur une agression par le plomb en évaluant les aspects suivants :

- ✓ Etude de la variation pondérale du poids.
- ✓ Mesure de la concentration des quelques paramètres biochimique plasmatiques.

PARTIE 01

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

Généralité sur le Zizyphus Lotus

I.1. Description botanique

Le *Zizyphus lotus* appartient à la famille des Rhamnacées représente 135-170 espèces (Maraghni et al., 2010). Communément appelé en Afrique du Nord "Sedra" (Borgiet al., 2007(a)). C'est un arbrisseau sous forme de buisson ne dépassant pas 2.5m à rameaux, très épineux gris blanc poussant en zigzag (Claudine, 2007).

Les feuilles sont courtement pétiolées, glabres, caduques alternées et ovales à marges entières. Les fleurs sont jaunes, pentamètres et groupées en inflorescence cymeuses. Les fruits sont des drupes à noyaux soudés, l'endocarpe mucilagineux appelé "Nbeg" (Rsaissi et Bouchache, 2002). Le fruit ovoïde-ovale, ayant la forme et la grosseur d'une belle olive d'abord vert puis jaune, il devient rouge foncé quand il est mur, en octobre (Bayer et Butter, 2000).



Figure 01. Fruit de *Zizyphus lotus* L.



Figure 02. Plante de *Zizyphus lotus* L (Benammar, 2011).



Figure 03. Feuilles de *Zizyphus lotus* L (Mila. Ain Tinne, 2016).



Figure 04. Fleurs de *Zizyphus lotus* L (Mila. Zghaya, 2015).

I.2. Nomenclatures du *Zizyphus lotus***I.2.1. Nom scientifique**

Zizyphus lotus Lam.

I.2.2. Synonymes

Jujube lam , *Zizyphus orthacantha* DC, *Zizyphus sativus* caert, *Zizyphus vulgaris* lam (Von Maydell, 1990).

I.2.3. Noms régional

- Français : Jujubier sauvage ou Jujubier des Lotophages, Jujubier, Dindonnier.
- Italien: Giuggiolo selvatico.
- Arabe : Sedra. (Baba Aissa, 1999).

I.2.4. Classification botanique

Règne : *Végétale.*

Embranchement : *Spermatophytes.*

Sous embranchement : *Angiospermes.*

Sous classe : *Dicotylédone.*

Ordre : *Celastrale.*

Famille : *Rhamnacées.*

Genre : *Zizyphus.*

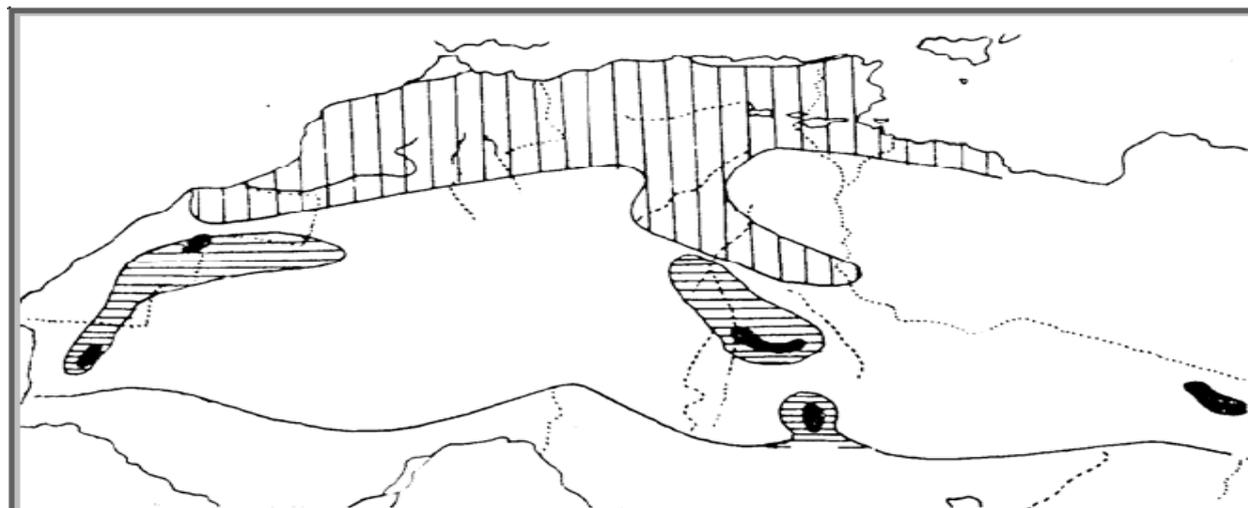
Espèce : *Zizyphus lotus* L. (Quezel et Santa, 1962).

I.3. Répartition géographique**I.3.1. Dans le monde**

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

I.3.2. En Algérie

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



Aire de *Zizyphus lotus* L.

Figure 05. Aire de répartition du *Zizyphus lotus* L en Algérie (Quezel et Santa, 1962).

I.4. Composition biochimique du *Zizyphus lotus*

Les études phytochimiques menées sur le *Zizyphus lotus* montrent la présence des métabolites primaires et secondaires (Catoire *et al.*, 1994).

I.4.1. Métabolites primaires

Tableau 01. Pourcentage des compositions primaires des *Zizyphus lotus* (Chouaibi, 2011).

Protéine	19.11%.
Carbohydate	40,87%
Lipides	32.92%

I.4.2. Métabolites secondaires

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

Tableau 02. Composition chimiques de différents organes végétaux du *Zizyphus lotus*.

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

I.5. Activités biologiques et thérapeutiques de *Zizyphus lotus L*

Le *Zizyphus lotus* est largement utilisé dans le traitement de certaines maladies comme : les maladies inflammatoires, les troubles digestives, la faiblesse, les affections du foie, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections cutanées, la fièvre, la diarrhée et l'insomnie (Abu-Zarga et al., 1995; Abdel-Zaher et al., 2005; Suksamrarn et al., 2005). Actuellement les recherches s'intéressent à différentes activités pharmacologiques de *Zizyphus lotus* pour développer et améliorer la médecine moderne, les plus importants effets sont :

I.5.1. Activités anti-inflammatoires et analgésiques

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

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

I.5.2. Activités antiulcérogènes

Le Zizyphus lotus (les feuilles, l'écorce des racines) possède une importante activité anti-ulcérogénique attribuée à la présence des tanins et des flavonoïdes connus par leur effet gastroprotecteur donc il donnent une activité anti-ulcérogène (Borgi et al., 2008).

I.5.3. Activités antimicrobiennes

Des études faites par (Ghédira et al., 1995) ont montré qu'un alcaloïde de cette espèce présente une activité antibactérienne significative.

D'autres études faites sur l'activité antimicrobienne des extraits du *Zizyphus lotus* ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (Jürgen et al., 2009).

CHAPITRE II

LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

II.1. Définition des polyphéno

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considérés.

Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal.

Comme définition, les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (Dangles et al., 1992 ; Hagerman et al., 1998 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Les polyphénols regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants (Bamforth, 2000). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Dalton, comme les tanins (Hagerman et al., 1998 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

II.2. Classification des structure des phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en une dizaine de classes (Harborne, 1989; Mancheix et al., 2006) (**tableau03**) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques) (Mancheix et al., 2006). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 (Harborne, 1989; Crozier et al., 2006).

Tableau 03. Les principales classes des composés phénoliques (Harborne, 1989; Macheix et al., 2006; Crozier et al., 2006).

Squelette carbonée	Classes
C ₆	Phénols simples
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques Coumarines
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes
(C ₆ -C ₂) ₂	Lignanes
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines
(C ₁₅)	Tannins

II.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une large gamme de composés naturels, appartenant à la famille des polyphénols, considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de la couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (Pietta, 2000; Ghedira, 2005).

II.3.1. Structure chimique et classification

Les flavonoïdes ont un squelette de base commun constitué de 15 atomes de carbone assemblés en trois cycles nommés A, C et B. Selon la structure du cycle intermédiaire (cycle C), les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules.

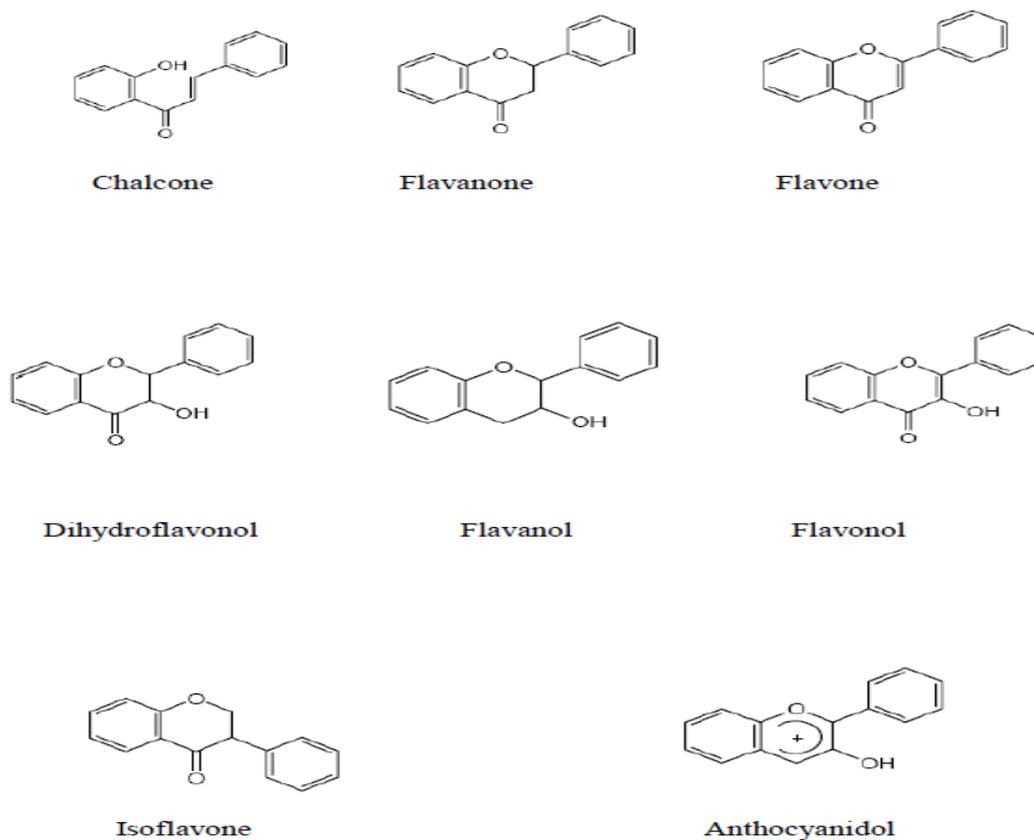


Figure 06. Squelette de base et classification des flavonoïdes (Fiorucci, 2006).

II.3.2. L'activités biologique des flavonoïdes

II.3.2.1. Activité anti-oxydante

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels. Les flavonoïdes sont susceptibles de réagir avec la plupart des espèces réactives oxygénées (Fuhrman et al., 1995).

L'action antioxydante de ces phytonutriments ne s'exerce pas seulement par l'inhibition et la désactivation des radicaux libres, elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par la chélation des traces d'ions métalliques responsables de la production de ROS (Halliwell, 1994; Cotelle, 2001).

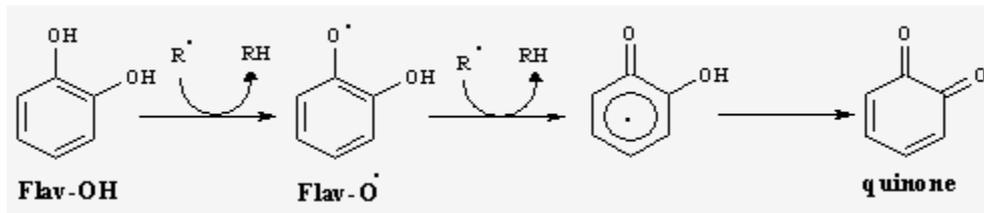


Figure 07. Piégeage des espèces réactives oxygénées par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

Les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui combinent les trois cratères suivants :

- ✓ Une double liaison C2-C3 et une fonction 4-oxo
- ✓ La structure ortho-diphénolique du cycle B des flavonoïdes.
- ✓ Le groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif (Marfak, 2003 ; Balasundram, 2006).

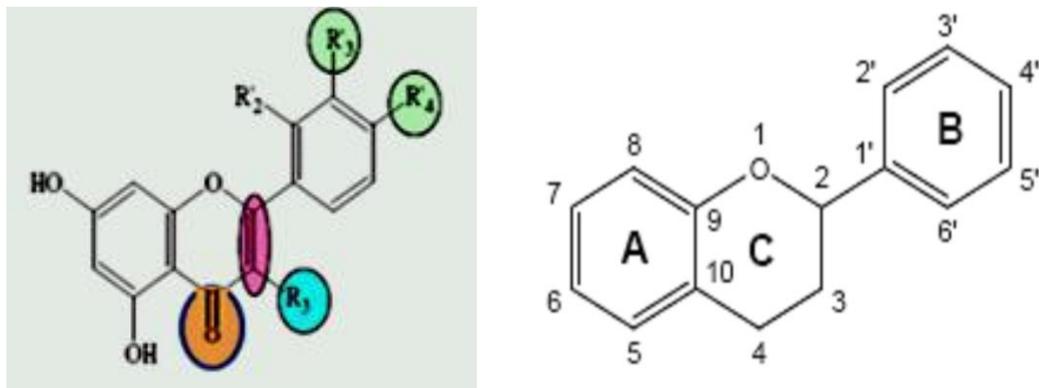


Figure 08. Éléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes (Marfak, 2003).

II.3.2.2. Activité antimicrobienne

Les propriétés antimicrobiennes des flavonoïdes vis-à-vis de différents micro-organismes pathogènes ont été mises en évidence. Les extraits des plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont été rapportés posséder une activité antimicrobienne. Beaucoup de groupes de recherche ont franchi une étape plus loin, ils ont isolé et identifié la structure des flavonoïdes qui possèdent l'activité antimicrobienne ou ont mesuré l'activité des flavonoïdes disponibles dans le commerce.

Des travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Récemment, des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec

une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Mahmood et al., 1993).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des flavonoïdes est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses avancées, on va citer :

- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique.
- Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique.
- Séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne.
- Inhibition du métabolisme énergétique microbien (Milane, 2004).

II.3.2.3. Activité anti-inflammatoires

Les flavonoïdes ont un effet palliatif sur l'inflammation du à l'inhibition de la libération de l'histamine et la synthèse des leucotriènes où ils agissent comme des piègeurs de superoxyde (Formica et Regelson, 1995).

Des études montrent que certains flavonoïdes sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique, qui conduit à la formation des prostaglandines et des leucotriènes médiateurs de l'inflammation et des manifestations allergiques (Landolfi, 1984).

II.3.2.4. Autres effets biologiques

Les flavonoïdes sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire, mais leur action est complexe et demeure encore mal élucidée. A doses élevées, les flavones et flavonols sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T, mais, à concentrations plus faibles, ils pourraient agir comme immunostimulants chez les sujets immunodéprimés.

Les flavonoïdes peuvent prévenir le diabète ou au moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Une étude récente montrée que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques (Ong et Khoo, 2000).

Les flavonoïdes ont été également étudiées pour leurs propriétés anti-tumorales (Birt et al., 2001).

Les flavonoïdes sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes. La naringine et la quercétine exercent également une activité anti-ulcérogène mise en évidence chez le rat dont l'ulcère gastrique a été induit par l'éthanol (Cotelle, 2001).

II.4. Les tanins

Le terme « tannin » ou « tanin » vient de la source de tanins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tanins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes (Dangles et al., 1992).

Les tanins végétaux sont des composés phénoliques solubles dans l'eau et ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Dalton (Bruneton, 1999).

II.4.1. Classification des tanins

On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux grands groupes de tanins différents par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bruneton, 1999).

II.4.1.1. Les tanins hydrolysables

Ce sont des esters du glucose (ou de molécules apparentées) et d'acides phénols qui sont :

- Soit l'acide gallique, on parle alors de tanins galliques.
- Soit l'acide ellagique, qui est un dimère de l'acide gallique, on parle alors de tanins ellagiques.

Dans les deux cas, la fraction osidique est estérifiée par plusieurs molécules d'acide gallique ou plusieurs molécules d'acide ellagique (Ghestem et al., 2001).

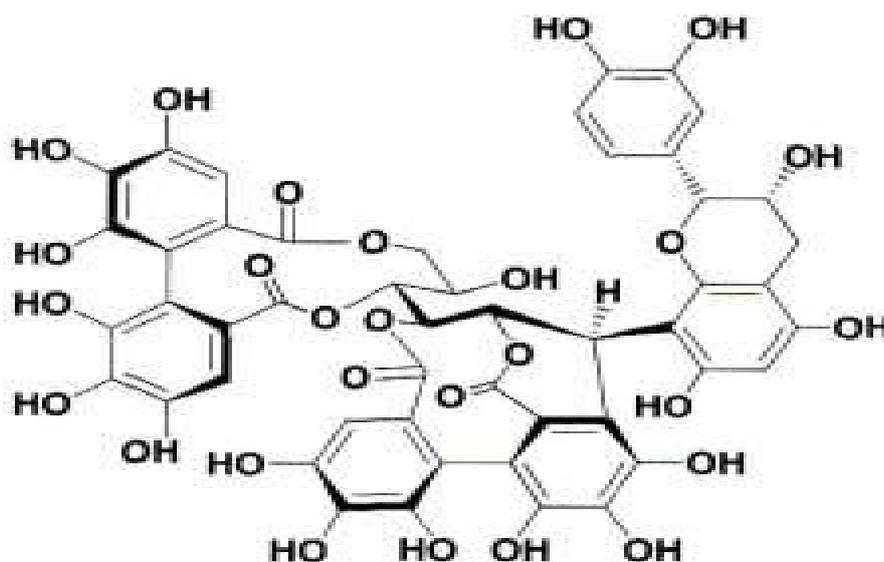


Figure 09. Structure des tanins hydrolysables (Bruneton, 1999).

II.4.1.2. Les tanins condensés

Ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3 ol dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères (Harborne, 1989; Awika et Rooney, 2004). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (Guignard, 1996).

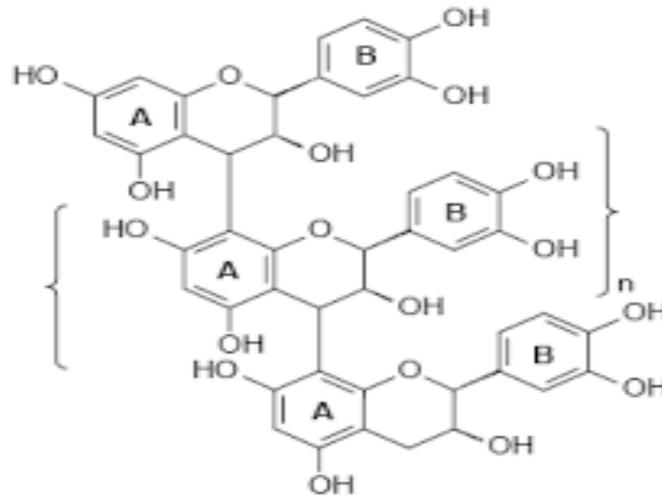


Figure 10. Structure des tanins condensés (bruneton, 1999).

II.4.2. Activités biologiques des tanins

II.4.2.1. Activité antioxydante des tanins

Les tanins ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto oxydation (Perret, 2001). Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples (Peronny, 2005).

Plusieurs propriétés structurales des tanins augmentent leur activité antioxydante:

- La galloylation, préférablement en position 3' augmente la capacité du piégeage pour l'O₂[·] et OH[·].
- Le piégeage de O₂[·] est plus important pour les dimères procyanidines couplés par une liaison (4→8) que les dimères liés par une liaison (4→6) (De Bruyne et al., 1999).

II.4.2.2. Inhibition enzymatique

La fixation des tanins avec les protéines peut engendrer l'inhibition de plusieurs enzymes comme : l'inhibition de la protéines kinase C par les tanins éllagiques et les tanins complexes,

les dimères procyanidoliques ont une activité inhibitrice sur l'histidine decarboxylase et l'élastase (Bruneton, 1999) ; inhibition de l' α -amylase salivaire humaine (Kandra et al., 2004).

II.4.2.3. Activité thérapeutique due à l'astringence

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

Par voie externe, les tanins imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; ils ont également un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. (Bruneton, 1999).

II.4.2.4. Activités antimicrobiennes des tanins

Les tanins ont été rapportées comme bactériostatique ou bactéricide sur plusieurs souches bactériennes. L'acide tannique a inhibé la croissance des bactéries des aliments et des bactéries intestinales humaines.

L'activité antivirale des tanins est due à la fixation des molécules des tanins à l'enveloppe protéique du virus ou la membrane de la cellule hôte et par conséquent l'inhibition de l'adsorption et la pénétration virale (Chung et Wei, 2001).

CHAPITRE III

Le stress oxydatif

III.1. Stress oxydatif

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydants de l'organisme (Haleng et al., 2007).

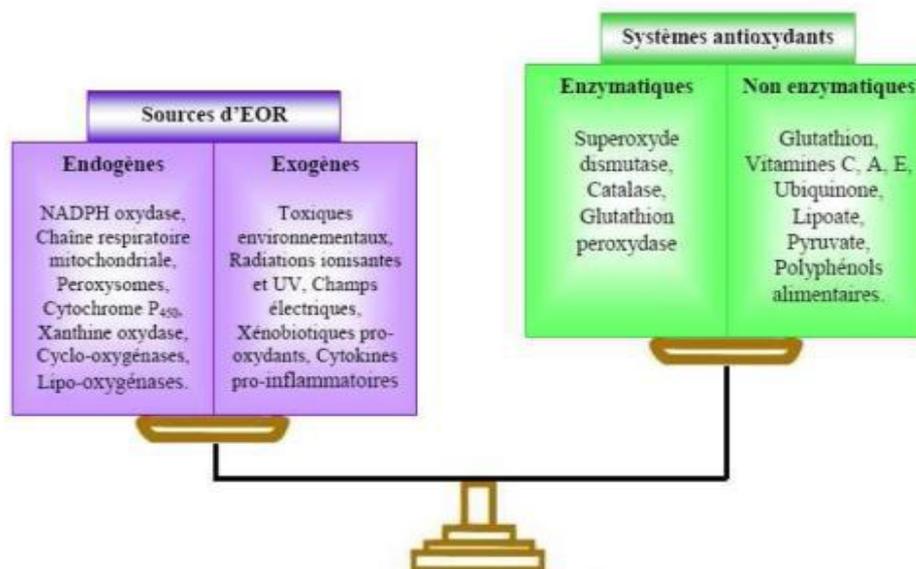


Figure 11. Déséquilibre entre les antioxydants et les radicaux libre (Shimizu, 2004).

III.2. Les espèces réactives oxygénées

Parmi les espèces réactives oxygénées les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives radicalaire qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. les principales espèces réactives de l'oxygène radicalaire sont: le radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxydinitrite ($ONOO^-$) (Gutteridge, 1993; Jacques et André, 2004).

Tableau 04. Espèces réactives de l'oxygène(Kohen et Nyska, 2002).

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$	Peroxyde d'hydrogene H_2O_2
Radical hydroxyle OH^{\bullet}	Peroxyde organique $ROOH$
Radical peroxyde ROO^{\bullet}	Acide hypochlorique $HOCl$
Radical alkoxyde RO^{\bullet}	Oxygène singulet 1O_2
Monoxyde d'azote NO^{\bullet}	Peroxydinitrite $ONOO^-$

III.3. Le radical libre (RL)

Un radical libre peut être une molécule ou un atome neutre ou chargé, ayant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataire), ce qui le rend extrêmement réactif. Exemple : l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, d'où le symbole \cdot indique la présence d'un électron célibataire, le signe $-$ une charge électronique négative (Dacosta, 2003; Vansant, 2004).

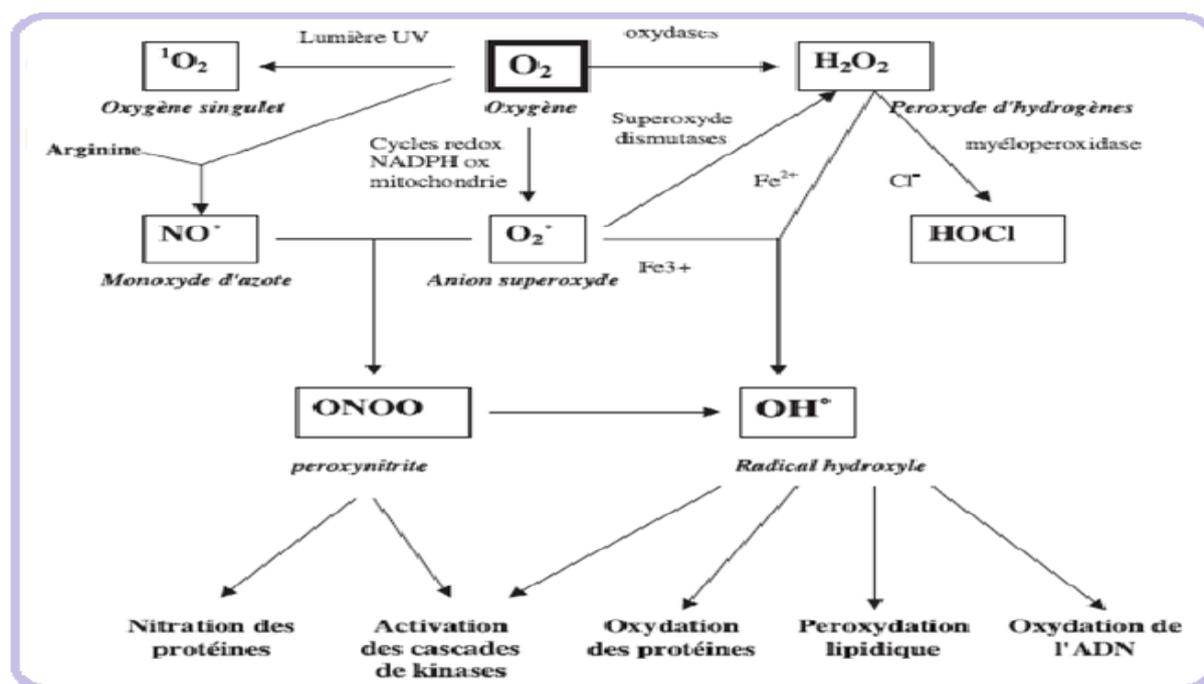


Figure 12. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

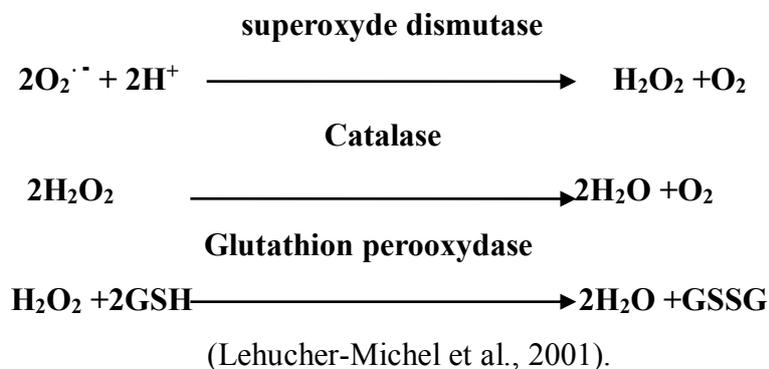
III.4. Les antioxydant

Un antioxydant est défini comme étant toute molécule, à concentration relativement faible, capable d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et peut retarder, inhiber ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (Boyd et al., 2003; Berger, 2006), ce sont des composés qui réagissent avec les EOR et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant, 2004).

III.4.1. Antioxydants enzymatiques

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la défense antioxydante. Les trois enzymes antioxydantes majeures sont les superoxydes dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPx) et la catalase (CAT).

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



➤ La catalase

Est une protéine formée de quatre chaînes polypeptidiques, comportant chacune un groupe hème, qui constituent les sites actifs de la CAT. Elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles (Delattre et al., 2005).

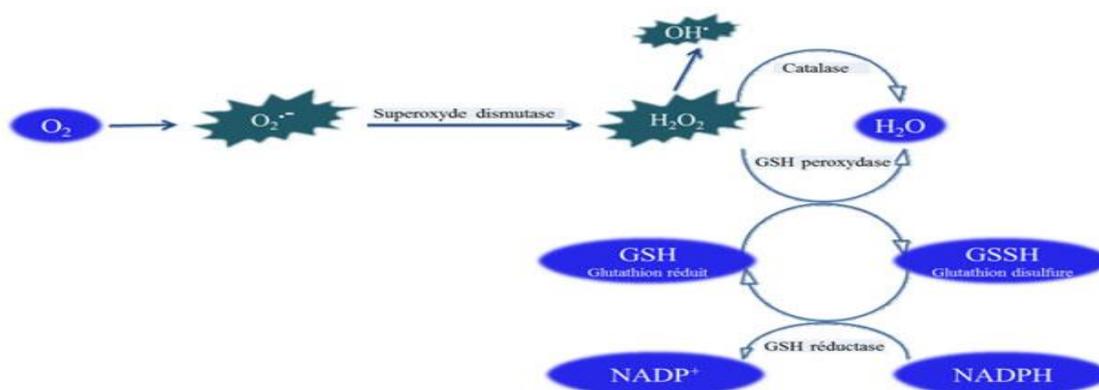


Figure 13. Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques (Blandine, 2006).

III.4.2. Antioxydants non enzymatiques

On trouve dans cette catégorie : les caroténoïdes et l'ubiquinol, la vitamine E, la vitamine C, le glutathion (GSH), l'acide urique, la bilirubine et l'acide alphasalicylique (Delattre et al., 2005).

III.4.2.1. La vitamine C

La vitamine C ou acide L-ascorbique est hydrosoluble. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires, dont elle est considérée comme le plus important antioxydant (Koolman et Röhm, 2004). Son action est directe et indirecte, elle agit directement sur les ERO (superoxydes, hydroxyle, oxygène singulet, radicaux lipidiques) et indirectement par son action de régénération de la vitamine E et du GSH (Duarte et al., 2007).

III.4.2.2. Le glutathion (GSH)

Est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. C'est le thiol intracellulaire ubiquiste le plus abondant. Sous l'action de la GPx, il désintoxique les ERO (H₂O₂, peroxy-nitrites, peroxydes lipidiques) en formant du GSSG (glutathion oxydé) composé de deux molécules de GSH (Douris et al., 2009). Il est détoxifiant au niveau hépatique et peut se lier aux métaux toxiques (Meister, 1991 ; Clarkson et Thompson, 2000 ; Lyn Patrick, 2006).

le glutathion est utilisé comme marqueur du système antioxydant et du stress oxydant, analysé par spectrophotométrie (De Moffarts et al., 2007).

III.4.2.3. Polyphénols

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (Delattre et al., 2005).

III.5. Les conséquences du stress oxydatif

Les radicaux libres sont responsables de dommages sur toutes les molécules biologiques comme les lipides, les protéines, les acides nucléiques, ou les hydrates de carbone (Favier, 2003).

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème

pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (Georgetti et al., 2003; Atawodi, 2005).

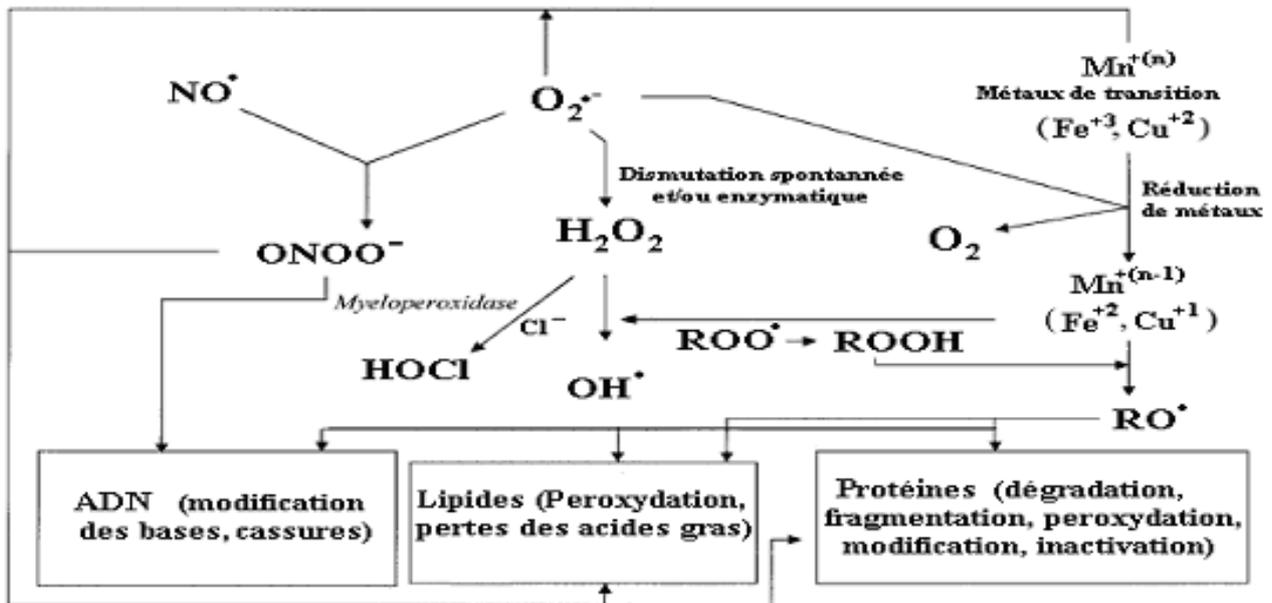


Figure 14. Cibles biologiques et endommagements oxydatifs induits par les EOR (Kohen et Nyska, 2002).

CHAPITRE IV

L'acétate de plomb

IV. Le plomb

IV.1. Propriétés physico-chimiques du plomb

IV.1.1. Propriétés physiques

Le plomb est un métal lourd de couleur gris bleuâtre, solide dans les conditions habituelles de température et de pression. Il est malléable, déformable, souple, Sa densité est de 11.35, il fond entre 325 et 335 °C et sa température d'ébullition est 1740 °C (Rekhila, 2003).

IV.1.2. Propriétés chimiques

Le symbole du plomb est Pb, son numéro atomique est de 82 et sa masse est de 207. Il présente une grande affinité pour le soufre et les divers composés soufrés. Il se fixe ainsi sur certains enzymes, qui possèdent le groupement SH ou il inhibe leur activité enzymatique (Rekhila, 2003).

IV.2. Les composés toxiques du plomb

Le tableau suivant représente les deux groupes des composés toxiques du plomb.

Tableau 05. Les composés inorganiques et organiques du plomb (Roy, 1977).

Les composés de plomb	Les noms des composés	Les formules chimiques
Inorganique	La litharge (monoxyde de plomb)	PbO
	Le bioxyde de plomb (oxyde pure)	PbO ₂
	Le minium (sesquioxyde de plomb)	Pb ₃ O ₄
	Le sulfure de plomb (galène)	PbS
	Le séléniure de plomb	PbSe
	Le sulfate de plomb	PbSO ₄
	Acétates de plomb	Pb(CH ₃ COO) ₂ Pb(CH ₃ COO) ₂ ·3H ₂ O
Organique	Le plomb tétraéthyle	Pb(C ₂ H ₅) ₄
	Le plomb tétraméthyle	Pb(CH ₃) ₄

IV.3. Les principales sources d'exposition au plomb

IV.3.1. Les sources d'exposition professionnelle

- **Traitement du minerai:** les minerais mixtes de plomb fournissent environ 80% de totalité des ressources de plomb (OMS, 1978).
- **La fusion et le raffinage du plomb:** sont obtenus à partir de concentrés (plomb primaire) soit récupérés à partir des déchets (plomb secondaire), la principale source étant les accumulateurs électrique 70%- 80% de la totalité des déchets (OMS, 1978).
- **La fabrication d'accumulateurs électriques:** fournissent environ 50% de totalité des ressources de plomb (OMS, 1978).
- **La préparation, l'application ou le grattage de peinture comportant des sels de plomb:** le minium, l'acétate de plomb était utilisé comme pigment dans des peintures (Timmins, 1972).
- **La fabrication de céramiques:** les vernis servant à leur décoration contiennent des sels de plomb (Catenacci et al., 1976).

IV.3.2. Les sources d'exposition non professionnelle

- **L'eau potable :** L'eau du robinet peut contenir du plomb. Cela peut être le cas des maisons où la tuyauterie comprend des soudures au plomb (Hagenoer et Furon, 1982).
- **Les aliments :** on trouve des traces de plomb dans presque tous les aliments. Le plomb dans l'air retourne dans le sol et est absorbé par les cultures. Il provient des procédés de stockage et de fabrication et des boissons alcoolisées (OMS, 1978).
- **L'air :** certaines industries métallurgiques, augmente la concentration du plomb dans l'air ambiant (Stren et al., 1989).

IV.4. Toxicocinétique

IV.4.1. L'absorption de plomb

Le plomb inorganique est essentiellement absorbé par l'appareil respiratoire et le tube digestif. Les études utilisant des isotopes (^{203}Pb ou ^{204}Pb) ont montré qu'environ 10 % du plomb ingéré sont absorbés, essentiellement dans l'intestin grêle, une partie du plomb absorbé pouvant subir un cycle entérohépatique (Hać et Krechniak, 1996). Toutefois chez l'enfant, l'absorption du plomb pourrait atteindre 50 % (Taylor, 1986). L'absorption de plomb est en fait variable avec l'alimentation. Elle est augmentée au cours du jeûne, des régimes pauvres

en protéines ou riches en graisses (Winship, 1989). A l'inverse, des régimes enrichis en calcium et en phosphate diminuent son absorption (Quaterman et Morrison, 1978).

L'absorption par voie pulmonaire dépend de la taille des particules (Taylor, 1986; Garnier et Poupon, 2004). Le pourcentage de plomb ainsi absorbé dépend de leur solubilité, et de la fréquence respiratoire (Rendall et al., 1975). Globalement, on estime qu'environ un tiers du plomb est absorbé par inhalation, l'absorption pouvant atteindre 70 % sous l'effet de la température. Le plomb inorganique ne franchit pas la barrière cutanée saine (Taylor, 1986).

IV.4.2. La distribution de plomb

La distribution est schématiquement tricompartimentale :

Le premier compartiment, comprenant le pool sanguin et des tissus directement en équilibre avec celui-ci, possède une demi-vie de 35 jours.

Le second compartiment est formé des tissus mous et possède lui aussi une demi-vie mais un peu plus longue (40 jours).

Troisième compartiment, il correspond au plomb lié à l'os et se distingue par une demi-vie très longue (10 à 20 ans) (Kaminsky et al., 1993).

La fixation du plomb dans le tissu osseux dépend de l'environnement hormonal et nutritionnel. Au total, 95 % du stock de plomb est contenu dans les os. Cette concentration augmente progressivement avec l'âge (Barry, 1975). Dans le sang, le plomb est fixé pour 95 % aux globules rouges, probablement du fait de son affinité pour les groupements thiols membranaires. Comme sa demi-vie est courte, le plomb sanguin reflète la quantité de plomb absorbée, et quand il y a excès il s'accumule et devient toxique (Lauwerys et al., 1978).

IV.4.3. L'élimination de plomb

La voie d'excrétion principale est le rein. La concentration urinaire est proportionnelle au plomb plasmatique, de sorte que la quantité de plomb filtrée reste faible puisque l'énorme majorité du plomb sanguin est fixée aux hématies (Bismuth, 2000). La quantité de plomb contenue dans les fèces reflète plus le plomb non absorbé par l'intestin que le plomb excrété par voie biliaire (Rabinowitz, 1978).

IV.5. L'intoxication du plomb

IV.5.1. L'intoxication aiguë

L'intoxication aiguë par le plomb est rare. Elle est en effet secondaire à une ingestion massive ou l'administration parentérale d'un dérivé inorganique et s'accompagne généralement des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée) les troubles neurologiques. Elle ne doit pas être confondue avec les manifestations aiguës de l'intoxication chronique (Garnier, 2005; Viala et Botta, 2005).

IV.5.2. L'intoxication chronique

C'est l'exposition répétée au plomb qui associe diversement les troubles cliniques et biologiques suivant: les syndromes abdominal, l'encéphalopathie, les neuropathies périphériques, les atteintes rénales, les hypertensions artérielle, les effets hématologiques, le cancer (Garnier, 2005; Viala et Botta, 2005).

IV.6. Le mécanisme d'action de plomb

Le plomb inactive divers systèmes enzymatiques par fixation sur les groupes SH ou par déplacement d'autres métaux, d'où la diversité de ses effets. A dose d'exposition faible mais prolongée, ils portent essentiellement sur l'érythropoïèse (anémie) et l'hémoglobinogénèse (inhibition de la synthèse de l'hème), le système nerveux (déficits neuropsychiques) et la pression sanguine (hypertension).

Au plan hématologique, le plomb agit au niveau de trois systèmes enzymatiques de la biosynthèse de l'hème (ALA synthétase, ALA déhydrase et ferrochélatase), entraînant en particulier une accumulation d'ALA (acide delta-amino levulinique) dans le sang et l'urine et une augmentation des protoporphyrines érythrocytaires (Danel, 1997).

IV.7. Les effets toxiques de plomb

Le plomb exerce ses effets toxiques dans la cellule selon plusieurs mécanismes: interaction avec de nombreuses protéines par l'intermédiaire de leurs groupements thiols et inhibition de l'initiation de la synthèse protéique au niveau des ribosomes.

IV.7.1. L'effet de plomb sur la synthèse de l'hème

L'hème est synthétisé à partir de succinyl-CoA et de glycine au terme de huit réactions enzymatiques.

Les précurseurs des porphyrines, δ-aminolévulinate (ALA) et porphobilinogène (PBG) sont d'abord formés, puis les porphyrinogènes et porphyrines et, enfin, l'hème par incorporation de fer (Fe²⁺) dans la protoporphyrine IX (Bergdahl et al., 1997b).

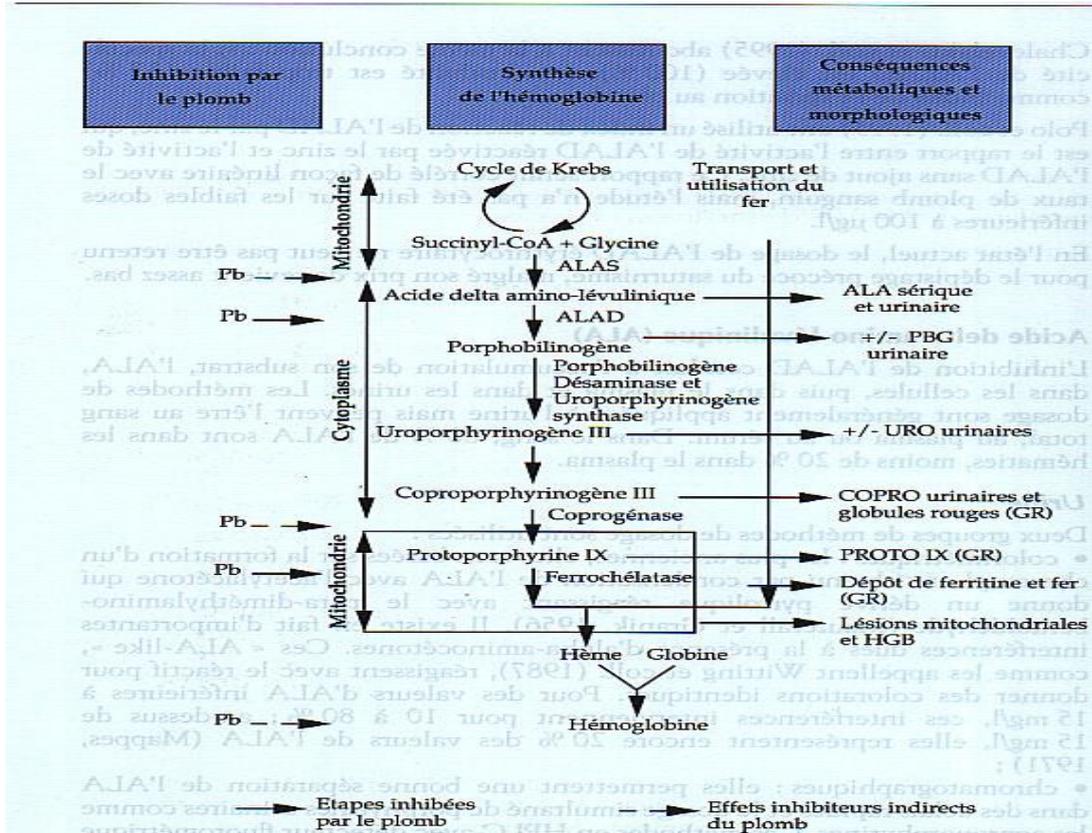


Figure 15. L'action du plomb sur la biosynthèse de l'hème (Bonsignore et al., 1970).

IV.7.1.1. Acide delta-amino-lévulinique déshydratase (ALAD) érythrocytaire :

L'ALAD catalyse la condensation de deux molécules d'acide delta-aminolévulinique pour former une molécule de porphobilinogène (PBG). Elle est très sensible aux métaux (Pb, Cd, Hg) (Bonsignore et al., 1965; Niosh, 1980; Luo et al., 1996).

L'inhibition de l'ALAD entraîne une accumulation d'ALA dans le plasma et une excretion urinaire augmentée de ce composé (Chisolm et al., 1985).

IV.7.1.2. La ferrochélatase

Cette enzyme est capable de former différentes métalloporphyrines en utilisant comme substrat Fe^{2+} (hème), Co^{2+} (Co-protoporphyrine IX) et Zn^{2+} (Zn- protoporphyrine IX).

L'inhibition de l'enzyme par Pb^{2+} et la non disponibilité de Fe^{2+} aboutit à l'accumulation de zinc-protoporphyrine IX (ZPP), caractéristique de l'intoxication chronique (Jover et al., 1996).

L'administration d'ALA déclenche un stress oxydatif au niveau du foie, du cerveau et des muscles, qui s'accompagne d'une augmentation de la capacité antioxydant du plasma (Demasi et al., 1997). Cette activité pro-oxydante d'ALA a été mise en évidence au niveau des lipides, des protéines, de l'ADN et des mitochondries (Hermes-Lima, 1995).

IV.7.2. L'effet de plomb sur le foie

La cytolysse hépatique est un signe d'intoxication aiguë par le plomb. Elle ne s'observe qu'après des contaminations massives. Le plomb inhibe la synthèse des hémoprotéines, et en particulier celle cytochrome P450, ce qui peut être à l'origine d'interactions médicamenteuses et d'effets toxiques d'autres substances (Lauwerys et hoet, 2001).

IV.7.3. L'effet de plomb sur les reins

Une tubulopathie proximale qui s'observe en cas de contamination importante, correspondant à une plombémie dépassant généralement $700 \mu\text{g/L}$. Elle se traduit par une fuite protéines de faibles poids moléculaires.

Une atteinte rénale tardive qui s'observe après 10 à 30 ans d'exposition, à des niveaux d'imprégnation correspondant à une plombémie supérieure à $600 \mu\text{g/L}$. C'est une insuffisance rénale modérée due à des lésions glomérulaires et tubulo-interstitielles sans caractère spécifique, elle est définitive (Cramer, 1974).

PARTIE 02

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I

Matériel et méthodes

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétale

Il est constitué des écorces des racines du *Zizyphus lotus* (**Figure16**), récoltés des régions de Mila (Ain Tinne) en Février 2016. Les écorces des racines ont été séchées à l'ombre à l'abri de la lumière, à température ambiante.



Figure 16. Les racines des *Zizyphus lotus*

Après séchage, les écorces des racines ont été broyées pour obtenir une poudre fine, qui a servi pour la préparation des différents extraits.

I.2. Méthodes

I.2.1. Préparation des extraits MET et AQ à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus*

Selon la méthode de Bougandoura et Bendimerad (2012) modifié, deux types d'extraits ont été préparés à partir des écorces pulvérisés.

➤ **Extrait méthanolique**

Une prise d'essais de 50 g de poudre des écorces des racines a été mise à macérer dans 500 ml de méthanol absolu sous agitation magnétique pendant 24 heures.

Après filtration, l'extrait à été évaporé à sec sous pression réduite à 45°C au Rotavapor (Bougandoura et Bendimerad, 2012).

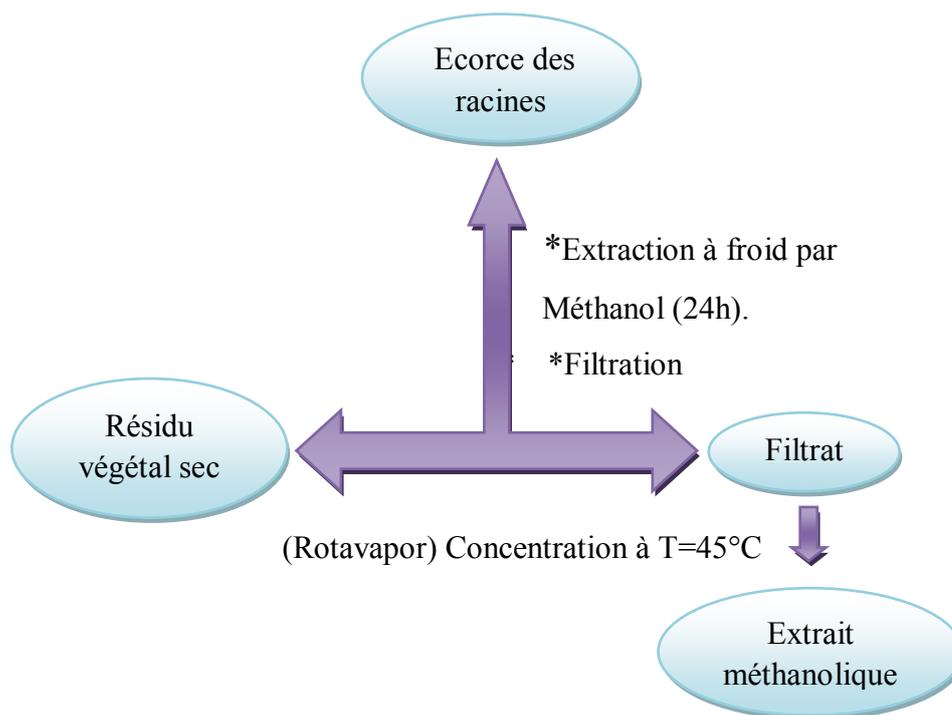


Figure 17. Différentes étapes de préparation de l'extrait Méthanolique.

➤ Extrait aqueux

Une macération aqueuse a également été effectuée sur 50 g de poudre des écorce des racine du *Zizyphus lotus* avec 500 ml d'eau distillée et placés sous agitation pendant 24 h.

Après filtration, l'extrait a été lyophilisé par le lyophilisateur (Bougandoura et Bendimerad, 2012).

• Le Lyophilisateur

La lyophilisation permet par un processus de sublimation d'extraire l'eau d'un produit préalablement congelé. Le procédé a lieu sous vide avec une température du produit inférieure à -10°C (Delphine, 2008).



Figure 18. Le Lyophilisateur (Université mentourie Constantine1(2016))

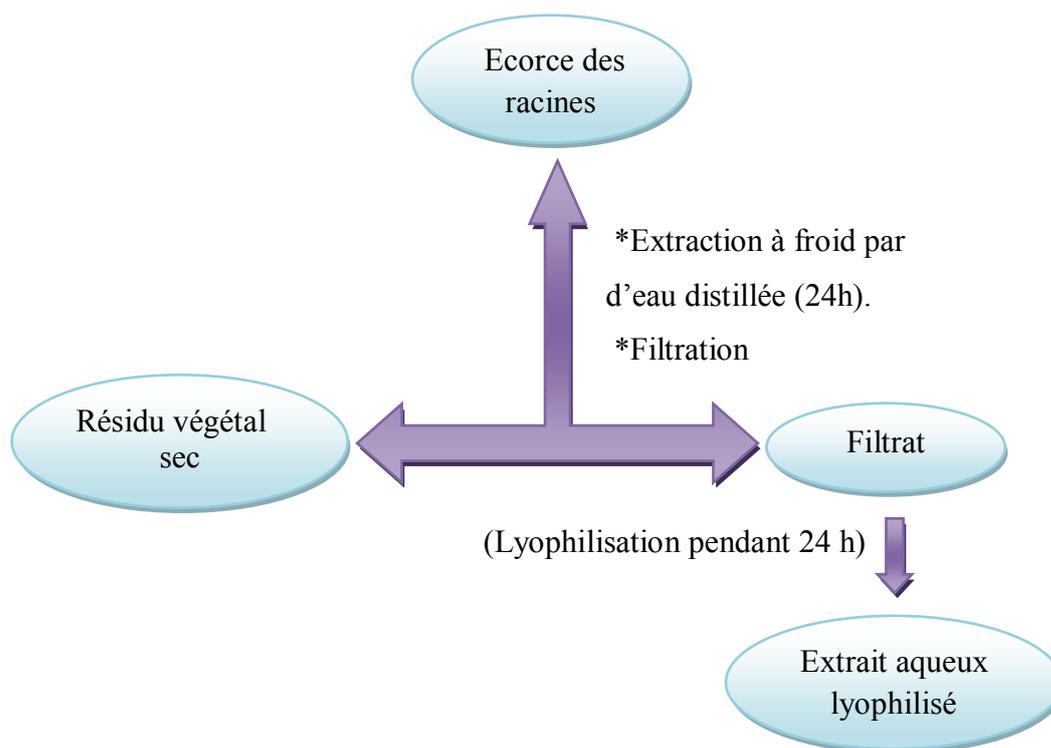


Figure 19. Différentes étapes de préparation de l'extrait Aqueux.

I.2.2. Analyse des extraits MET et AQ des écorces des racines du *Zizyphus lotus*

I.2.2.1. Analyse qualitative des extraits MET et AQ

I.2.2.1.1. Tests préliminaires

I.2.2.1.1.1. Test des composés phénoliques

L'extrait (0,1 g) a été dissout dans 3 ml d'éthanol et 5 gouttes de FeCl_3 y ont été ajoutées. Le développement de la coloration verdâtre a indiqué la présence des phénols. La présence des composés phénoliques a été marquée par l'apparition de la coloration bleue-verdâtre (Rosine et Momo ,2009).

I.2.2.1.1.2. Caractérisation des Flavonoïdes

A 3ml de l'extrait (2mg/ml), on ajoute 5ml d'HCl (acide chlorhydrique), puis quelques morceaux du magnésium. En présence de flavonoïdes, une couleur orange est apparue (Ciulel, 1982).

I.2.2.1.1.3. Caractérisation des Tanins

L'ajout de trichlorure du fer (FeCl_3)1%, permet de détecter la présence ou non des tanins. La couleur vire au bleu noir en présence des tanins galliques, et au bleu verdâtre en présence des tanins catéchiques (tanins condensés) (Dohou et al., 2003).

I.2.2.1.1.4. Différentiation des tanins

Pour identifier le type des tanins (tanins condensés, tanins hydrolysables), on procède la méthode suivante :

- **Précipitation par le réactif de Stiasny**

A 15 ml de l'extrait, on ajoute 8ml de réactif de Stiasny (formaldéhyde à 30% ; 2 volumes + HCl concentré ; 1 volume), on chauffe le mélange au bain-marie à ébullition pendant 30min.

On note la présence de précipités, donc la présence des tanins condensés. On filtre, puis au filtrat on ajoute l'acétate de sodium jusqu'à saturation. Ensuite on met quelques gouttes de FeCl_3 à 2%. On obtient une coloration bleu-noire, donc la présence des tanins hydrolysables (Mamadou, 2002).

I.2.2.1.2. Chromatographie sur couche mince

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

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

L'analyse de l'extrait polaires MET et AQ est effectuée par un système de séparation BAW (butanol/acide acétique/eau) avec des proportions (60/15/35).

5 μl d'extrait (10mg/ml) et des standards quercétine, catéchine, naringénine, acide gallique et la rutine (2mg/ml) sont déposés et la plaque est ensuite introduite dans la chambre de migration préalablement saturée par la vapeur de la phase mobile. Après migration, les plaques sont séchées, puis visualisées par les systèmes de révélation :

- Révélation physique sous UV à 254nm.
- Révélation chimique par une solution de l'acide sulfurique 50ml/eau 50ml.

Les rapports frontaux (RF) des spots issus de la séparation sont calculés (le rapport frontal est le rapport entre la distance parcourue par la tache et celle du solvant).

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant (centre de la tache)}}{\text{Distance parcourue par l'eluant}}$$

I.2.2.2. Analyse quantitative des extraits MET et AQ

I.2.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extrait d'écorces des racines est effectué selon la méthode de Folin ciocalteu (Wong et al., 2006). Le réactif précédent est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), il réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Boizot et Charpentier, 2006).

Brièvement, 200 μ l de l'extrait (4mg/ml) est ajouté à 1 ml du réactif de Folin Ciocalteu (dilué 10 fois par l'eau distillée).

Après 4 min, 800 μ l de Na_2CO_3 (75g/l) sont ajoutés, après agitation, l'ensemble est incubés à l'ombre pendant 2 heures. L'absorbance est lue à 765nm par un spectrophotomètre.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-200 μ g /ml). Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par un milligramme de l'extrait (μ g Eq AG/mg d'extrait).

I.2.2.2.2. Dosage des Flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les deux extraits (MET et AQ). 1ml l'échantillon et du standard (préparé dans le méthanol pour l'extrait MET et dans le l'eau distille pour l'extrait AQ) est ajouté à 1ml de la solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol).

Après 10 min, les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-35 μ g/ml) et sont exprimées en microgramme d'équivalent de quercétine par miligramme d'extrait (μ g EQ/mg d'extrait).

I.2.2.2.3. Dosage des tanins condensés

Le dosage des tanins condensés dans l'extrait du *Zizyphus lotus* est effectué selon la méthode de Broadhurst et Jones (1978), modifiée par Heimler et al (2006). Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du

cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm (Schofield et al., 2001).

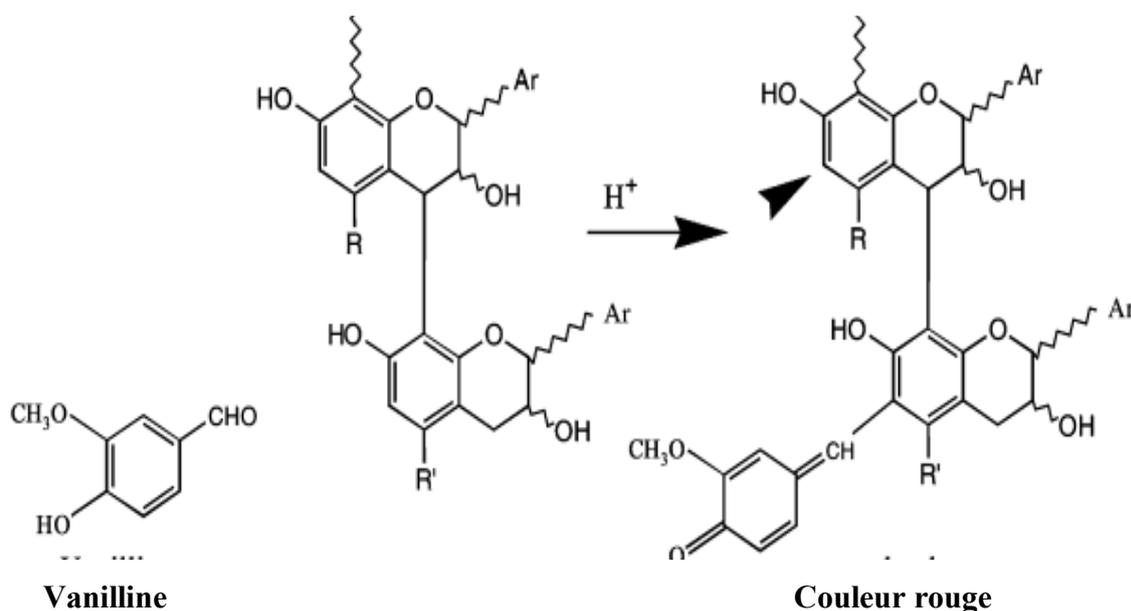


Figure 20. La réaction entre la vanilline est les tanins condensés (Schofield et al., 2001)

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

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

I.2.2.3. Activités biologiques

I.2.2.3.1. Activité antioxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium

Le test du pouvoir réducteur du molybdate phosphate est un essai direct qu'on emploie principalement pour mesurer la puissance des antioxydants non enzymatiques. Il repose sur la réduction des molybdates en molybdène en présence des extraits en donnant une coloration bleu détectable par le visible à une longueur d'onde de 765nm (Prieto et al., 1999).

L'activité anti-oxydante des extraits est évaluée par le phosphomolybdate. Une aliquote de 0,1 ml de chaque dilution (0,625; 1,25; 2,5; 5mg/ml) d'extrait (dissous dans un solvant respectif) ont été combinés dans un flacon avec 1 ml de solution de réactif (acide sulfurique

0,6 M, phosphate de sodium 28 mM et 4 mM de molybdate d'ammonium). Le flacon a été bouché et mis en incubation dans un bain d'eau à 95 ° C pendant 90 min. Après l'incubation, les échantillons ont été refroidis à la température ambiante, et l'absorbance du mélange a été mesurée à 765 nm contre un blanc (Prieto et al., 2005). Afin d'estimer l'activité antioxydante par milligramme équivalent acide ascorbique (mg Eq AA) une courbe d'étalonnage a été réalisée par l'acide ascorbique (0.125-0.75mg/ml).

I.3. Matériel biologique et condition d'élevage

Il utilise 16 rattes blanches de la souche *Wistar*, provenant de l'institut pasteur d'Alger. Ages de 8-9 semaines, d'un poids vif moyen de (180 g). Ce sont des mammifères de l'ordre des rongeurs, largement utilisés dans divers domaines de recherche. Ces rats ont été soumis à une période d'adaptation d'un mois environ, aux conditions de l'animalerie; à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et une photopériode naturelle.

Les rats sont élevés dans des cages en plastique qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Ils ont été nourris avec un concentré énergétiquement équilibré, dont la composition est détaillée dans le tableau.

Tableau 06. Composition de l'alimentation pour 1 kilogramme d'aliment (Upreti et al., 1989).

Matière alimentaire	Quantité en g/kg d'aliment	Pourcentage (%)
Amidon (Mais)	420	42
Saccharose	210	21
Huile	20	2
Soja	260	26
Son	60	6
CMV	30	3

I.4. Traitement des rattes

Les rattes ont été répartis en 4 lots de 4 rattes chacun, il s'agit de :

- ✓ **Lots 1** : rattes témoins ont reçu une eau physiologique par injection intra- péritonéale chaque jour pendant 8 jours.
- ✓ **Lots 2**: rattes traités par l'extrait Méthanolique dissout dans l'eau distillée à une dose de (200mg/kg) par gavage à l'aide d'une sonde gastrique chaque jour pendant 8 jours.
- ✓ **Lots 3** : rattes traités par la combinaison entre l'extrait Méthanolique dissout dans l'eau distillée à une dose de (200 mg/kg) par gavage à l'aide d'une sonde gastrique et l'acétate de plomb à une dose de (50 mg/kg) par injection intra- péritonéale chaque jour pendant 8 jours.
- ✓ **Lots 4** : rattes traités par l'acétate de plomb à une dose de (50 mg/kg) par injection intra- péritonéale chaque jour pendant 8 jours.



Figure 21. Méthode de gavage et l'injection intra péritonéal chez la ratte

I.5. Prélèvement sanguin

A la fin de période de traitement et au 9^{ème} jour en effectués un prélèvement oculaire (Fig 22) pour chaque ratte avec manipulation douce et calme de l'animale afin de ne pas trop l'exciter ni l'effrayer.

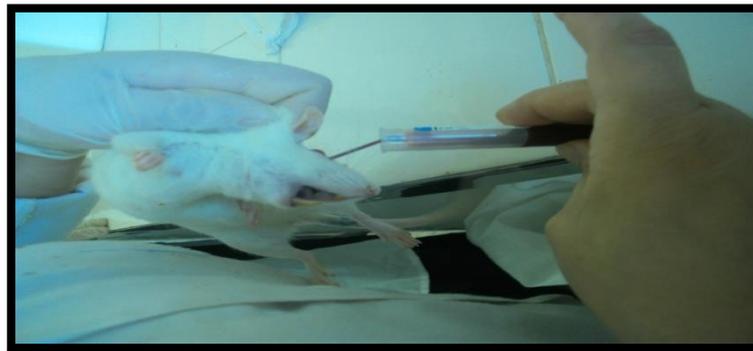


Figure 22. Méthode de prélèvement de sang par ponction du sinus rétro-orbitale.

La sinus veineux rétro-orbitale est ponctionné à l'aide d'un tube capillaire d'hématocrite introduire dans l'angle (30°) à l'intérieure de l'œil, par pression rotatives, la fragile paroi des vaisseaux est perforée et le sang prélève par capillarité est immédiatement recueilli dans des tubes héparines, Ces dernier sont centrifugé à 3000 tours /min pendant 10 min, Le sérum obtenu est séparé en plusieurs aliquotes dans des tubes Eppendorf puis stockés au congélateur à -8°C jusqu'aux dosages biochimiques.

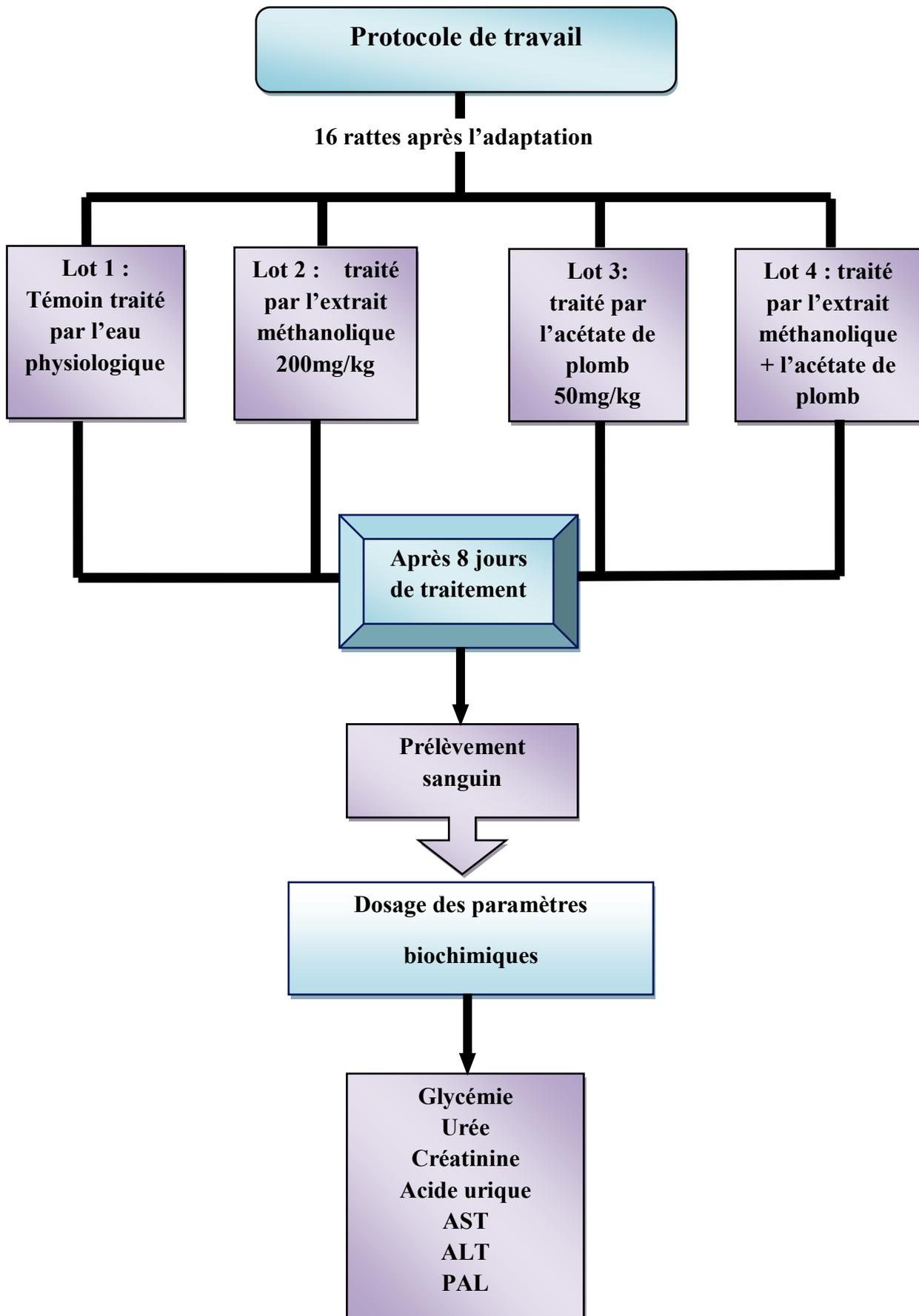


Figure 23. Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

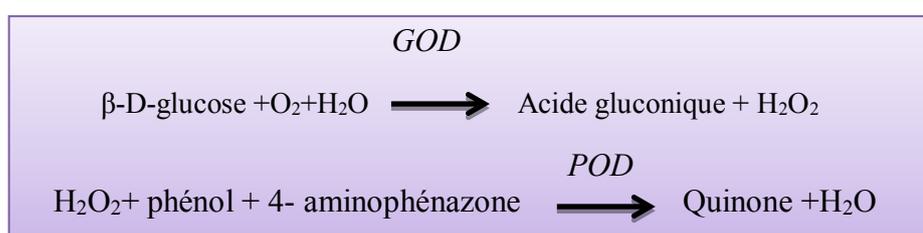
I.6. Dosage des paramètres biochimiques

I.6.1. Dosage du glucose

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

- **Principe**

Le glucose est transformé par le glucose oxydase (GOD) en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier, en présence de peroxydase (POD), oxyde le chromogène incolore (4-aminophénazone) en un composé coloré en rouge-violet (quinoneimine).



- **Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

Mélanger, incuber pendant 10 min à 37 C°, ou 15-20 min à la température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

- **Calcul de la concentration**

$$\text{Glucose (mg/dl)} = \frac{\text{DO Echantillon}}{\text{DO Etalon}} \times \text{C Etalon (100mg/dl)}$$

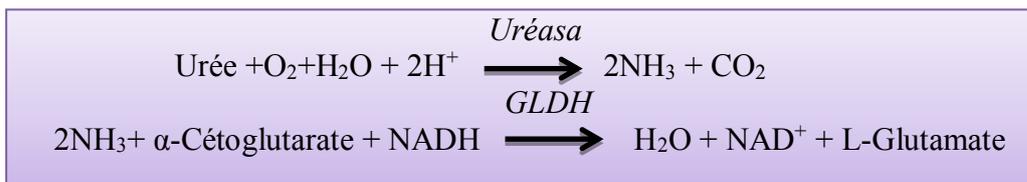
I.6.2. Dosage de l'urée

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

- **Principe**

L'uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée, présente dans l'échantillon, en ammoniac (NH₃) et en anhydride carbonique (CO₂). L'ammoniac formé est incorporé à l'alpha-cétoglutarate par

l'action du glutamate déshydrogénase (GLDH) avec oxydation parallèle de la NADH à la NAD⁺ :



La diminution de la concentration de NADH est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon.

• **Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1	1	1
Etalon (µl)	-	10	-
Echantillon (µl)	-	-	10

Mélanger, Lire les densités optiques de l'échantillon et de l'étalon après 30 secondes (DO1) et après 90 secondes (DO2) à 340 nm.

• **Calcul de la concentration**

$$\text{Urée (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{DO Echantillon}}{\text{DO Etalon}} \times \text{C Etalon (50 mg/dl)}$$

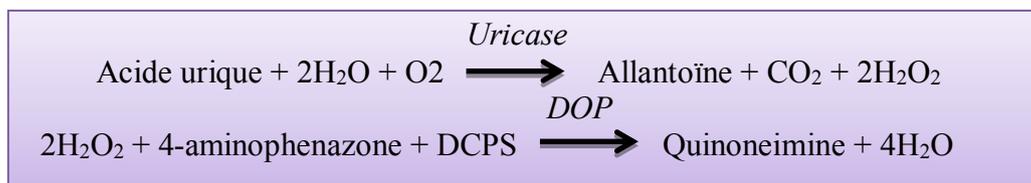
$$\Delta \text{DO} = (\text{DO 2} - \text{DO 1}).$$

I.6.3. Dosage de l'acide urique

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

• **Principe**

L'acide urique est oxydé par l'uricase à l'allantoïne et le peroxyde d'hydrogène (2H₂O₂) qui, en présence de la peroxydase (POD), 4- aminophénazone (4-AF) et du 2-4 Dichlorophénol-sulphonate (DCPS) forme un composé rosacé:



- **Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1	1	1
Etalon (µl)	-	25	-
Echantillon (µl)	-	-	25

Mélanger, incuber 10 min à 15-20°C ou alors 5 min à 37°C.

Lire l'absorbance (A) de l'étalon et des échantillons à 520 nm. La couleur est stable 30 min.

Calcul la concentration

$$\text{Acide urique (mg/dl)} = \frac{\text{DO Echantillon}}{\text{DO Etalon}} \times \text{C Etalon (6mg/dl)}$$

I.6.4. Dosage de la créatinine

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

- **Principe**

L'essai est basé sur la réaction de la créatinine avec le picrate sodium : c'est la réaction de JAFFE. La créatinine réagit avec le picrate alcalin pour donner un complexe coloré, mesuré dans un intervalle de temps défini et proportionnel à la concentration en créatinine de l'échantillon.

- **Mode opératoire**

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	-	100	-
Echantillon (µl)	-	-	100

Mélanger, déclencher le chronomètre. Lire à 492 nm la densité optique (DO1) après 30 secondes et la densité optique (DO2) après 90 secondes.

- **Calcul de La concentration**

$$\text{Créatinine (mg/dl)} = \frac{\Delta \text{DO Echantillon} - \Delta \text{DO blanc}}{\text{DO Etalon} - \Delta \text{DO blanc}} \times \text{C Etalon (2mg/dl)}$$

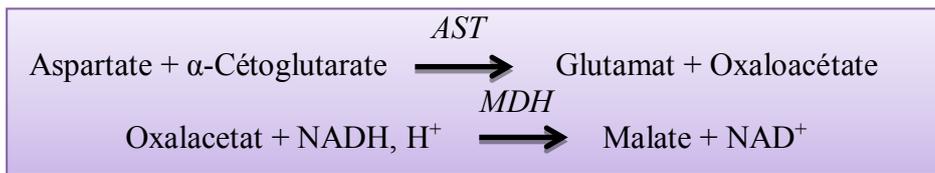
$$\Delta \text{DO} = (\text{DO 2} - \text{DO 1})$$

I.6.5. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT/ TGO)

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

• **Principe**

L'aspartate aminotransférase (ASAT) appelée aussi l'oxaloacétate de glutamate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H^+ :



Le taux de diminution de la concentration de NADH est proportionnelle à la concentration catalytique de la AST.

• **Mode opératoire**

Température °C	37 °C
Réactif de travail (ml)	1
Echantillon (µl)	100

Mélanger et incuber les préparations pendant 1 min à la température de 37 °C et lire l'absorbance à 340 nm, toutes les minutes pendant 3 min.

• **Calcul de La concentration**

$$\text{ASAT (UI/L)} = \Delta \text{ DO/min} \times 1750$$

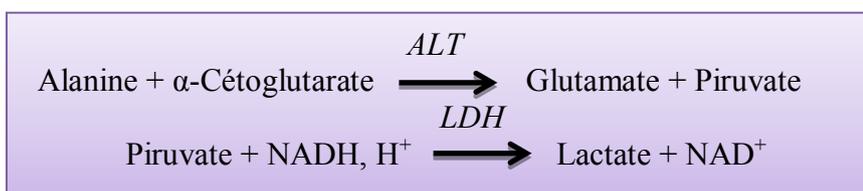
Δ DO c'est la valeur moyenne des trois lectures.

I.6.6. Dosage de l'alaline aminotransférase (ALAT/TGP)

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

• **Principe**

Le principe est présenté par le schéma réactionnel suivant :



Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité de l'alanine aminotransférase présenté dans l'échantillon.

- **Mode opératoire**

Température	37 °C
Réactif du travail (ml)	1
Echantillon (µl)	100

Mélanger, incuber pendant une minute à température ambiante et lire l'absorbance initiale à 340 nm. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 min. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (Δ Abs/min) pour l'utiliser dans les calculs.

- **Calcul de La concentration**

$$\text{TGP (U/L)} = \Delta \text{ DO} \times 1750$$

Δ DO c'est la valeur moyenne des trois lectures.

I.6.7. Dosage de l'alkaline phosphatase (PAL)

Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé des coffrets (Spinreact).

- **Principe**

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à ph 10.4 pour donner le p-nitrophénol et la phosphate :



Le taux de l'augmentation de nitrophenol et proportionnelle à la concentration de l'activité catalytique de PAL.

- **Mode opératoire**

Température	37 °C
Réactif de travail (µl)	1.2
Echantillon	20

Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 405 nm l'absorbance initiale et démarrer le chronometer simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 min. Déterminer la moyenne des absorbances par minutes (Δ Abs/min) pour l'utiliser dans les calculs.

- **Calcul de La concentration**

$$\text{PAL (U/L)} = \Delta \text{DO} \times 3300$$

ΔDO c'est la valeur moyenne des trois lectures.

I.7. Analyses statistique

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD. Sont effectués par le logiciel (Graph Pad Prism V 5,00).

La différence entre l'extrait et le contrôle et la détermination des taux de signification sont effectués par test ANOVA suivi du test Tukey et test t de student.

CHAPITRE II

Résultats et discussions

II.1. Préparation des extraits MET et AQ à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus*

La préparation de l'extrait aqueux à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus* a été effectuée selon la méthode Boughandoura et Bendimerad (2012) modifiée. Cette méthode est basée sur l'utilisation de solvant polaire (eau, méthanol).

La couleur et l'aspect des extraits obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 07. Aspect et couleur de l'extrait AQ et MET des écorces des racines du *Zizyphus lotus*

Extrait	Aspect	Couleur
AQ	Poudre	Marron claire
MET	Poudre	Marron foncé

II.2. Analyse des extraits MET et AQ des écorces des racines du *Zizyphus lotus*

II.2.1. Analyse qualitative des extraits MET et AQ

II.2.1.1. Tests préliminaires

Le tableau ci-dessous représente les différents tests de caractérisation de quelques métabolites secondaires dans l'extrait Aqueux : polyphénols, flavonoïdes, tanins.

Tableau 08. Résultats des tests préliminaires de quelque métabolite secondaire des extraits Méthanolique et Aqueux du *Zizyphus lotus*.

Métabolite testé	Remarques	Résultats	
		AQ	MET
Composés phénoliques	Couleur Bleu verdâtre	+++	+++
Flavonoïde	Couleur Orange	++	++
Tanins	Couleur Bleu verdâtre	+	+
Tanins condensés	Formation de précipité	+	+
Tanins hydrolysables	Couleur Bleu noir	+	-

+ Présence, +++ présence plus importantes.

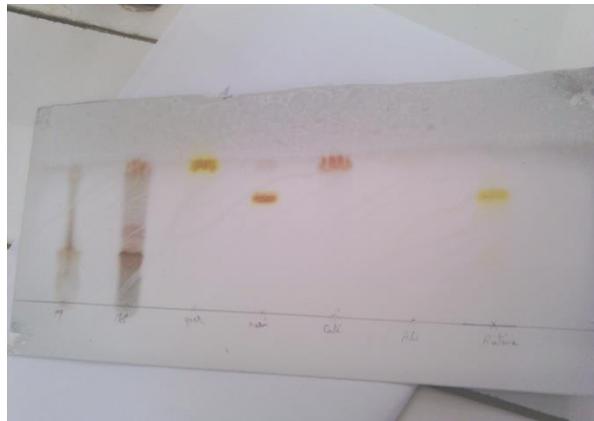
Les essais phytochimiques effectués sur l'extrait (MET et AQ) des écorces des racines de *Zizyphus lotus* ont révélé la présence des flavonoïdes, dont la couleur orange désigne la présence des flavonoïdes de type flavones.

L'appariation de la couleur bleu verdâtre (test de FeCl_3) reflète la présence des tanins catéchiques (condensés) dans les deux extraits. Pour la séparation entre les deux types des tanins (tanins condensés et tanins hydrolysables), le test Stiasny a été réalisé dont les résultats confirment la présence des tanins condensés et montre la présence des tanins hydrolysables dans l'extrait aqueux et leur absence dans l'extrait méthanolique.

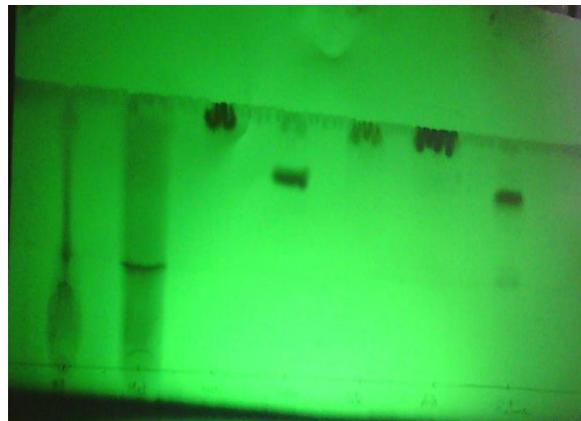
Tous ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Borgi et al. (2007) où l'analyse phytochimique faite sur l'extrait méthanolique et aqueux des écorces des racines a donné des résultats positifs pour les flavonoïdes et les tanins.

II.2.1.2. Chromatographie sur couche mince

Pour une caractérisation partielle de l'extrait Méthanolique et Aqueux du *Zizyphus lotus*, une chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée par l'utilisation de système de migration (BAW) butanol-acide acétique- eau (60/15/35).



Révélation par acide sulfurique/eau



Révélation UV 254 nm

Figure 24. Chromatographie sur couche mince des extraits Méthanolique et Aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus* (de gauche à droite : AQ; MET; Q; Na; C; Ag; R).

Tableau 09. Rapports frontaux et couleurs après révélation.

Standard	RF	Couleur après révélation	
		Acide sulfurique /eau	Lamp UV 254nm
Quercétine	0.742	Orange	Sombre
Naringine	0.6	Jaune	Sombre
Cathéchine	0.785	Orange	Sombre
Acide gallique	0.785	Orange	Sombre
Rutine	0.628	Jaune	Sombre
Extrait AQ	0.3	Marron	Sombre
	0.628	Jaune	Sombre
Extrait MET	0.285	Orange	Sombre
	0.742	Orange	Sombre

Après révélation, deux tâches sont détectées pour l'extrait MET et AQ, elles sont avérées par la révélation chimique (l'acide sulfurique /eau).

Pour l'extrait MET l'une des taches est correspondre à la quercétine avec un RF=0.742. D'ailleurs pour l'extrait AQ aussi une seule tache est apparue et correspond à la rutine avec RF=0.628.

II.2.2. Analyse quantitative des extraits MET et AQ

Afin de caractériser l'extrait méthanolique et aqueux préparés à partir des écorces des racines du *Zizyphus lotus*, un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins a été effectué.

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

La méthode du dosage des polyphénols totaux est celle de Folin–Ciocalteu (Wong et al., 2006). L'acide gallique a été utilisé comme standard. Pour les flavonoïdes le dosage a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1997) ,en utilisant comme standard la quercétine, enfin celui des tanins condensés a été effectué selon la méthode de vanilline (Broadhurst et Jones, 1978), modifiée par Heimler et al. (2006), en utilisant la catéchine comme standard. Les résultats sont représentés dans le (**tableau 10**) et le diagramme **figure 25**. Les gammes d'étalonnage dans les **figures 26 ; 27 ; 28**.

Tableau 10. Teneur des composés phénoliques

Extrait	Polyphénols ^(a)	Flavonoïdes ^(b)	Tanins ^(c)
MET	48.54 ± 3.514	3.710 ± 0.555	0.063 ± 0.046
AQ	45.19 ± 0.396	6.786 ± 0.041	0.190 ± 0.003

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

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

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

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures ± SD.

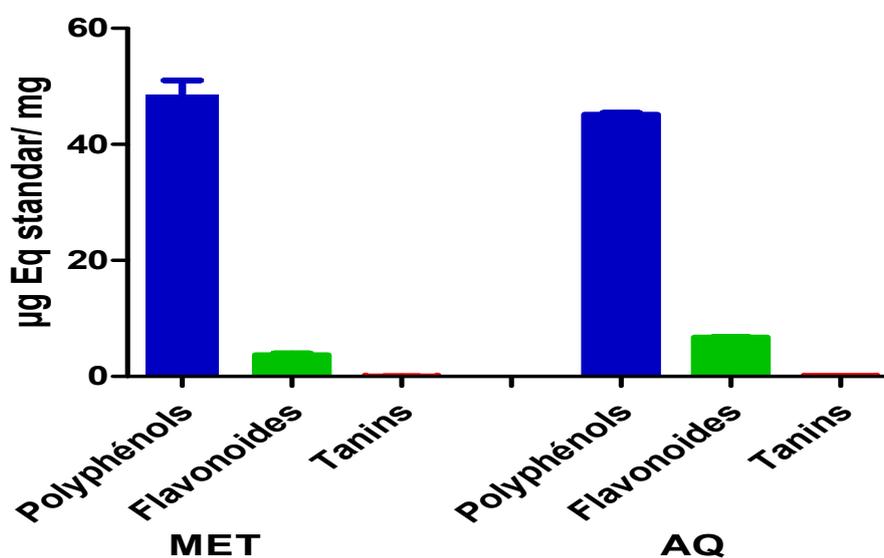


Figure 25. Teneur des composés phénoliques, flavonoïdes, tanins en µg Eq standard/ mg d'extrait.

Les résultats de dosage montrent la présence des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins condensés dans l'extrait méthanolique et aqueux.

La comparaison entre la teneur en polyphénols de l'extrait MET et AQ montre que l'extrait MET est plus riche en polyphénols, mais avec une différence non significative.

Par contre pour les flavonoïdes, il y a une différence très hautement significative ($p \leq 0.001$) entre les deux extraits dont l'extrait AQ est le plus riche en flavonoïdes.

Pour les tanins l'extrait AQ est plus riche par comparaison avec l'extrait MET avec une différence hautement significative ($p \leq 0.01$).

Par comparaison avec d'étude faite par Bakchiche et al., (2013) sur le dosage des polyphénols dans la partie aérienne de *Zizyphus lotus* (36.30ug Eq AG/mg), l'écorce des racines apparait plus riche en polyphénols (48.54 μg EqAG/mg).

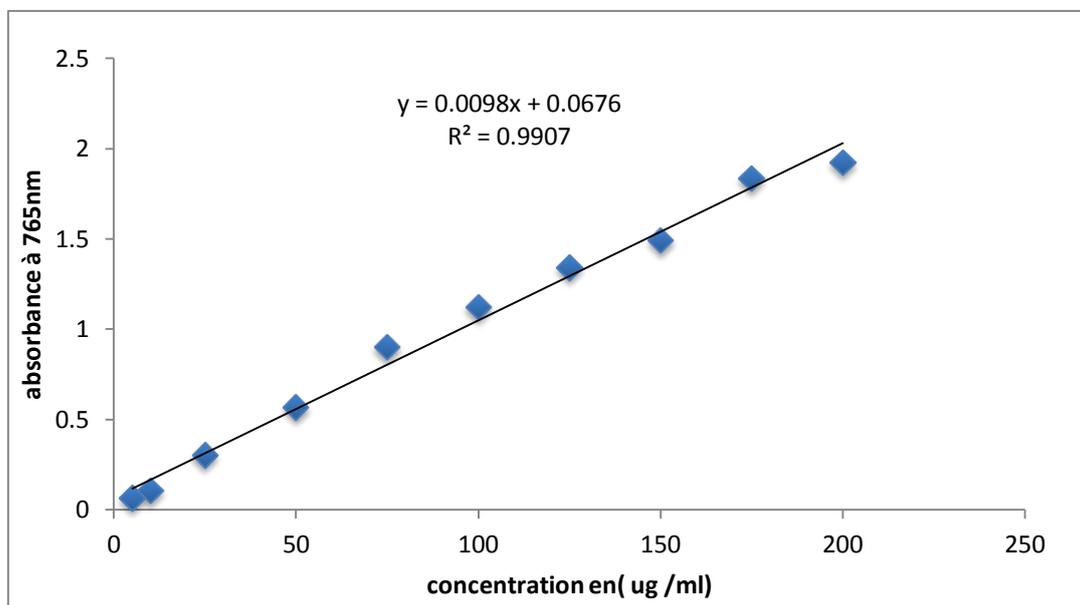


Figure 26. Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de deux essais)

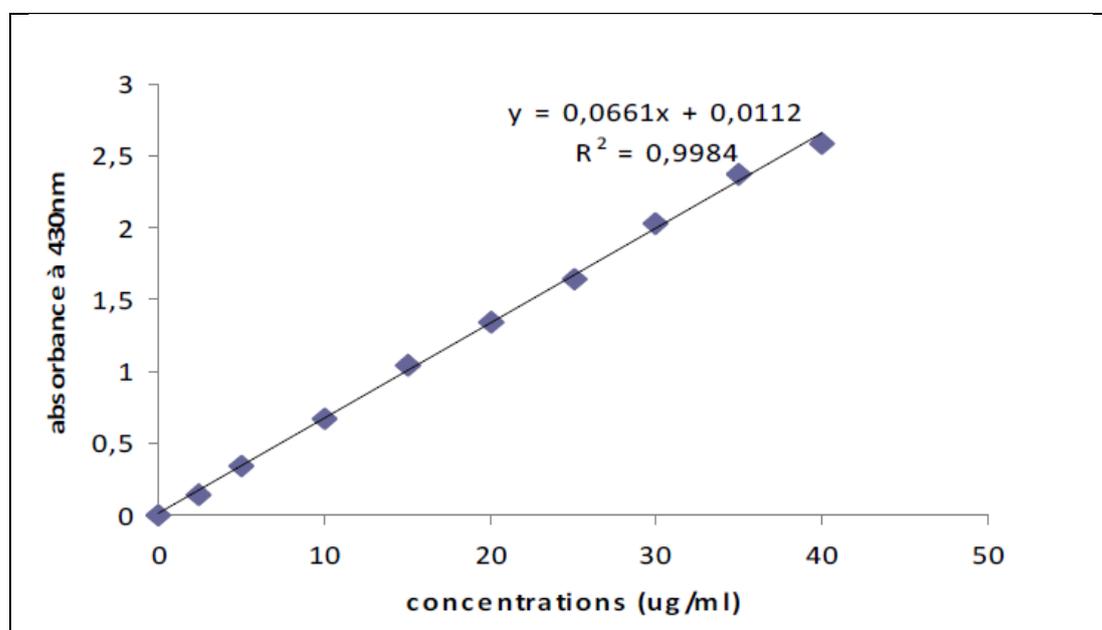


Figure 27. Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de deux essais)

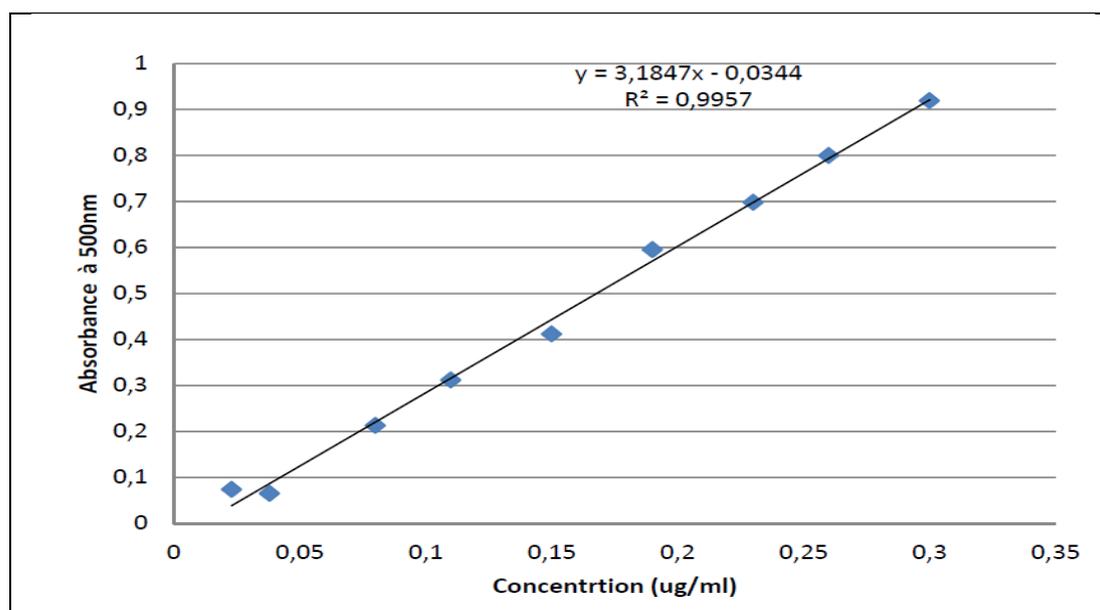


Figure 28. Droite d'étalonnage de la catéchine (moyenne \pm SD de deux essais).

II.3. Activités biologiques

II.3.1. Activité antioxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits AQ et MET d'écorces des racines du *Zizyphus lotus*, on a utilisé la méthode de phosphomolybdate d'ammonium, dont l'intensité de la couleur apparaît reflète le degré du pouvoir réducteur des molécules actives de nos extraits.

Pour toutes les dilutions (0.625; 1.25; 2.5 ; 5mg/ml) l'extrait MET a montré la plus grande activité antioxydante par comparaison avec l'extrait AQ (Figure 29).

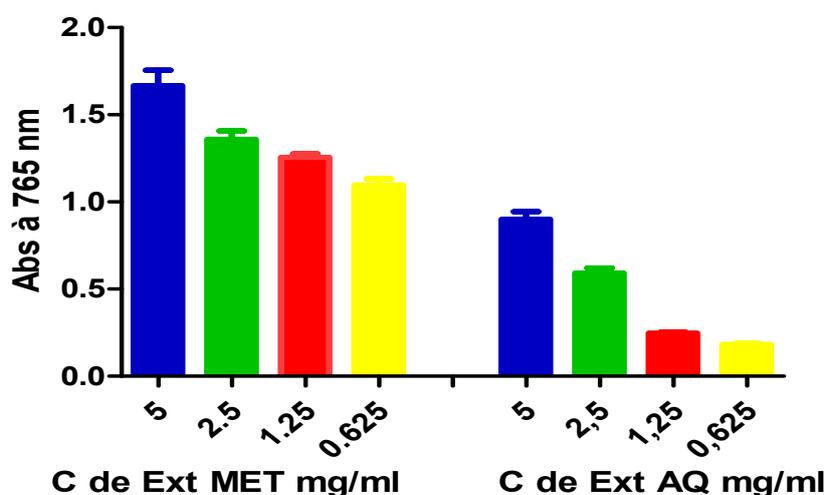


Figure 29. Activité antioxydante des différents concentrations de l'extrait MET et AQ.

Ceci est confirmé par l'estimation de l'activité antioxydante en milligramme équivalent vitamine C (mg Eq VC). Ces résultats sont expliqués par la richesse de l'extrait MET en polyphénols par comparaison avec l'extrait AQ. La gamme d'étalonnage de VC est représenté dans (**Annexe 01**).

D'après les profils (**Annexe 02**), il y a une corrélation significative ($r^2=0.96$; $p\leq 0.05$) entre les différentes dilutions de l'extrait AQ et l'activité antioxydante en mg Eq VC. D'ailleurs pour l'extrait MET la corrélation entre les dilutions et l'activité antioxydante est hautement significative ($r^2=0.98$; $p\leq 0.01$)

D'après les résultats trouvés, il est évident que l'activité antioxydante de nos extraits est concentration dépendante.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de l'étude de Rached et al. (2010), qu'ils ont montré que l'extrait méthanolique des racines de *Zizyphus lotus* a une forte activité antioxydante ($9,14 \pm 0,72 \mu\text{g/ml}$) comparé au BHA utilisé comme contrôle positif ($4,15 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$).

II.4. Etude de l'effet protecteur d'extrait MET des écorces des racines du *Zizyphus lotus* contre le stress oxydant induit par le plomb

En considérant les résultats des analyses quantitative et les résultats de l'activité antioxydante par la méthode de phosphomolybdate ou l'extrait méthanolique est appaait le plus riche en polyphénols par comparaison avec l'extrait aqueux, on a choisi l'extrait méthanolique pour l'analyse in vivo.

II.5. Influence du traitement sur les variations du poids corporel

Nos résultats montrent l'existence d'une diminution non significative du poids corporel, et une diminution du gain du poids chez les 2 lots traités par Pb et MET/Pb (-54,5%,-11,5%), par contre il y a une augmentation du gain du poids chez les 2 lots (témoin +4% et le lot traité par MET +10,7%) par apport le poids initial.

On note aussi une augmentation dans le gain du poids de façon non significative chez le lot traité par MET/Pb en comparant avec le lot traité par le Pb seul.

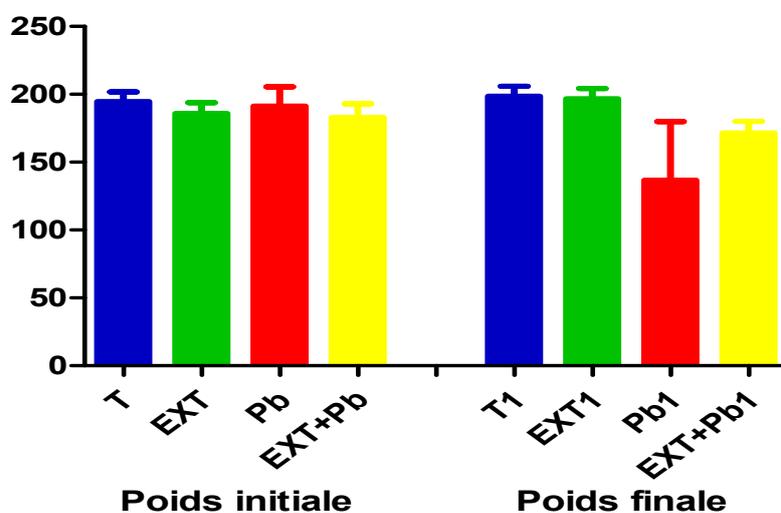


Figure 30. Variation du poids corporel en (g) chez les rattes témoins et traitées par l'extrait MET, le plomb et la combinaison (MET/Pb) après 8 jours de traitement.

Selon hammond et al (1980), l'administration Pb comme agent stressant fait diminuer la croissance corporelle, ce qui est en accord avec nos résultats.

La diminution du poids corporel des rattes traitées par Pb (-54,5%) par comparaison au témoin est expliquée par l'action du Pb sur le transport des éléments nutritifs (les acides aminés, le glucose, et les minéraux essentiels comme le zinc, le magnésium et le fer...) par le sang, et par conséquent, ils peuvent induire une mauvaise assimilation des aliments dans le corps. Hammond et al (1980) ont signalé que la baisse de gain du poids corporel peut être due à la dégradation augmentée de lipides et de protéines par suite de toxicité du plomb.

Il est évident que l'extrait méthanolique a un effet améliorant sur le poids corporel des rattes de telle sorte que la diminution du gain du poids de lot traité par la combinaison (MET/Pb) est supérieure à celle de lot (Pb), d'autre côté le gain du poids est remarquable chez le lot MET, ceci est expliqué par la valeur nutritionnelle intéressante de notre extrait qui est riche en métabolites primaire.

II.6. Influence du traitement sur les variations des paramètres biochimiques sériques

Les résultats obtenus révèlent une augmentation significative ($P \leq 0.05$; 43.00%) de la concentration sérique du glucose chez le lot traité par Pb et augmentation non significative (28.44%) chez le lot traité par la combinaison (MET/Pb) respectivement en comparaison au lot témoin. En revanche, on constate une diminution non significative (-10.18%) chez les lots traités par la combinaison (MET/Pb) en comparaison au lot traité par Pb seul.

Les résultats obtenus montrent une augmentation importante de la concentration du glucose sérique chez les rattes traitées par l'acétate du plomb. Ceci est directement lié aux effets néfastes d'acétate du plomb sur le pancréas et plus exactement sur l'excrétion d'insuline par les îlots de Langerhans (Ramirez-cervante et al., 1978).

En revanche une diminution de la glycémie a été observée chez les rattes traitées par la combinaison (MET/Pb) en comparaison avec les rattes traitées par le plomb, ceci est traduit par l'activité hypoglycémisante des écorces des racines (Glombitza et al., 2010).

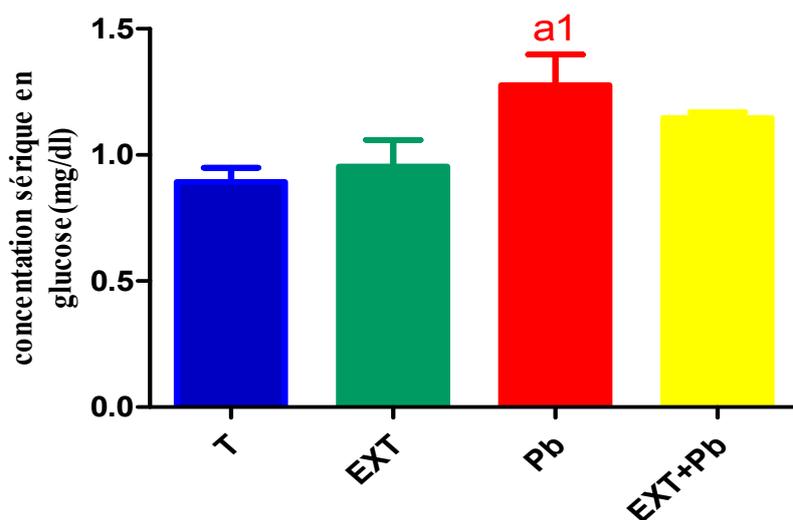
L'analyse de la concentration sérique de l'urée révèle l'existence d'une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$; 156%), significative ($p \leq 0.05$; 94.4%) chez les lots traités par Pb et la combinaison (MET/Pb) respectivement par comparaison au lot témoin. Cependant, on constate une diminution non significative (-25%) chez les lots traités par la combinaison (MET/Pb) en comparaison au lot traité par Pb seul.

L'évaluation de la créatinine sérique fait apparaître une augmentation significative ($p \leq 0.05$; 25.40% ; 21.44%) chez les lots traités par Pb et la combinaison (MET/Pb) respectivement en comparaison au lot témoin. Par contre on constate une diminution non significative (-3.15%) chez le lot traité par la combinaison (MET/Pb) en comparaison au lot traité par Pb seul.

Flower (1991) a confirmé l'insuffisance rénale chez les rattes traitées par Pb peut être interprété par l'augmentation des concentration d'urée et de créatinine par rapport au témoin, ces résultats sont en accord avec les travaux de Thylambal et Saroja (2004) qui ont montré que les cellules rénales ne sont plus capables de contrôler le processus d'excrétion urinaire, car les reins sont parmi les organes les plus sensibles au plomb.

Les résultats montrent aussi que la concentration sérique de l'acide urique a révélé une augmentation hautement significative ($p \leq 0.01$; 197.94%), significative ($p \leq 0.05$; 140.67%) chez les lots traités par Pb et la combinaison (MET/Pb) respectivement en comparaison au lot témoin. Par contre on observe une diminution non significative (-19.22%) chez le lot traité par la combinaison (MET/Pb) en comparaison au lot traité par Pb seul.

Bonsignore et al., (1965) ont présenté l'augmentation sérique d'acide urique par deux hypothèses. La première, l'augmentation est due à l'effet direct du plomb sur le métabolisme de l'acide urique. La seconde, elle est la résultante des troubles morphologiques au niveau des néphrons.



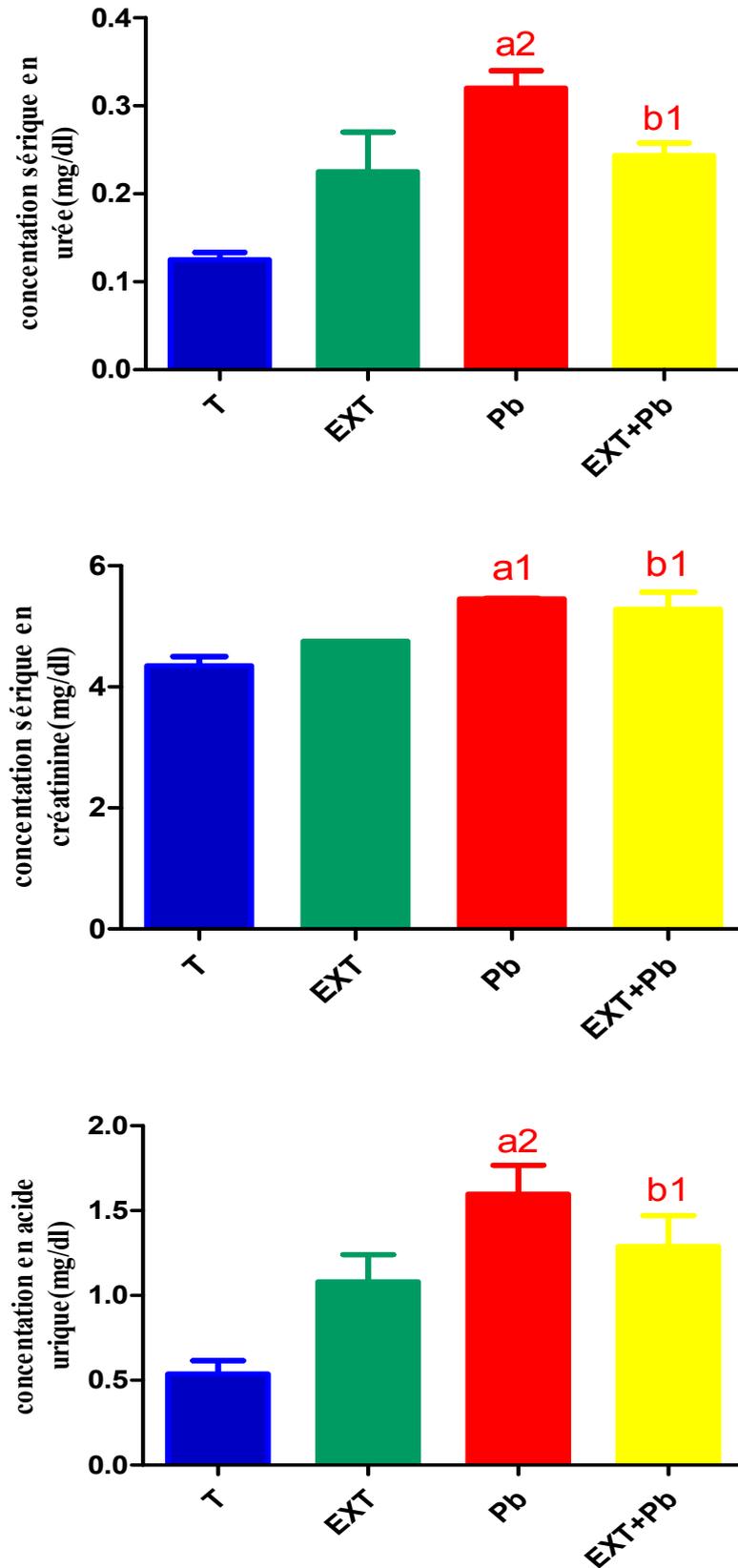


Figure 31. Variation de la concentration sérique de glucose, l'urée, créatinine, l'acide urique, chez les rattes témoins et traitées par l'extrait MET, le plomb et la combinaison (MET/Pb) après 8 jours de traitement.

- a₁** : Différence significative comparant au témoin ($p \leq 0.05$).
- a₂**: Différence hautement significative comparant au témoin ($p \leq 0.01$).
- b₁** : Différence significative comparant au plomb ($p \leq 0.05$).
- p** : seuil de signification.

II.7. Influence du traitement sur les variations de l'activité sériques de quelque marqueur enzymatique

Les résultats montrent que l'activité enzymatique sérique de la AST est augmenté d'une façon très hautement significative ($p \leq 0.001$; 56.54%), non significative (21.78%) chez les lots traités par Pb et la combinaison (MET/Pb) respectivement en comparaison au lot témoin. Aussi on note une diminution hautement significative ($p \leq 0.01$; -33.96% ; -22.25%) chez les lots traités par MET et la combinaison (MET/Pb) en comparaison au lot traité par Pb seul.

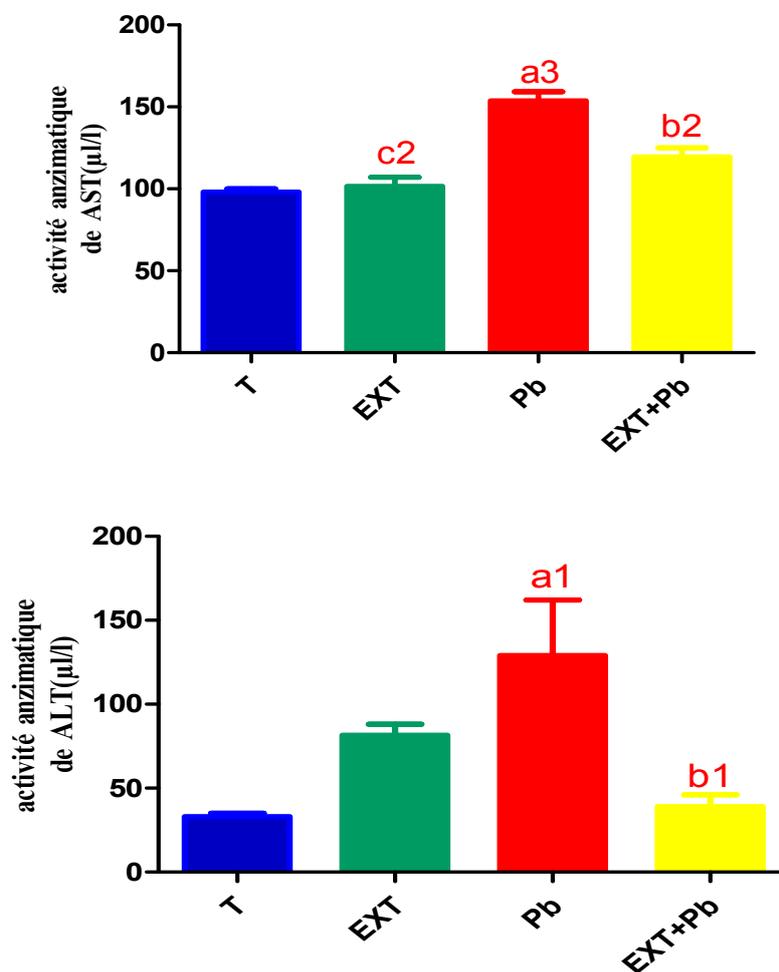
L'activité enzymatique sérique de la ALT est augmenté d'une façon significative ($p \leq 0.05$; 290.43%), non significative (18.03%) chez les lots traités par Pb et respectivement en comparaison au lot témoin. Aussi on note une diminution significative ($p \leq 0.05$; -69.76%), non significative (-36.82%) chez les lots traités par la combinaison (MET/Pb) et MET en comparaison au lot traité par Pb seul.

En ce qui concerne les niveaux de l'activité enzymatique sérique de la PAL, une augmentation non significative (105.1% ; 165.3%) chez les lots traités par la combinaison (MET/Pb) et Pb respectivement en comparaison au lot témoin. on a enregistré une diminution non significative (-22.69% ; -24.8%) de l'activité enzymatique de la PAL chez les lots traitées par la combinaison (MET/Pb) et MET en comparaison au lot traité par Pb seul.

Le dysfonctionnement hépatique est suivi par des niveaux élevé des enzymes de sérum, indiquant la fuite cellulaire et la perte de l'intégrité fonctionnelle de la membrane hépatique. Ce qui est correspond avec nos résultats, qui ont montré des activités augmentées de AST, ALT et de PAL dans le sérum des rattes traitées par le plomb. Le foie constitue une cible importante du plomb, ce dernier possède une grande affinité pour le groupement thiols protéique des membranes cellulaires hépatiques, ce qui conduit à des nécroses hépatiques et la suite la sortie des transaminases dans le sérum. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Gurer et Ercal (2000).

Upadhyay et al (2009) ont démontré que les rats nourris par des aliments contaminés par le plomb subissent un état de stress oxydatif lié à une élévation sérique des transaminases (AST, ALT) et des phosphatases alcalines (PAL). Ce phénomène est dû à l'accumulation des acides aminés tels que l'alanine et l'acide glutamique résultant de la dégradation des protéines somatiques. Ces acides aminés se transforment sous l'action des transaminases en corps cétoniques puis en glucose (néoglucogenèse).

En conséquence l'élévation des transaminases sériques confirme le résultat précédent concernant l'hyperglycémie chez les rats traités par l'acétate du plomb.



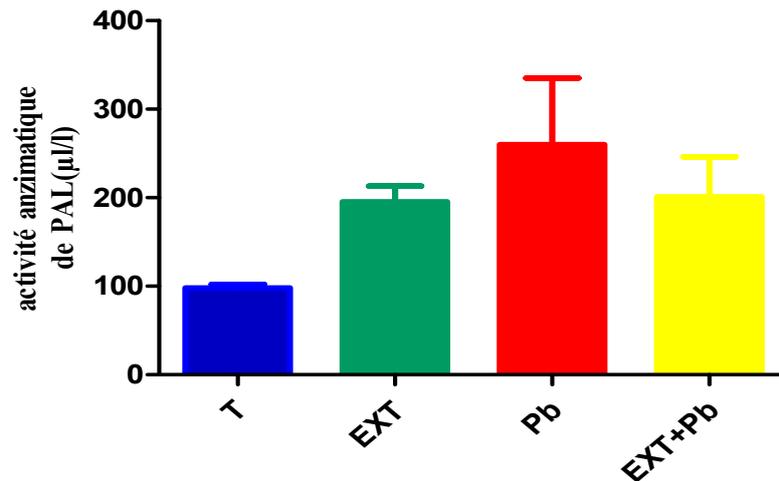


Figure 32. Variation de l'activité enzymatique de AST, ALT, PAL, chez les rattes témoins et traitées par l'extrait MET, le plomb et la combinaison (MET/Pb) après 8 jours de traitement.

a₁ : Différence significative comparant au témoin ($p \leq 0.05$).

a₃ : Différence très hautement significative comparant au témoin ($p \leq 0.001$).

b₁ : Différence significative comparant au plomb ($p \leq 0.05$).

b₂ : Différence hautement significative comparant au plomb ($p \leq 0.01$).

c₂ : Différence hautement significative comparant au plomb ($p \leq 0.01$).

p : seuil de signification.

Conclusion

générale

Conclusion générale

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale ; une telle thérapie prévient l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique.

L'étude des activités biologiques in vitro et in vivo de l'extrait méthanolique et aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus* nous a permis d'obtenir des résultats intéressants.

L'analyse qualitative des extraits a mis en évidence la présence des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tanins dans ces extraits, alors que l'analyse effectuée par chromatographie sur couche mince a montré la présence du quercétine dans l'extrait méthanolique et la rutine dans l'extrait aqueux.

L'analyse quantitative des extraits MET et AQ d'écorces des racines du *Zizyphus lotus* est représentées par le dosage spectrale des trois substances bioactives : les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins où l'extrait MET apparaît le plus riche en polyphénols.

La technique utilisée pour étudier l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique et aqueux est la méthode du phosphomolybdate d'ammonium qui a révélé que l'extrait MET a montré la plus grande activité antioxydante par comparaison avec l'extrait AQ.

L'étude in vivo montre que l'administration de l'acétate de plomb à 50mg/kg de poids corporel par injection intra-péritonéale chez les rattes Albinos Wistar adultes pendant 8 jours, a provoqué des effets hépatotoxiques et néphrotoxiques. Nos résultats montrent que l'addition de l'extrait méthanolique de *Zizyphus lotus* (200mg/kg poids corporel) avec le plomb a amélioré la plus parts des paramètres étudiés.

✚ l'étude physiologique montre:

- ❖ Une diminution du poids corporel durant la période de traitement chez les rattes traitée par le plomb par rapport aux témoins.

✚ l'étude des paramètres biochimiques montrent:

- ❖ Une augmentation de l'activité sérique en glucose, urée, créatinine, et acide urique chez les rattes traitée par le plomb par rapport aux témoins

- ❖ Une augmentation de l'activité sérique des enzymes (AST, ALT et PAL) chez les rattes traitées par le plomb par rapport aux témoins

*Les perturbations enregistrées avec le plomb sont améliorées par l'addition de l'extrait méthalonique de *Zizyphus lotus* ce qui peut témoigner de l'effet antioxydant et protecteur de *Zizyphus lotus* contre l'effet oxydatif du plomb.*

En fin, l'ensemble des résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et source naturelle biologiquement active. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence comme la réalisation des coupes histologiques au niveau des organes pour bien préciser les effets apparaît.

Références

bibliographique

Références bibliographique

- Abdel-Zaher A.O., Salim S.Y., Assaf M.H. et Abdel-Hady R.H. (2005).** Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphusspina-christi* leaves. *J. Ethnopharmacol*, 101:129-138.
- Abu-Zarga M., Sabri S., Al-Boudi A., Ajaz S., Sultana N. et Rahman A-U. (1995).** New cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus lotus*. *Journal of Natural Products*, 58:504-511.
- Atawodi S. E. (2005).** Antioxidant potential of African plants. *African J. of Biotec.* **4 (2):** 128-133.
- Baba Aissa F. (1999).** Encyclopédie des plantes utilisées. Flore d'Algérie et du Maghreb – Substance végétale, Edition Librairie Moderne, Rouïba, 145p.
- Bahorun T. (1997).** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .*une source d'approvisionnement potentielle Food and Agricultural Research council Mauriti*, 83-94.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006).** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food chemistry*, **9**: 191-203.
- Barry PSI. A. (1975).** Comparaison of concentrations of lead in human tissues. *Br J Ind Med.*; 32: 119–139.
- Bayer E et Butter K. (2000).** Guid de la flore méditerranéenne p. 280.
- Benammar CH. (2011).** Effet antioxydants et immunomodulateurs d'une plante médicinale Nord Africane, *Zizyphus lotus L.* (Sedra) : Etude des différents extraits. Thèses de doctorat. Université de Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.1-14p.
- Bergdahl IA, Gerhardsson L, Schutz A. (1997b)** Delta-aminolevulinic acid deshydratase polymorphism: influence on lead levels and kidney function in humans. *Arch Environ Health*, 52: 91-96.
- Berger M. M. (2006).** Manipulation nutritionnelles du stress oxydant: état de connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 48-53.
- Bismuth C, Baud F, Conso F, Dally S, Fréjaville J, Garnier R. (2000).** Toxicologie clinique. Paris: Flammarion Médecine Sciences.
- Blandine G. (2006).** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherim adpressum* et *Ononis anfastissimma*. Thèse de doctorat. Université de Constantine.
- Boizot Net Charpontier J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'Inra*, 79-82.

- Bonsignore D, Calisano P. Cartasegna C. (1965).** Un semplice metodo per la determinazione della delta - aminoleirilino - deidratazione nel sangue. *Med Lav*, 56: 199-205.
- Bonsignore D. (1970).** Su alcuni aspetti del metabolismo porfirinico nel l'intossicazione saturnina *Lav Med.* 24(1-2) : 19-44.
- Borgi W et Chouchane N. (2006).** Activité anti-inflammatoire des saponosides des écorces des racines de *Zizyphus lotus* (L). *Revue des Région Arides* ,283-286.
- Borgi W., Ghedira K., Chouchane N. (2007(a)).** Anti-inflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks . *Fitoterapia.*78:16-19.
- Borgi W., Bouraoui A ., Chouchane N.(2007(b)).** Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, 12:228-231.
- Borgi W., Recio M-C., Rios J-L ., Chouchane N. (2008).**Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. *South African Journal of Botany*, 14:320-324.
- Bougandoura N., et Bendimerad N. (2012).** Effet antifongique des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. (Nepeta) briq. *Revue des BioRessources*, 2 :1-7.
- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition.* 4(6), 7p.
- Bross J. (2000).** Larousse des arbres et des arbustes. Larousse (Ed) Canada .576p.
- Bruneton J. (1999).** Les tanins. Ed. Editions médicales internationales, Paris, 369-404.
- Carillon E. (2000).** La phytothérapie face à l'évolution médicale.
- Catenacci G, Moscato G, Mazzella GL, Massarini M. (1976).** Intossicazione subacuta da Piombo con grave polneuropatia in ceramista. *Med Lav.* 5 : 496-505.
- Catoire C., Zwang H and Bouet C. (1994).** Le jujubier ou le *Zizyphus lotus*. Fruits oubliés. Article n°1.
- Chisolm JJ JR, ThomaS DJ, Hamill TG. (1985).** Erythrocyte porphobilinogen synthase activity as an indicator of lead exposure in children. *Clin Chem*, 31: 601-605.
- Chouaibi M., Mahfoudhi N., Rezig L., Donsi F., Ferrari G and Hamdi S. (2011).** Nutritional composition of *Zizyphus lotus* L. seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 6 : 1171–1177.
- Chung K-T. and Wei C-I. (2001).** Are tannins a double edged sword in biology and health? *Trends in Food Science and Technology*, 9: 168-175.
- Clarkson PM., Thompson HS. (2000).** Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition.* 72(2): 637-646.

Claudine, R. (2007). Le nom de l'arbre : le gnenadier, le caroubier, le jujubier, le pistachier et l'arbousier. Actes sud le Majan, 1^{er} Edition. France.45-62.

Cotelle N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr.Top. Med. Chem.* 1:569-590.
(cited in Yakhlaf G, 2009).

Cramer K, Goyer RA, Jagenburg R, Wilson MH. (1974). Renal ultrastructure, renal function and parametres of leal toxicity in works with different periods of leal exposure. *Br J Ind Med.* ; 31 :113-127.

Crozier A., Clifford MN. And Ashihara H. (2006). Plant Secondary Metabolites : Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell publishing Ltd.

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

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

Danel V. (1997). Intoxication par le plomb - Physiopathologie, épidémiologie, diagnostic. *Rev Prat*, 41, 1509-1512.

Dangles O, Stoeckel C, Wigand MC, Brouillard R. (1992).Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.* 33: 5227-30.

Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont-Rousselot D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 405p.

Demasi m, Costa CA, Pascual C, Ilesuy S. Bechara EJH. (1997). Oxidative tissue response promoted by d-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity. *Free Rad Res*, 26: 235-243.

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

De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J., Lekeux P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval.149: 1-9.

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

Divine, k,k., Ayala-Fierro, F., Barber, D.S., Carter, D.E. (1999). Glutathione, albumine, cysteine, and cys-gly effects on toxicity and accumulation of mercuric chloride in LLC-PK1 cells. *J toxicol and environmental health.* 57, 489-505.

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

Douris PC., Elokda AS., Handrakis JP., Principal S., Rondo E., Bovell J., Coughlin WP., Mastroianni CN., Wong MJ., Zimmerman T. (2009). Martial art training enhances the glutathione antioxidant system in middle-aged adults. *J. Strength Cond. Res.* 23(5): 1518-23.

Duarte T.L., Jones G.D.D. (2007). Vitamin C modulation of H₂O₂-induced damage and iron homeostasis in human cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 43: 1165-1175.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, p108-115.

Fowler BA, Du Val G. (1991). Effects of lead on the kidney: Roles of high-affinity lead binding proteins. *Environ Health Perspect.* 91: 77-80.

Fiorucci S. (2006). Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Université Nice-Sophia Antipolis, 212 p.

Formica J-V and Regelson W. (1995). Review of the Biology of quercétin and related Bioflavonoids. *Fd Chem. Toxic*, 33: 1061-1080

Fuhrman .B., Lavy A., and Aviram M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 61:549-554. (cited in Yakhlaf G, 2009).

Garnier R, Poupon J. (2004). Biomarqueurs de l'exposition aux métaux. Congrès SFT Biomarqueurs de Toxicité. Paris: Société Française de Toxicologie.

Garnier R. (2005). Toxicité du plomb et de ses dérivés. *EMC-Toxicol Pathol.* 2: 67-88.

Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharm Sci.* 5 (2):5p.

Ghedira K. (2006). La nigelle cultivée: *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 4: 1-7.

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

Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A. M., 2001. Le préparateur en pharmacie. Ed. Médicales Internationales. Paris, pp 108-119.

Glombitza KW, Mahran GH, Mirhom YW, Michel KG, Motwi TK. (1994). hypoglycemic and antihyperglycemic effects of *Zizyphus lotusspina-christi* in ras. planta Med,60:244-247.

Guingard. (1996). Biochimie végétale. Lavoisier, Paris, pp 175-192.

Gurer H, Ercal N. (2000). Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? Free Radical Biol Med. 29(10): 927–945.

Gutteridge J.M. (1993). Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun.* 19: 141-158.

Hać E, Krechniak J. (1996). Lead levels in bone and hair of rats treated with lead acetate. Biol Trace Elem Res. 52: 293–301.

Hagenoer JM, Furon D. (1982). Toxicologie et hygiène industrielle. Les dérivés minéraux, 2^e partie. Tom 2 technique et documentaion. PARIS.

Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Richel TL. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. J. Agric. Food Chem., 46: 1887-92.

Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants. *Nutr. Rev.* 52:253-265.(cited in Yakhlaf G, 2009).

Hammond PB, Lerner SI, Gartside P.S, Hanenson IB, Roda SB, Foulkes EC et al (1980). The relationship of biological indices of lead exposure to the health status of workers in a secondary lead smelter. J Occup Med. 22(7): 475–484.

Harborne JB. (1989). Recent advances in chemical ecology. Nat. Prod. Rep. 25 (7): 85-109.

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

Hermes-Lima M. (1995). How do Ca²⁺ and d-aminolevulinic acid-derived oxyradicals promote injury to isolated mitochondria ? *Free Radic Biol Med*, 19: 381-390.

Jacques B, and André R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225.

Jover R. Lindberg RL, Meyer UA. (1996). Role of heme in cytochrome P450 transcription and function in mice treated with lead acetate. Mol Pharmacol.; 50 : 474-481.

Jürgen R., Paul .S., Ulrike S., and Reinhard S. (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed*.16: 79–90.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007). Stress oxydant. *Rev Med Liege*; 62 : 10 : 628-638.

Kaminsky P, Klein M, Duc M. (1993). Physiopathologie de l'intoxication par le plomb inorganique. *Rev Med Interne*. 14: 163–170.

Kandra L., Guémant G., Zajacz A., Batta G. (2004). Inhibitory effects of tannin on human salivary α -amylase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 319: 1265-1271.

Kohen R., Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 30:620-650.

Landolf R., Mower R. L., Steiner M. (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids structure activity relation. *Biochem Pharmacol.*, 269: 2971-2979.

Lauwerys R, Buchet IP, Roels H, Hubermont G. (1978). Placental transfer of lead, mercury, cadmium, and carbon monoxide in women. Comparison of the frequency distribution of the biological indices in maternal and umbilical cord blood. *Environ Res*. 15: 278–289.

Le Crouéour G., Thèpenier P., Richard B., Petermann C., Ghédira K., Zéches-Hanrot M. (2002). Lotusine G : a new cyclopeptide alkaloid from *Zizyphus lotus*. *Fitoterapia*, 73:63-68.

Lehucher-Michel M. P., Lesgards J. F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med.*, 30: 1076-1081.

Luo JL, Deka J. Lim CK. (1996). Determination of 5 aminolaevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes and porphobilinogen in urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chroma A*, 722: 353-357.

Lyn Patrick ND. (2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern. Med. Rev*. 11(2): 114-127.

Mahmood N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A., Hay A. J. (1993). Inhibition of HIV infection by flavonoids. *Antivir. Res.*, 46(7): 1257-1271.
Mamadou B. (2002). Actions pharmacologiques des tanins. Thèse de doctorat. Université cheikh Anta Diop de Dakar. 53p.

Mancheix J.J., Fleuriet A. and P. Sarni-Manchado. (2006). Composés phénoliques dans la structur, biosynthèse, répartition et roles. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris.

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

Marghani.M.,Gorai M.,Neffati M. (2010).seed germination at températures and Water stress levels,and seedling frome different depths of *Zizyphus lotus L.* (Lam). *South Afriran Journal of Botany* ,76 : 453-459.

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

Meister R.T. (1991). Farm chemicals handbook 91. Meister Publishing Company, Willoughby, Ohio.

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

Niosh. (1980). Delta-aminolevulinic acid dehydratase in blood. Method 8000 (issued 2-15-84). NIOSH manual of analytical methods - 2nd edition v.6 P et CAM328, US Department of Health and Human Serv. Publ. (NIOSH), 80-125.

OMS. (1978). Critère d'hygiene de l'environnement. 3-plomb ; OMS. Ed. Germène.

Ong K.C., and Khoo H.E. (2000). Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life. Sci.* 67: 1695-1705.

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

Perret C. (2001). Analyses de tannins inhibiteurs de stilbène oxydase produite par *Btrytis cinerea* Pers.:FR. Thèse de Doctorat. Université de Neuchâtel. 173p.

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

Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products.*, 63: 1035-1042.

Prito P., Pineda M., Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin. *Analytical biochemistry* Pp337-341.

Prieto P, Pineda M, Aguilar M. (2005). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269:337–341.

Quaterman I, Morrison IN. (1978). The influence of high dietary calcium and phosphate on lead uptake and release. *Environ Res.* 17: 60–67.

Quezel P et Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et régions désertiques méridionales. Tome2. *Centre national de la recherche, Paris* ,565p.

Rabinowitz M, Wetherhill G, Kopple I. (1978). Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest.* 58: 260–270.

Rached W., Benamar H., Bennaceur M., Marouf A. (2010). Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *J. Biological. Sciences*, 10(4): 316-324.

Rekhila A. (2003). Bilan toxicologie du plomb chez les ouvriers de l'entreprise nationale de production d'accumulateurs E. N. P. C. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme universitaire appliquée (D.E. U. A).

Ramirez-cervante B, Embree JW, Hine CH, Nelson KW, Varner MO, Putnam RD (1978). Health assessment of employers with different body burden of lead. *J Med Occup.* 20(8): 610–617.

Rendall REC, Baily P, Soskolne CL. (1975). The effect of particle size on absorption of inhaled lead. *Am Ind Hyg Ass J.* 36: 207–213.

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

Roy BR. (1977). Effects of particle sizes and solubilities of lead sulphide dust on mill workers. *Am Ind Hyg Assoc J*, 38: 327-332.

Rsaissi N et Bouhache M. (2002). La lutte chimique contre le jujubier .Programme National de transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA), DERD (Ed).n0 94.Rabat ,4p.

Sarni-Manchado P, Cheynier V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec &Doc), Paris, 300-398.

- Schofield P., Mbugua D-M and Pell A N. (2001).** Analyses of condensed tannins: a review *Animal Food and Technology*, 91:21-40.
- Shimizu, H. (2004).** Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population :the Hisayama study, *Stroke*,35 (9) : 2072-2077.
- Stern AH, Munshi AA, Goodman AK. (1989).** Potential exposure levels and health affects of neighborhood exposure to a municipal incinerator bottom ash land fill. *Arch Environ Health*. 44(1) : 40-48.
- Suksamrarn S., Suwannapoch N., Aunchai N., Kuno M., Ratananukul P., Haritakum R., Jansakul C. et Ruchirawat S. (2005).** Ziziphine N, O, P, new antiplasmodial cyclopeptides alkaloids from *Zizyphus oenoplia* var. brunoniana. *Tetrahedron*, 61 :1175-1180.
- Taylor A. (1986).** Metabolism and toxicology of lead. *Rev Environ Health*. 6: 1–83.
- Timmins FD. (1972).** The danger of lead in paints. *Ann Occup Hyg*. 15 : 117-120.
- Thylambal R, Saroja PM. (2004).** Therapeutic efficacy of lipoic acid in combination with dimercaptosuccinic acid against lead induced renal tubular defects and on isolated brush-border enzyme activities. *Chem Biol*. 147: 259–271.
- Upadhyay AK, Mathur R, Bhadauria M, Nirala SK. (2009).** Therapeutic influence of zinc and ascorbic acid against lead induced biochemical alterations. *Thérapie*. 64(6): 383–388.
- Upreti KK, Das M, Kuman A, Singh GB, Khanna SK. (1989).** Biochemical toxicology of argemone oil. IV : short-term oral feeding response in rats. *Toxicology*. 58, 285-9.
- Vansant G. (2004).** Radicaux libres et antioxydant : principe de base symposium. <Antioxydant et alimentation >. Institut Danone.
- Viala A, Botta A. (2005).** Toxicologie. 2e Édition. Paris: Édition Lavoisier.
- Von Maydell H. J.V. (1990).** Arbres et arbustes du Sahel : leur caractéristique et leur utilisation. 283 p.
- Wong S-P., Leong L-P and William Koh J-H. (2006).** Antioxidant activities of extracts of selected plants. *Food chemistry*.99:775-783.
- Winship KA. (1989).** Toxicity of lead: a review. *Adv Drug React*. 8: 117–152.

Annexe

Annexe 01: La gamme d'étalonnage des vitamines C

Concentration (mg/ml)	0.75	0.25	0.25	0.125
Abs	1,097	0,57	0,273	0,104

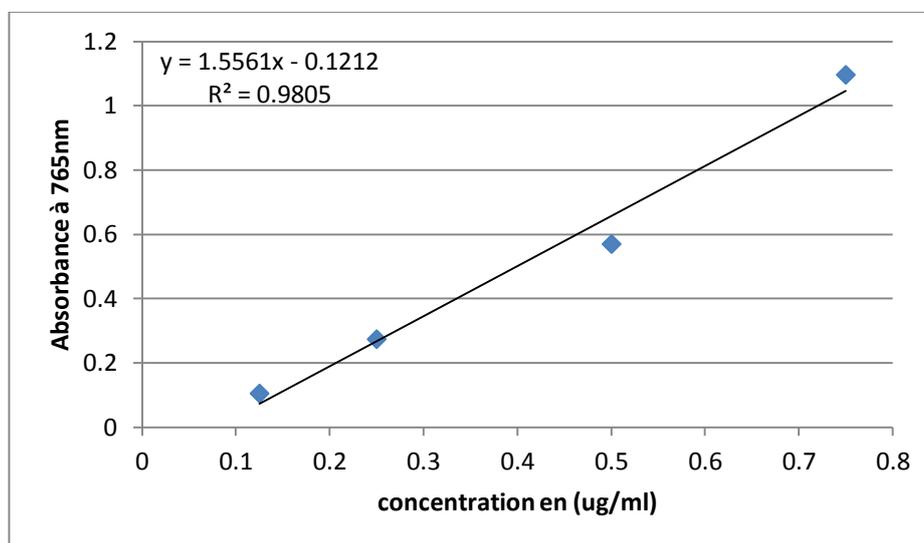
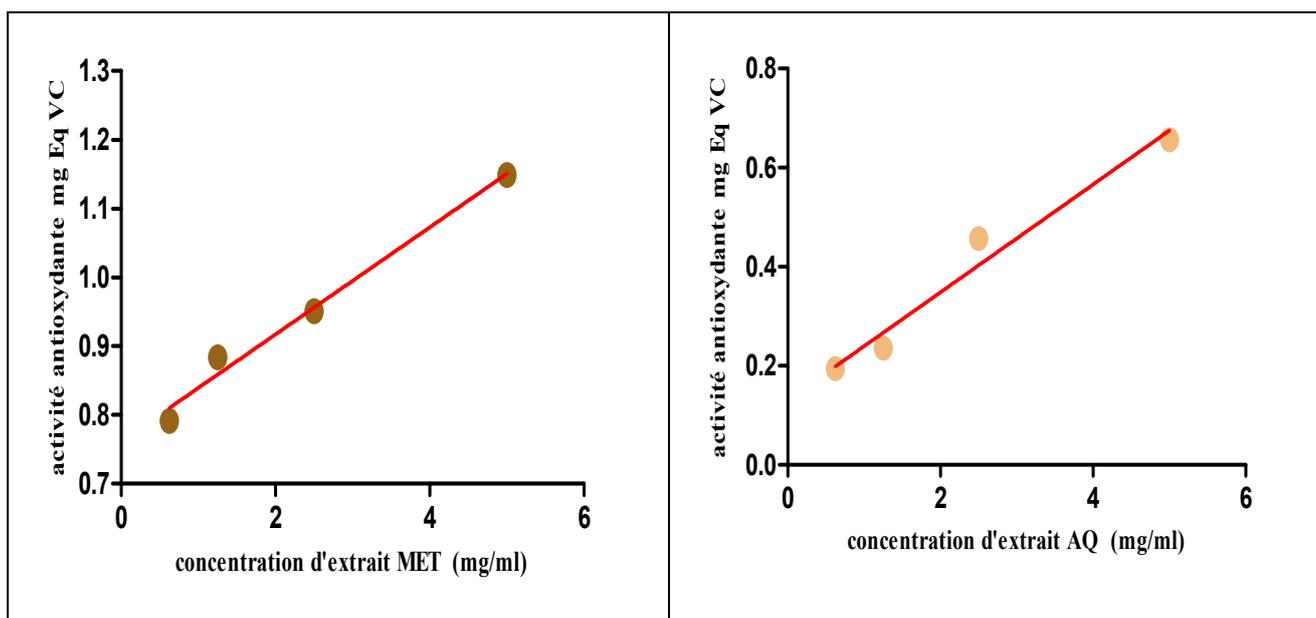


Tableau: La moyenne \pm l'écart types de l'Abs

Concentration (mg/ml)	Abs en 695nm	
	Ext MET	Ext AQ
5	1.668 \pm 0.152	0.900 \pm 0.076
2.5	1.359 \pm 0.084	0.593 \pm 0.047
1.25	1.256 \pm 0.032	0.247 \pm 0.011
0.625	1.097 \pm 0.061	0.182 \pm 0.008

Annexe 02: Corrélation entre les différentes concentrations des extraites MET et AQ et l'activité antioxydante par équivalence en vitamines C.

	MET				AQ			
Concentration mg/ml	5	2,5	1,250	0,625	5	2.5	1.250	0.625
Eq VC	1,149	0,951	0,884	0,791	0,656	0,457	0,236	0,194



Annexe 03: Réactifs du dosage des paramètres biochimique.

- **Dosage du glucose**

R 1. Tampon	Tris pH 7,4	92 mmol/L
	Phénol	0,3 mmol/L
R 2. Enzymes	Glucose oxydase (GOD)	15000 U/L
	Peroxydase (POD)	1000 U/L
	4 – aminophénazone (4-AF)	2,6 mmol/L
Glucose calibrant	Etalon primaire aqueux de Glucose	100 mg/dL

- **Dosage de l'urée**

R 1. Tampon	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
	Cétoglutarate	6 mmol/L
R 2. Enzymes	Uréase	3750 U/L
	Glutamate déshydrogénase (GLDH)	6000 U/L
	NADH	0,32 mmol/L
Urée calibrant	Patron primaire de détection d'urée	50 mg/dL

- **Dosage de la créatinine**

R 1	Acide picrique	25 mmol/l
R 2	Hydroxyde de sodium	0.29 mol/l
Créatinine calibrant	Créatinine aqueux standard	2 mg/dl

- **Dosage de l'acide urique**

R 1. Tampon	Phosphate pH 7.4	50 mmol/l
	2-4 Dichlorophenol sulphonate (DCPS)	4 mmol/l
R 2. Enzymes	Uricase	60 U/l
	Peroxydase (POD)	660 U/l
	Ascorbateoxidase	200 U/l
	4-Aminophenazone (4-AP)	1 mmol/l
Acide urique calibrant	L'acide urique aqueux standard	6 mg/dl

- **Dosage de (ASAT / TGO)**

R 1. Tampon	Tris pH 7.8	80 mmol/l
	L-aspartate	200 mmol/l
R 2. Substrats	NADH	0.18 mmol/l
	Lactate deshydrogenase (LDH)	800 U/l
	Malatedeshydrogenase (MDH)	600 U/l
	α -cetoglutarate	12 mmol/l

- **Dosage de (ALAT/TGP)**

R 1. Tampon	Tris pH 7.8	100 mmol/l
	L-alanine	500 mmol/l
R 2. Substrats	NADH	0.18 mmol/l
	Lactate deshydrogenase (LDH)	1200 U/l
	α -cetoglutarate	15 mmol/l

• **Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)**

R 1. Tampon	Diethanolamine (DEA) pH 10.4	1 mmol/l
	Chloride de magnesium	0.5 mmol/l
R 2. Substrats	p-Nitrophenylphosphate (pNPP)	10 mmol/l

Annexe 04: Variation de poids relatif PC(g) chez les rattes témoins et traitées par le *Zizyphus lotus*, plomb et la combinaison (MET/Pb) après 8 jours de traitement .

Les poids (g)	Les lots traités			
	témoin	MET	Pb	MET/Pb
Poids initial	<i>194.70±12.34</i>	<i>186.00±13.45</i>	<i>191.30±24.44</i>	<i>183.00±14.14</i>
Poids final	<i>198.70±12.66</i>	<i>196.70±13.05</i>	<i>136.70±74.93</i>	<i>171.50±12.02</i>
Gain de poids	+4	+10.7	-54.50	-11.50

Annexe 05: Variation de quelques paramètres biochimique chez les rattes témoins et traitées par zizyphus lotus, Plomb et la combinaison (MET/Pb) après 8 jour de traitement.

Paramètres	Les lots expérimentaux			
	Témoin	MET	Pb	MET/Pb
Glucose	<i>0.893±0.097</i>	<i>0.955±0.148</i>	<i>1.277±0.211</i>	<i>1.147±0.040</i>
	-	<i>6.94%</i>	<i>43%^{a1}</i>	<i>28.44%</i> <i>-10.18%</i>
Urée	<i>0.125±0.015</i>	<i>0.225±0.063</i>	<i>0.324±0.028</i>	<i>0.243±0.025</i>
	-	<i>80%</i>	<i>156%^{a2}</i>	<i>94.4%^{a1}</i> <i>-25%</i>
Créatinine	<i>4.350±0.026</i>	<i>4.75±0.00</i>	<i>5.455±0.007</i>	<i>5.283±0.489</i>
	-	<i>9.19%</i>	<i>25.40%^{a1}</i>	<i>21.44%^{a1}</i> <i>-3.15%</i>
Acide urique	<i>0.536±0.136</i>	<i>1.080±0.266</i>	<i>1.597±0.295</i>	<i>1.290±0.254</i>
		<i>101.49%</i>	<i>197.94%^{a2}</i>	<i>140.67%^{a1}</i> <i>-19.22%</i>

Annexe

a1: Différence significative comparant au témoin ($p \leq 0.05$).

a2: Différence hautement significative comparant au témoin ($p \leq 0.01$).

P: Seuil de signification.

Annexe 06: Variation de l'activité enzymatique chez les rattes témoins et traitées par *Zizyphus lotus*, Plomb et la combinaison (MET/Pb) après 8 jour de traitement.

Paramètres	Les lots expérimentaux			
	Témoin	MET	Pb	MET/Pb
TGO	98.120±3.680	101.5±7.778	153.7±9.713	119.5±7.778
		3.44% -33.96% ^{c2}	56.64% ^{a3}	21.78% -22.25% ^{b2}
TGP	33.040±3.517	81.50±9.192	129.00±46.670	39.00±9.899
		146.67% -36.82%	290.43% ^{a1}	18.03% -69.76% ^{b1}
PAL	98.00±5.657	195.50±24.75	260.00±106.1	201.00±63.64
		99.48% -24.80%	165.30%	105.10% -22.69%

a1: Différence significative comparant au témoin ($p \leq 0.05$).

a2: Différence hautement significative comparant au témoin ($p \leq 0.01$).

a3: Différence très hautement significative comparant au témoin ($p \leq 0.001$).

b1: Différence significative comparant au Pb ($p \leq 0.05$).

b2: Différence hautement significative comparant entre le Pb et MET/Pb ($p \leq 0.05$).

c2: Différence hautement significative comparant entre le Pb et MET ($p \leq 0.05$).

P: Seuil de signification.

Année universitaire : 2015/2016

Présenté par : CHETIBI Choubeila
DIAB Souad

Thème : Etude de l'activité biologique in vitro et in vivo des extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines des *Zizyphus lotus*

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

Résumé :

Les extraits naturels connus par leur richesse en molécules biologiquement actives. Dans ce contexte, nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydante in vitro et in vivo des extraits méthanolique et aqueux des écorces des racines du *Zizyphus lotus*.

L'analyse qualitative de ces extraits par les tests préliminaires et la CCM a révélé la présence des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tanins ; ceci est confirmé par une analyse quantitative basée sur le dosage , des composés phénoliques ,des flavonoïdes et des tanins dont les valeurs sont : pour les composés phénoliques dans l'extrait MET (48.54±3.514µg Eq AG/mg d'extrait) et l'extrait AQ (45.19± 0.396µg Eq AG/mg d'extrait) , les flavonoïdes dans l'extrait MET (3.710±0.555µg Eq Q/mg) et l'extrait AQ (6.786± 0.041µg Eq Q/mg) , et les tanins dans l'extrait MET (0.063±0.046µg Eq CT/mg), pour l'extrait AQ (0.190 ±0.003 µg Eq CT/mg).

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de phosphomolybdate d'ammonium a révélé une grande activité anti oxydante de l'extrait MET par comparaison avec l'extrait AQ.

L'analyse in vivo faite sur 16 rattes Albinos Wistar est basée sur l'étude des effets nocifs de plomb sur quelques paramètres biochimique, et le rôle de l'extrait MET (200mg/kg) de *Zizyphus lotus* en réduisant ou éliminé les effets cytotoxiques induit par le plomb.

Les resultats ont montré aussi des changements notables dans les paramètres biochimique,et pondéraux caractérisés surtout par une augmentation significative de la concentration sérique du glucose, transaminase (AST,ALT),l'urée, l'acide urique et la créatinine ,et une augmentation non significative de PAL chez les rattes traitées par plomb seul par rapport aux témoins.

Par ailleurs la supplémentation de l'extrait méthanolique de *Zizyphus lotus* a modifié les effets toxiques du plomb et il est considéré comme un antioxydant fort et efficace contre le stress oxydant induit par le plomb.

Mots clés : *Zizyphus lotus*, activité antioxydante, molybdate, composés Phénoliques, flavonoïdes, tanins, plomb, l'extrait méthanolique, l'extrait aqueux.

Laboratoire de recherche : Biochimie RDC ; Enzymologie ; Immunologie; Animalerie de biologie animal

Date de soutenance : 05/06/2016