

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

FILIERE : CHIMIE
OPTION : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

MEMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER

Travail Réalisé par :
Mlle. : Bensalem Takoua

Intitulé

Extraction, dosage et évaluation *in vitro* des activités antioxydante, antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits de la plante saharienne *Zizyphus lotus* L.

Boubakeur Hafssa	MCA - Univ MB, M'sila	Présidente
Dr. Kheniche Abdelhakime	MCA - Univ MB, M'sila	Examineur
Dr. KADI Imededdine	MRB-CRBt, constantine	Promoteur

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Tout d'abord, je remercie ALLAH le tout puissant qui m'a aidé et m'a donné la patience et le courage durant ces longues années d'étude et m'a accordé son soutien durant les périodes les plus difficiles.

Je tiens à exprimer mes plus chers et vifs remerciements à **Monsieur Kadi. Imad Eddine** directeur de thèse qui m'a toujours apporté son soutien tout au long de travail, je le remercie pour sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire et sans lui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Un grand merci à monsieur **Kheniche Abd EL Hakim** chef de département de chimie, Examineur de ce travail pour m'avoir donné la chance de travailler sur ce sujet.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour leurs temps consacré durant la lecture et l'évaluation de ce travail.

Je remercie aussi tout le personnel rencontré au niveau du CRBT Constantine pour leur gentillesse et leur disponibilité.

A toutes les étudiantes de Graduation « Master 2 » spécialité « Chimie Pharmaceutique »

A tous ceux qui de près ou de loin ont apporté leur contribution à la réalisation de ce travail.

Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce travail :

A ma mère et à mon père

Qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Que dieux les protège et leur accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur.

*A ma chère et unique sœur **Souhla** et mon frère **Mounib***

*A ma deuxième maman **Siham** et mon oncle **Aïssa**.*

A mes cousines et cousins et toute ma famille.

A mes copines : Isra, Fatine, Wfita, Rania, Chahrazed, Khadidja, Ayett, Rachida, Fatma, Linda et Ikram, je suis tellement chanceuse de vous avoir dans ma vie.

A mes chères : Aya Chaïma Hamida et Rania qui ont fait de cette année une année très spéciale.

Résumé

En Algérie, la sécurité sanitaire a une priorité extrême dans les projets de recherches encadrés par la direction générale de recherche scientifique. Les experts cherchent à maîtriser les impacts socio-économiques liés aux problèmes de la santé publique, d'une part par une gestion adéquate des stratégies appliquées actuellement en face des maladies lourdes et chroniques et d'autre part, par la recherche des nouvelles alternatives puissantes. La médecine traditionnelle algérienne nous offre plusieurs plantes endémiques qui sont considérées comme sources des principes actifs qui nous permettent de contrôler le stress oxydatif, les maladies métaboliques neurodégénératives. Ce travail a été proposé pour valoriser les activités de la plante *Zizyphus lotus* L. Sur le plan méthodologique et technique, nous avons évalué le contenu en phénols et flavonoïdes totaux avec l'activité antioxydante des extraits de feuilles et fruits la plante d'intérêt. Par des méthodes standards, *in vitro*, le piégeage des radicaux DPPH et ABTS, la réduction du fer (FRAP et Phenanthroline) et d'Argent (SNP). En plus, nous avons évalué l'activité antidiabétique (DT2) via l'inhibition de l' α -amylase et l'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Ce travail a été terminé par une étude des facteurs de protections solaire. Nos résultats ont révélé des rendements d'extraction importants, particulièrement pour les extraits des feuilles. Ils arrivent à 31% du poids de la matière première. Ces extraits ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles est le plus riche en polyphénols et flavonoïdes suivi par son extrait aqueux, l'extrait méthanolique des fruits et l'extrait aqueux des fruits respectivement. A propos de l'activité antioxydante, les résultats ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles a donné l'effet antioxydant le plus élevé suivi par l'extrait aqueux des feuilles et les autres extraits dans les méthodes de neutralisation des radicaux DPPH et ABTS. Parallèlement, nos échantillons ont présenté des activités variables dans les méthodes FRAP, Phenanthroline et SNP. Les extraits Méthanolique des deux parties possèdent une activité intéressantes dans les méthodes précédentes, tandis que les extraits aqueux ont apparu faibles en comparaison avec les valeurs des standards qui ont gardé l'activité la plus puissante. D'autre part, l'activité inhibitrice des enzymes a montré que les extraits étudiés ont inhibé d'une manière faible a modérée de l' α -amylase. Le meilleur effet a été présenté par l'extrait méthanolique des feuilles et l'extrait aqueux des fruits. Tandis que les extraits ont montré une activité inhibitrice considérable du BuChE, pour les extraits des fruits, d'une manière dose-dépendante, mais ils sont moins efficaces en comparaison avec la molécule de référence la galantamine. En plus, nos extraits ont donné des excellents facteurs de protections solaires. Les résultats obtenus confirment l'usage traditionnel de la plante sélectionnée en Algérie.

Mots clés : Antioxydants, *Zizyphus lotus*, stress oxydatif, Alzheimer, DT2

Abstract

In Algeria, health security has an extreme priority in the research projects. The socio-economic impacts of chronic diseases are a great problem. Experts try to control this situation, on the first hand by the management of the currently strategies applied against chronic diseases, and on the other hand, by the search of new powerful alternatives. The Algerian traditional medicine offered us several endemic plants which are considered as sources of active phytopharmaceuticals used in the control of oxidative stress, neurodegenerative and metabolic diseases. This study was proposed to enhance the activities of the plant *Zizyphus lotus* L. On the methodological level, we evaluated the total phenolic and flavonoids contents with the antioxidant activity of leaves and fruits extracts by standard methods, *in vitro*, scavenging of DPPH and ABTS radicals, reduction of iron (FRAP and Phenanthroline) and silver (SNP). In

addition, we evaluated antidiabetic (DT2) and anti-Alzheimer's activities through the inhibition of α -amylase and butyrylcholinesterase respectively. This study was completed by an estimation of the sun protection factors of studied extracts. Our results revealed significant extraction amounts, particularly for leaf extracts. The methanolic extract of the leaves is the richest in polyphenols and flavonoids followed by its aqueous extract. for the antioxidant activity, the methanolic extract of leaves showed the highest antioxidant effect followed by their aqueous extract in the DPPH and ABTS radical scavenging methods. In parallel, our extracts showed different activities level in the FRAP, Phenanthroline and SNP methods. The methanolic extracts of both parts showed an interesting activity in these previous methods, while the aqueous extracts appeared weak in comparison with the values of standards. On the other hand, the inhibitory activity of the enzymes showed a moderate inhibition of alpha-amylase, the best effect was presented by the methanolic extract of leaves and the aqueous extract of fruits, While all extracts showed considerable BuChE inhibitory activity, in a dose-dependent manner. In addition, our extracts showed excellent sun protection factors. The obtained results confirmed the traditional use of the selected plant in Algeria.

Keywords : Antioxidant, oxidative stress, Alzheimer, T2DM, Zizyphus lotus.

الملخص

الامن الصحي أولوية أساسية في المشاريع البحثية الجزائرية، لذلك يطمح الخبراء للتحكم في التأثيرات الاقتصادية والاجتماعية المكلفة التي تسببها الاضطرابات الصحية بكافة أشكالها من خلال إيجاد استراتيجيات جديدة والبحث عن بدائل علاجية فعالة خاصة منها ذات المصدر الطبيعي النباتي. تشير التقارير الى كون الطب التقليدي البديل والتكميلي مصدرا جيدا للبحث عن مركبات فعالة ذات أهمية صحية معتبرة، نظرا لما يتميز به من تنوع البنية الكيميائية، فعالية التأثير وقلة الآثار السلبية. كما تؤكد الدراسات أيضا الارتباط الوثيق بين الامراض المزمنة الابضية منها و العصبية، مع ظاهرة الاجهاد التأكسدي لما لها من دور في التسبب أو في مضاعفة تأثير هذه الامراض والتي نذكر منها تحديدا مرضي السكري والزهايمر. في هذه الدراسة نتطرق الي استخلاص المركبات الفعالة للنبتة الطبية *Zizyphus lotus* مع تحديد تركيبها من Polyphénols و flavonoïdes . ونشاطها مضاد الاكسدة باستعمال تقنيات تعديل الجذور الحرة DPPH و ABTS. وكذا تقنيات ارجاع الحديد والفضة في التقنيات، Phenanthroline, FRAP, SNP على التوالي. كما تطرقنا الى دراسة تثبيط العينات للنشاط الانزيمي لكل من α -amylase و BChE مع تحديد مؤشر الحماية من الاشعة فوق البنفسجية الشمسية. النتائج المحصل عليها أعطت كميات معتبرة من Polyphénols و flavonoïdes خاصة بالنسبة للمستخلصات الكحولية والمائية للأوراق. هذه المستخلصات أعطت أفضل النتائج في تعديل الجذور الحرة DPPH و ABTS . في جانب اخر، المستخلصات المدروسة أعطت نتائج متباينة في تقنيات ارجاع الحديد والفضة في، Phenanthroline, FRAP, SNP حيث سجلت المستخلصات الكحولية للأوراق والثمار أفضل النتائج مقارنة بالبقية، في حين تبقى كل النتائج بعيدة عن المقارنة بالمركبات المرجعية. من جهة أخرى اعطى النشاط المضاد لانزيم BuChE نتائج جيدة لكل المستخلصات، في حين كان المستخلص الكحولي للأوراق الأفضل في تثبيط الـ α -amylase من بين كل المستخلصات المدروسة. أما فيما يتعلق بمؤشر الحماية من الأشعة الشمسية فقط أعطت المستخلصات المدروسة نتائج ممتازة في هذا الجانب. النتائج المحصل عليها تبرز أهمية النبتة المختارة للدراسة في إعطاء بدائل حقيقية ذات مصدر طبيعي يمكن الاستفادة منها في الميادين الطبية، الغذائية والصناعية

الكلمات المفتاحية: المركبات الطبيعية، مضادات الأكسدة، الاجهاد التأكسدي، السكري، الزهايمر.

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Les métabolites secondaires d'origine végétale	3
1. Les produits naturels : généralités.....	3
2. Les métabolites secondaires.....	3
2.2.1 Classification des phénols	5
2.1.1.1 Les flavonoïdes	5
2.1.1.2 Les tanins.....	6
2.1.1.3 Les quinones	7
2.1.1.4 Les coumarines	7
2.2 Les alcaloïdes	8
2.2.1 Classification des alcaloïdes.....	8
2.2.1.1 Les alcaloïdes vrais	8
2.2.1.2 Les proto-alcaloïdes	9
2.2.1.3 Les pseudo-alcaloïdes	9
2.3 Les composés terpéniques	9
2.3.1 Classification des terpénoïdes	10
3. Intérêts des produits naturels.....	10
3.1 Dans le domaine médical	10
3.2 Dans le domaine de cosmétologie et parfumerie	11
3.3 Dans le domaine agroalimentaire	11
4. La plante Zizyphus Lotus	12
4.1 Présentation de la plante	12
4.2 Répartition géographique	12
4.3 Description botanique.....	12
4.4 Composition chimique et activités biologiques.....	13
Chapitre II : Les radicaux libres et le stress oxydatif.....	15
1. Les radicaux libres	15
1.1 Généralités	15

1.2 Sources des radicaux libres	15
1.3 Classifications	15
2. Les antioxydants	16
2.1 Généralités	16
2.2 Sources des antioxydants.....	16
2.2.1 Antioxydants endogènes	16
2.2.2 Antioxydants exogènes	17
2.3 Classification des antioxydants	17
2.3.1 Antioxydants d'origine naturelle	17
2.3.1.1 Les antioxydants non enzymatiques	17
2.3.1.2 Antioxydants enzymatiques	17
2.3.2 Antioxydants d'origine synthétique.....	18
3. Le stress oxydatif.....	19
3.1 Généralités	19
3.2 Effets néfaste sur la santé humaine	19
4. Stress oxydatif et maladies chroniques.....	20
4.1 Le Diabète	21
4.1.1 Diabète type 01	21
4.1.2 Diabète type 02	22
4.1.3 Le diabète gestationnel.....	22
4.1.4 Modes de traitement.....	22
4.2 L'Alzheimer	23
4.2.1 Généralité	23
4.2.2 Modes de traitement.....	23
Chapitre III : Matériels et méthodes	24
1. Matériel biologique	24
1.1 Récolte de la matière végétale	24
1.2 Préparation de la matière première	24
1.3 Extraction des principes actifs	25
2. Dosage.....	25
2.1 Dosage des phénols totaux.....	25
2.2 Dosage des flavonoïdes	25
3. Activités biologiques.....	26
3.1 Activité antioxydante	26
3.1.1 Piégeage du radical stable, le DPPH.....	26

3.1.2 Piégeage du radical ABTS	27
3.1.3 Activité du pouvoir réducteur (FRAP).....	27
3.1.4 Activité de réduction par formation du complexe Fe ⁺² -Phenanthroline.....	28
3.1.5 Activité de réduction de l'Ag ⁺ en nanoparticule d'Argent sphérique (SNP)28	
3.2 Activité enzymatique	29
3.2.1 Activité antidiabétique via l'inhibition de l' α -amylase.....	29
3.2.2 Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de Butyrylcholinesterase	30
3.3 Activité protectrice vis-à-vis les rayonnements solaires	30
4. Étude statistique	31
Chapitre IV : Résultats et discussions	32
1. Rendements d'extraction	32
2. Dosage des phénols et flavonoïdes totaux.....	32
3. Activité antioxydante	36
3.1 Activité de piégeage du radical libre DPPH	36
3.2 Activité de piégeage du radical libre ABTS.....	37
3.3 Activité de réduction du complexe Fe ⁺² -Phenanthroline.....	40
3.4 Activité de pouvoir réducteur (FRAP).....	41
3.5 Activité de réduction des nanoparticules d'Argent (SNP)	42
4. Activité inhibitrice des enzymes	46
4.1 L'activité antidiabétique via l'inhibition de l' α -amylase	46
4.2 L'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de butyrylcholinestérase	47
5. L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire.....	49
Conclusion générale	50
Références bibliographiques	52
Annexes	

Liste des abréviations

ROS /ERO	Les espèces réactives de l'oxygène.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
BHA	hydrox-yanisole butylé.
BHT	hydroxy-toluène butylé
NO	oxyde d'azote
SOD	Superoxydes dismutases.
CAT	Catalase.
GPx	Glutathion peroxydase.
GR	Glutathion réductase.
O₂	Oxygène
OH•	Radical hydroxyle.
Fe²⁺	Fer ferreux.
Cu²⁺	Ion cuivrique.
Fe³⁺	Fer ferrique.
HOCl	Acide hypochlorique.
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène.
O₂^{*-}	Anion superoxyde.
¹O₂	Oxygène singulier.
GSH	Glutathion.
DPPH	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl.
ABTS	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power.
SNP	silver nanoparticles
IC50	Concentration inhibitrice de 50 %.
K₃Fe (CN)₆	Ferricyanure de potassium.
FeCl₃	Chlorure de fer.
HCl	Acide chlorhydrique.
H₂O	Eau.
MA	maladie d'Alzheimer.

BChE	Butyrylcholinestérase
A0.5	Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
UV	Ultraviolet
ABS	Absorbance
SPF	Sun Protection Factor
EAG	Equivalent de l'acide gallique
EQ	Equivalent de la quercétine
DT1	Le diabète type 1
DT2	Le diabète type 2
MeOH	Méthanol
TCA	Acide trichloroacétique

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1: La structure de base des flavonoïdes	6
Figure 2: Exemples des composés phénoliques et leur classification.....	8
Figure 3: Exemples des alcaloïdes	9
Figure 4: La Plante Zizyphus Lotus en image	12

Chapitre II

Figure 5: Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes anti oxydantes (en noir) (Opara., 2002).....	18
Figure 6: Pyramide des systèmes de défenses antioxydants.	19
Figure 7: Balance radicaux libres/ antioxydants	20
Figure 8: Pathologies liées au stress oxydatif	21

Chapitre III

Figure 9: Région de récolte de la plante.....	24
Figure 10: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (DPPH)	26
Figure 11 : Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (ABTS)	27
Figure 12: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (FRAP).....	27
Figure 13: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Fe+2-Phenanthroline)	28
Figure 14: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (SNP)	29
Figure 15: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (BuchE).....	30

Chapitre IV

Figure 16: Rendements d'extraction des parties étudiées	32
Figure 17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	32
Figure 18: Courbe d'étalonnage du Quercétine	33
Figure 19: Teneur en Phénols totaux des parties étudiées	33
Figure 20: Teneur en Flavonoïdes totaux des parties étudiées	34
Figure 21: Piégeage du radical DPPH par les extraits étudiés	38
Figure 22 : Piégeage du radical ABTS par les extraits étudiés	38
Figure 23: Réduction du complexe Fe+2-Phenanthroline par les extraits étudiés.....	43
Figure 24: L'activité du pouvoir réducteur des extraits étudiés FRAP.....	43
Figure 25: Réduction des nanoparticules d'Argent SNP.....	44
Figure 26: Valeurs SPF des extraits étudiés.....	49

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1: Classification des métabolites secondaires	4
Tableau 2: Classification chimique des flavonoïdes.....	6
Tableau 3: Classification des terpénoïdes.....	10
Tableau 4: Composition chimique des différentes parties de <i>Zizyphus lotus</i> . (Ghedira., 2013	14

Chapitre II

Tableau 5: Différents types des espèces réactives (Gutowski et Kowalczyk., 2013).....	16
--	----

Chapitre III

Tableau 6 : L'organisation de microplaque dans le test de α -amylase	29
Tableau 7: Mode de remplissage de microplaque dans le test de α -amylase.....	30
Tableau 8: Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF	31

Chapitre IV

Tableau 9: Rendement d'extraction aqueuse et alcoolique.....	32
Tableau 10: Contenu en Phénols et flavonoïdes totaux	33
Tableau 11: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH	36
Tableau 12 : Pourcentages d'inhibition du radical ABTS	37
Tableau 13: Tableau récapitulatif des valeurs IC_{50}	38
Tableau 14: Les absorbances des différents extraits dans la méthode se Phenanthroline	40
Tableau 15: Les absorbances des différents extraits dans la méthode FRAP.....	41
Tableau 16: Les absorbances des différents extraits dans la méthode SNP	42
Tableau 17: Tableau récapitulatif des valeurs $A_{0.5}$	43
Tableau 18: Les pourcentages d'inhibition de l' α -amylase par les extraits étudiés	46
Tableau 19: Les pourcentages d'inhibition de la BuChE par les extraits étudiés.....	47
Tableau 20: Valeurs de protection solaire des extraits étudiés	49

Introduction générale

Introduction générale

En Algérie, la sécurité sanitaire a une priorité extrême dans les projets de recherches encadrés par la direction générale de recherche scientifique DGRSDT. Les experts cherchent à maîtriser les impacts socio-économique liés aux problèmes de la santé publique, d'une part par une gestion adéquate des stratégies appliquées actuellement en face des maladies lourdes et chroniques, et d'autres part par l'innovation des nouveaux systèmes alternatives et puissants. Le marché des médicaments, sur le plan de la qualité des produits, reste l'un des grandes barrières à franchir. L'efficacité des médicaments disponibles et leurs effets secondaires, qui sont parfois graves, sont des sujets lourds sur la table, nécessitant une discussion approfondie. Parallèlement, les maladies chroniques liées au stress oxydatif telles que les maladies métaboliques et neuro-dégénérative méritent des nouvelles modalités de gestion afin de minimiser leurs effets.

De nombreuses études ont rapporté le lien immédiat entre les maladies chroniques, de type métabolique et neuro-dégénérative, avec le stress oxydatif. Ce dernier intervient soit comme facteur déclenchant, associant ou aggravant de l'état du patient. L'analyse étiologique a montré que le stress oxydatif est un climat d'agression structurale et fonctionnelle des tissus vivants aboutissant aux dysfonctionnements aigus et/ou chroniques. Le stress oxydatif est un facteur associant et/ou résultats chez les diabétiques et un facteur déclenchant dans l'Alzheimer, ce qui rend la maîtrise du stress oxydatif un outil crucial dans la gestion de ces maladies.

Les maladies métaboliques y inclus le diabète représentent un problème majeur de la santé publique, elles se caractérisent par un désordre physiologique intense. La fédération internationale du diabète a montré des chiffres terrifiants des personnes touchées en Afrique du nord et plus particulièrement en Algérie. 90% des cas diabétique sont non insulino-dépendants ou de type 02. Les modalités de traitement sont limitées et accompagnés fréquemment aux plusieurs effets secondaires. Parallèlement, La maladie d'Alzheimer est une forme de déficience cognitive progressive, apparait particulièrement chez les sujets âgés. Cette maladie neuro-dégénérative nécessite des stratégies thérapeutiques particulières, mais elles sont parfois insupportables.

Les produits naturels, particulièrement d'origine végétale, sont des alternatives médicales ayant des applications pharmacologiques et industrielles indiscutables. Les praticiens du secteur médical cherchent à exploiter leurs thérapeutiques en tant que produits alternatifs

et/ou complémentaires, dans l'amélioration de la pratique médicale. Les plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle deviennent une matière première intéressante pour des études phytochimiques, pharmaco-toxicologiques et cliniques approfondies pour la mise au point de médicaments d'origine naturel de haute qualité.

Le présent travail s'insère dans le cadre de valorisation scientifique des effets thérapeutiques d'une plante utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne, *Zizyphis lotus L.* Nous avons fait:

- L'extraction, solide-liquide, Méthanolique et aqueuse de la matière première pour extraire les principes actifs.
- La quantification des métabolites secondaires (Phénols et Flavonoïdes totaux)
- Evaluation de l'activité antioxydante, par des méthodes convenables, piégeage du radical libre DPPH, Piégeage du radical ABTS, Activité du pouvoir réducteur (FRAP), Activité de réduction par formation du complexe Fe^{+2} -Phenanthroline, activité de réduction des nanoparticules d'Argent (SNP)
- Estimation de l'activité inhibitrice des deux enzymes particulières, l' α -amylase qui est liée au diabète type 02 et la butyrylcholinestérase liée à la maladie d'Alzheimer.

Ce manuscrit est structuré en quatre parties. La première consiste à une étude bibliographique traitant l'aspect structural et pharmacologique des produits naturels. La deuxième est consacrée aux détails de la notion du stress oxydatif et ses effets sur la santé humaine. Dans la troisième partie, nous avons évoqué le cadre technique et méthodologique des différentes activités étudiées, *in vitro*. Finalement, La quatrième partie est la partie expérimentale dans laquelle nous avons présenté et discuté les résultats obtenus. Le travail est clôturé par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I :
Les métabolites secondaires
d'origine végétale

Chapitre I : Les métabolites secondaires d'origine végétale

1. Les produits naturels : généralités

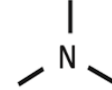
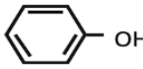
Les produits naturels représentent une classe large et diversifiée d'entités chimiques de sources différentes bactériennes, fongiques, végétales et animales marines, isolés d'organismes vivants. Ils possèdent des diverses activités biologiques qui sont exploitées dans les différents domaines y compris la médecine humaine, vétérinaire et l'agriculture. La chimie des produits naturels étudie leurs biosynthèses, extraction, identification, structure, leurs propriétés physiques et chimiques et leurs aspects réactionnels. **(Anulika et al., 2016)**

Ils sont produits par la voie du métabolisme primaire ou secondaire. Un métabolite primaire est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction des organismes tels que les glucides, les protéines, les graisses et les huiles, l'alcool, etc. Les métabolites secondaires ne participent pas directement à la croissance, au développement et à la reproduction d'un organisme, mais ils ont une fonction généralement écologique. Les métabolites secondaires des plantes peuvent se trouver dans les feuilles, la tige, la racine ou l'écorce de la plante, selon le type de métabolite secondaire produit. **(Anulika et al., 2016)**

2. Les métabolites secondaires

Ce sont des produits naturels distribués de manière discontinue dans le monde végétal. Ils sont considérés comme des composés défensifs des plantes. Ces métabolites participent à la protection des plantes contre les insectes, les herbivores et les conditions environnementales extrêmes. Les métabolites secondaires sont également utilisés par l'homme sous forme de médicaments, de produits pharmaceutiques, produits agrochimiques, des colorants, parfums, arômes, additifs alimentaires, de bio-pesticides...etc. **(Jamloki et al., 2021)**. Les métabolites secondaires peuvent être classés en fonction de plusieurs critères tels que leurs structure chimique (la présence des cycles, contenant un sucre...etc.), leurs compositions (contenant ou non de l'azote), leurs solubilités dans divers solvants, ou de la voie par laquelle ils sont synthétisés ...etc. Généralement en fonction de leurs voies de biosynthèse, Trois grandes familles de molécules sont généralement considérées : Les phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. **(Tiwari et al., 2015)**

Tableau 1: Classification des métabolites secondaires

Groupe	Classification	Structure	Diversité	Sources	Rôles écologiques
Les alcaloïdes	Très diversifiées et complexes mais contenant généralement des N		>12000 composés isolés	Les plantes (300 familles) les bactéries (endophyte) Les champignons	Défense de la plante contre les herbivores en raison de ses propriétés toxiques pour les animaux ou de sa capacité à les dissuader de se nourrir (goût amer), activité antimicrobienne.
Les composés phénolique	Un ou plusieurs cycles aromatiques hydroxylés		>10000 Composés isolés		
Acides phénoliques		C6-C1 ou C6-C3		Plantes, bactéries, champignons	Allélopathie, antibactériens.
Flavonoïdes		C6-C3-C6		Plantes, bactéries, champignons	Pigments et parfums, antioxydants, protecteurs contre l'UV, antifongiques et antibactériens
Les tannins	Polymères				
Terpenoïdes	Basé sur les unités d'isoprène		>30000 composés isolés	Les plantes	Les odeurs et la signalisation chimique entre les plantes et les (in)vertébrés, la résistance aux stress biotiques (insecticides) et abiotiques.
Monoterpènes	Deux unités isoprènes	C10			
Sesquiterpènes	Trois unités isoprènes	C15			
Diterpènes	Quatre unités isoprènes	C20			

2.1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont présents dans la nature, étant l'un des groupes les plus importants dans le monde végétal où ils sont les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes, généralement sous forme d'esters ou de glycosides et non, composés libres. Ils représentent une classe chimique constituée d'au moins un cycle aromatique (C6) portant un ou plusieurs groupes hydroxyle. L'hydrogène des groupes hydroxyles phénoliques est instable grâce au cycle aromatique qui est responsable du caractère d'acide faible des phénols. Ils sont

responsables de plusieurs activités fonctionnelles dans le cycle de vie des plantes, notamment la défense, l'attraction des pollinisateurs et la protection contre les rayons ultraviolets. Ces caractéristiques expliquent leurs larges utilisations commerciales comme agents aromatisants, médicaments naturels et antioxydants, etc. (Mello, 2015)

2.2.1 Classification des phénols

Ils peuvent être classés en fonction du nombre et de l'agencement de leurs atomes de carbone qui sont communément substitués par des sucres et des acides organiques, et ils peuvent être classés en deux groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes. (Crozier *et al.*, 2008). Les phénols simples sont des composés phénoliques dont la structure est faite d'un phényle et d'un ou plusieurs groupements hydroxyles, ils sont hydrosolubles. La plupart des phénols simples sont des monomères des polyphénols et des acides qui composent certains tissus végétaux y compris la lignine et la mélanine, l'hydroquinone, le catéchol, l'orcinol et d'autres phénols simples qui se trouvent à des concentrations relativement faibles. (BuCkingham *et al.*, 2010)

2.1.1.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent le groupe de composés phénoliques végétaux le plus commun et le plus répandu. Ils sont présents dans presque toutes les parties des plantes, en particulier dans les cellules végétales photosynthétiques. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents végétaux, ils sont largement présents dans les fruits, les légumes et certaines boissons. Les flavonoïdes reposent sur un squelette de quinze atomes de carbone constitué de deux cycles benzéniques (A et B, comme le montre **la figure 1** liés par un cycle pyrane hétérocyclique (C). Ils peuvent être divisés en plusieurs classes telles que les flavones (la flavone, l'apigénine et la lutéoline), les flavonols (la quercétine, le kaempférol, la myricétine et la fisétine), les flavanones (la flavanone, l'hespérétine et la naringénine) et autres. Leurs structures générales sont présentées dans le **tableau 1** (Kumar *et al.*, 2013)

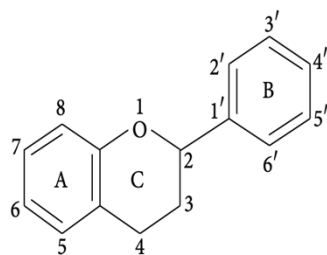


Figure 1: La structure de base des flavonoïdes

Tableau 2: Classification chimique des flavonoïdes

Group of flavanoid	Structure backbone	Examples
Flavones		 Luteolin Apigénine Chrysin
Flavonols		 Quercétine Kaempférol Galangine
Flavanones		 Hesperétine Naringénine
Flavanonol		 Taxifolin
Isoflavones		 Genistéine Daidzéine
Flavan-3-ols		 Catechine Épicatéchine

2.1.1.2 Les tanins

Ce sont des substances naturelles polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000, à saveur astringente. Ils forment une vaste famille de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau aromatique associé à un ou plusieurs groupements phénoliques hydroxylés. Les tanins ayant en commun la propriété de précipiter

les protéines (la gélatine) et se colorent par les sels ferriques. **(Rira, 2019)**. Les tanins ont un rôle de protection contre les prédateurs naturels de la plante comme les bactéries, les champignons, les mammifères herbivores. **(Sabater, 2012)**.

2.1.1.3 Les quinones

Les quinones sont des composés phénoliques dérivées de structures benzoquinone, naphthoquinone ou anthraquinone, ils forment généralement des pigments fortement colorés couvrant l'ensemble du spectre visible. Cependant, elles se trouvent généralement dans les régions internes de la plante et ne donnent donc pas de couleur à l'extérieur de la plante. Les quinones jouent un rôle important dans la respiration des plantes. Ils agissent comme des transporteurs d'électrons qui fonctionnent en se convertissant entre les hydroquinones et les quinones, agissant ainsi comme des couples redox. **(Cseke et al., 2016)**.

2.1.1.4 Les coumarines

Les coumarines appartiennent à une famille très répandue de métabolites secondaires appelée les benzopyranones, avec plus de 1500 espèces représentatives dans plus de 800 espèces. Chez les plantes, ces composés peuvent se trouver dans l'enveloppe des graines, les fruits, les fleurs, les racines, les feuilles, les tiges, bien qu'en général la plus grande concentration se trouve dans les fruits et les fleurs. Leur rôle dans les plantes semble être principalement lié à la défense, étant donné leurs propriétés antimicrobiennes, antiinfectieuses, anti-UV et inhibitrices de germination. **(Tiwari et al., 2015)**

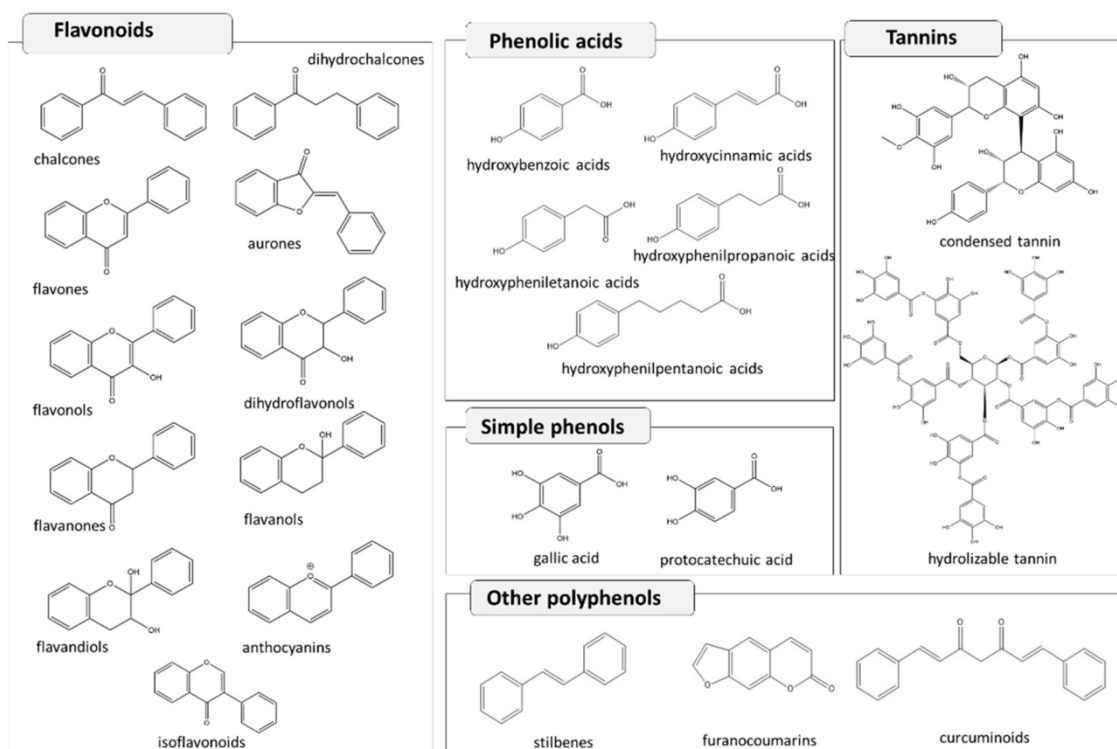


Figure 2: Exemples des composés phénoliques et leur classification

2.2 Les alcaloïdes

Ce sont des métabolites secondaires qui représentent un groupe très important de composés azotés pharmacologiquement actifs, à faibles poids moléculaires. Plus de 12 000 alcaloïdes ont été décrits, ils sont définis comme des composés de base synthétisés par les plantes et contenant un ou plusieurs atomes d'azote hétérocycliques, dérivés principalement d'acides aminés et dans certains cas à partir de bases terpéniques ou puriques et pyrimidiques (Roberts *et al.*, 2013 ; Chowanski *et al.*, 2016).

2.2.1 Classification des alcaloïdes

La classification des alcaloïdes est principalement basée, dans un premier temps, sur la structure du produit de départ puis, plus efficacement, basée sur la biosynthèse des alcaloïdes et donc l'origine du squelette carboné.

2.2.1.1 Les alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes vrais dérivent d'acides aminés, ils comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique, d'origine naturelle, de structure souvent complexe et de caractère basique. Ces substances bioactives se produisent dans les plantes à l'état libre ou sous forme de sels ou sous forme de N-oxydes. Ils sont dotés d'une activité pharmacologique significative

même à faible doses tels que nicotine, morphine, cocaïne. (Bruneton, 2009 ; Glenn et al., 2013).

2.2.1.2 Les proto-alcaloïdes

Ce sont des amines simples élaborés à partir d'acides aminés dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique tels qu'adrénaline, sérotonine, dopamine. Ils sont utilisés dans divers troubles de la santé, notamment les maladies mentales, les douleurs et la névralgie...etc. (Roy, 2017)

2.2.1.3 Les pseudo-alcaloïdes

Ils présentent les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais Leurs squelette carboné de base n'est pas directement dérivé d'acides aminés, ils sont plutôt reliés aux voies des acides aminés où ils sont dérivés par une réaction d'amination ou de transamination tels que la caféine l'éphédrine ...etc. (Dey et al., 2020)

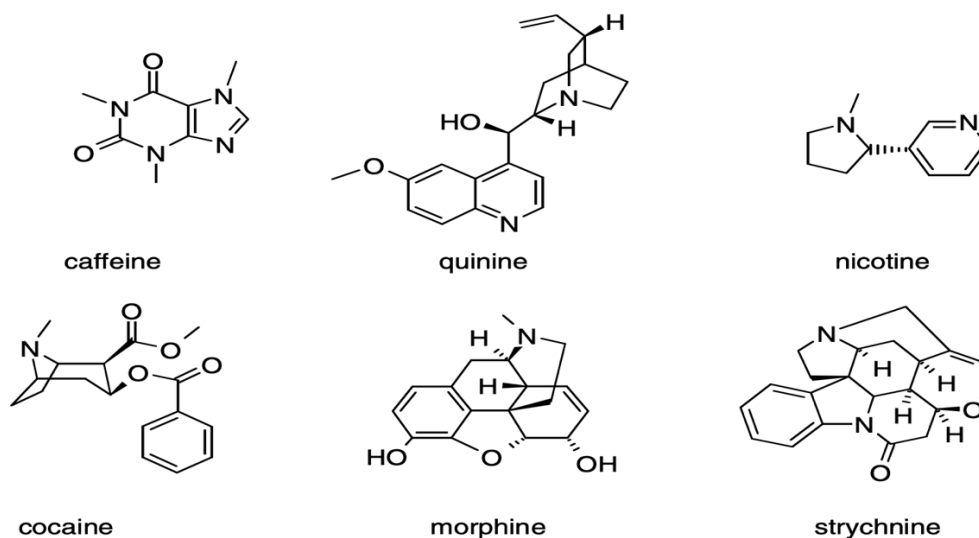


Figure 3: Exemples des alcaloïdes

2.3 Les composés terpéniques

Les terpénoïdes sont un groupe de composés naturels présents presque dans tous les organismes vivants, appelés aussi terpènes ou isoprénoïdes. Plus de 60000 terpénoïdes ont été découverts, ce qui en fait une classe majeure de composés naturels. Les huiles essentielles sont principalement des extraits des terpénoïdes à travers les plantes aromatiques. (Ramar et al., 2010)

2.3.1 Classification des terpénoïdes

La classification primaire des terpénoïdes est basée sur le nombre d'unités de carbone (le nombre d'unités isopréniques) et leurs activités biologiques. On parle d'hémiterpènes (C₅), de mono(C₁₀) qui peut être classée en sous-groupes monocycliques, acycliques et bicycliques. Sesqui(C₁₅), di(C₂₀), tri(C₃₀) et de tétra(C₄₀). Ils interviennent dans les mécanismes de défense contre les bactéries et dans la signalisation mise en place lors des interactions plantes insectes (mono, sesqui et diterpènes). Ces substances sont exploitées industriellement comme colorants, arômes alimentaires et cosmétiques (monoterpènes, tétraterpènes), en thérapeutique pour leurs effets antiinflammatoires, antibactériens (monoterpènes), et anticancéreux (taxoïdes diterpéniques) (Mazid *et al.*, 2011 ; Jahangeer *et al.*, 2021)

Tableau 3: Classification des terpénoïdes

Class	Isoprene Units	Carbon Atoms	Examples
Monoterpene	2	10	Canthor, eucalyptol, geraniol, lavandulol, limonene, menthol, pinene, thymol
Sesquiterpene	3	15	Abscisic acid, bergamotene, cedrol, curcumene, patchoulol, vetivone
Diterpene	4	20	Abietic acid, cafestol, caffeoil, carnosol, gibberellin, phytol
Triterpene	6	30	Betulinic acid, morolic acid, oleanolic acid, ursolic acid, brassinosteroids, saponins
Tetraterpene	8	40	Carotenoids (e.g., α -carotene, β -carotene, crocin, lycopene) and xanthophylls (e.g., lutein, zeaxanthin)

3. Intérêts des produits naturels

Les produits naturels, de différentes variétés structurales, sont utilisés en thérapie depuis la nuit des temps. L'homme utilisait ces produits pour traiter les maladies, comme matières premières pour les médicaments dans l'industrie pharmaceutique, comme additifs alimentaires dans l'industrie alimentaire et comme matières premières pour les pesticides et les cosmétiques ...etc.

3.1 Dans le domaine médical

L'homme utilise depuis bien longtemps des substances présentes dans la nature à des fins médicales. En particulier, les produits naturels ont joué un rôle médical de premier plan dans la plupart des cultures. Avec le développement de la science de la chimie au début du 19^e

siècle, il est devenu possible d'examiner de plus près les matières végétales afin d'identifier les constituants biologiquement actifs et de comprendre leurs mécanismes d'action. **(Beutler, 2019)**

Les plantes médicinales produisent un large choix de composés végétaux, notamment des alcaloïdes, des flavonoïdes, des acides phénoliques, des saponines, des glycosides, des polysaccharides et des tannins, qui font l'objet d'études approfondies pour leurs effets bioactifs. Ils sont aujourd'hui la principale source de découverte de produits candidats prometteurs et jouent un rôle impératif dans les programmes de développement de médicaments à venir. Ils ont un faible coût, une facilité d'accès et moins d'effets secondaires. Les propriétés pharmacologiques validées des produits naturels sont antivirus, antifongique, antibactérien, piégeage des radicaux libres et effet antitoxique, effets gastro-protecteurs, anti-inflammatoires, effets hépato-protecteurs, activités antidiabétiques, des effets cardio-protecteurs, des effets radio-protecteurs, des effets chimio-préventifs, des effets anti-clastogènes, des effets antinéoplasiques, des effets neuro-psycho-pharmacologiques, des effets antipyrétiques, des effets anti-diarrhéiques, une activité anti-fertilité, des effets antiallergiques, des effets hypolipidémiques ...etc. **(Pal, 2021)**

3.2 Dans le domaine de cosmétologie et parfumerie

Les produits naturels bioactifs, utilisés dans la production de produits à base de plantes, ont aujourd'hui gagné une acceptation et une popularité croissante, ils sont vendus comme des produits cosmétiques à base de plantes. Les composants phénoliques tels que la quercétine, le kaempferol et les glucides comme le glucose, l'acide galacturonique, l'arabinose et le rhamnose sont des substances présentes dans la composition chimique de nombreuses plantes médicinales exploitable par l'industrie cosmétique en tant que produits anti-âge et hydratants. **(Pal et al., 2021)**. Les produits naturels plus précisément les huiles essentielles, matières premières par excellence des parfumeurs, sont classées en fonction de leurs odeurs, Le jasmin, la lavande, le myrte, le girofle et les roses ... etc. présentent un potentiel industriel pour des plusieurs pays tels que la France et les Etats-Unis. **(Fernandez et al., 2012)**

3.3 Dans le domaine agroalimentaire

Les métabolites secondaires sont aussi utilisés dans le domaine agroalimentaire, ils forment les arômes, les épices, les conservateurs, les épaississant, les émulsifiants, les compléments nutritifs et les colorants alimentaires. Les huiles essentielles sont utilisées également dans la conservation. **(Gok et al., 2013)**.

4. La plante *Zizyphus Lotus*

4.1 Présentation de la plante

Lotus Zizyphus (*Z. Lotus*), également connu sous le nom de jujube et appelé localement « sedra » aussi appelé dans les pays arabes : Sidr, Nabk, Anneb. , est un arbuste fruitier, épineux appartient à la famille des angiospermes Rhamnaceae. Cette famille comprend environ 135-170 espèces de *Zizyphus*.

4.2 Répartition géographique

En tant que plante tropicale et subtropicale, *Z. Lotus* pousse généralement dans les climats arides et semi-arides, grâce à leurs capacités de résistance à la sécheresse et à leurs mécanismes physiologiques et morphologiques d'adaptation. (Abdoul-Azize, 2016). *Z.lotus* est une espèce méditerranéenne et subtropicale. Cette espèce est spontanée dans le Sud de L'Espagne et du Portugal, en Sicile, en Grèce et surtout en Afrique du Nord, l'Algérie, le Maroc, la Tunisie et la Libye. (Bakhtaoui *et al.*, 2014). Localement, est répandu dans toute l'Algérie sauf le Tell Algéro-constantinois, surtout dans les régions arides d'Algérie du Sud, Ain Ouessara et Maessad (willaya de Djelfa) à climat aride et Taghit wilaya de Bechar au climat Saharien. (Mounni., 2008)

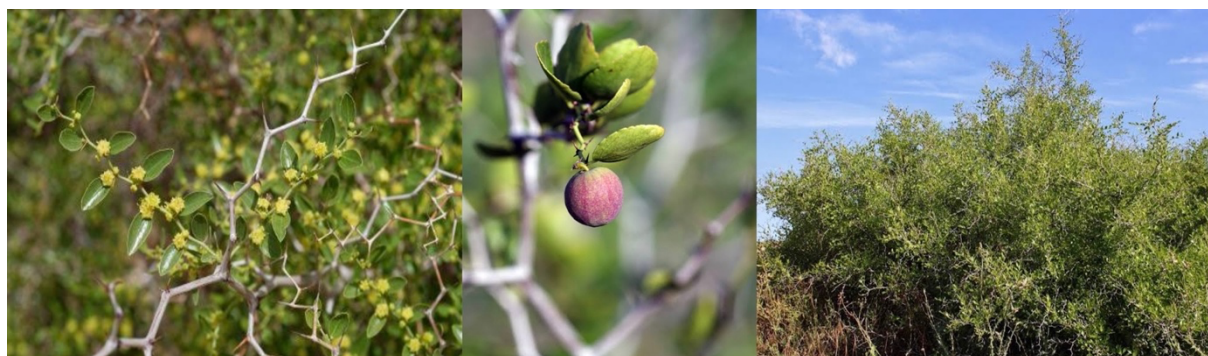


Figure 4: La Plante *Zizyphus Lotus* en image

4.3 Description botanique

Le jujubier est une plante frutescente de 1,3 à 2,2 m, très ramifiée épineux. Les rameaux sont recourbés vers le bas, flexueux, blanc grisâtre à épines par paires droites ou recourbées. Les feuilles sont petites, alternes, obtuses, crénelées, à trois nervures, glabres, faiblement rigides, de 7 à 9 mm de large et de 9 à 13 mm de long, à pétiole court. La floraison est au mois de mai, les fleurs sont réunies en grappes, elles sont de couleur jaune pâle. Les fruits sont des drupes sphériques dont les noyaux osseux biloculaires, petits et ronds sont recouverts d'une pulpe

demi-charnue, très vite sèche, de couleur marron à goût délicieux riche en sucre. **(Ghedira., 2013)**

4.4 Composition chimique et activités biologiques

Au cours des dernières années, plusieurs études scientifiques ont été menées sur la présence de nombreuses molécules biologiquement actives provenant de *Z. lotus* qui pourraient avoir un fort potentiel dans la nutrition humaine, la santé et le traitement des maladies tels que la bronchite et le diabète. En phytothérapie, les propriétés des composés bioactifs des plantes dépendent de la partie de la plante concernée (racine, tige de la feuille, pulpe ou fruit) et du type d'extrait utilisé. *Lotus Z* est connu pour sa teneur élevée en polyphénols présentant des propriétés anti-oxydantes, antimicrobiennes et immuno-modulatrices. Il est important de noter que d'autres molécules biologiquement actives, en particulier des alcaloïdes cyclo peptidiques, appelés lotusines, des saponines dammaranes, et divers flavonoïdes ont été isolés de cet arbuste, ainsi que des acides gras polyinsaturés (acide oléique et acide linoléique), des glucides élevés et des fibres qui sont abondants dans les extraits de graines et dotés d'effets anti-ulcérogènes et antioxydants. **(Abdoul-Azize, 2016)**

En médecine traditionnelle, plusieurs parties de *Z. lotus* sont données comme agents anti troubles urinaires, anti-diabète, anti-fièvre, anti-diarrhée, agents insomniaques, sédatifs, et pour la bronchite. Récemment, plusieurs études scientifiques ont montré les bienfaits de cette plante pour la santé et le potentiel nutritionnelle des composés bioactifs de ce jujube **(Abdoul-Azize, 2016)**. En effet la poudre de feuilles séchées est mélangée avec le lait ou de l'eau pour le traitement de diabète .Les fruits et les feuilles de la plante sont utilisées également comme émoullients. Ainsi pour le traitement des maladies intestinales et diarrhées. Le jus des racines de cette plante est efficace pour le traitement des leucomas des yeux. **(Ghedira., 2013)**

Tableau 4: Composition chimique des différentes parties de *Zizyphus lotus*. (Ghedira., 2013)

Familles de constituants	Constituants principaux
Écorces de racines	
Alcaloïdes cyclopeptidiques	Lotusines A à G, lotusanines A et B, sanjoinénine, sanjoinine, franguloline
Saponosides	Lotosides I et II ; jujubosides A et C
Feuilles	
Saponosides	Jujuboside B, 3-O-R-L-rhamnopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyljujubo-génine-20-O-(2,3,4-O-triacétyl)-R-L-rhamnopyranoside, 3-O-R-L-rhamnopyranosyl-(1→6)- α -D-glucopyranosyljujubogénine-20-O-R-L-rhamnopyranoside, 3-O-R-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[(4-sulfo)- α -D-glucopyranosyl-(1→3)]-R-L-arabinopyranosyl-jujubogénine, 3-O-R-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[(4-sulfo)- α -D-glucopyranosyl-(1→3)]- α -D-galactopyranosyl-(20R,22R)-16 α ,22:16R,30-diépoxydammar-24-ène-3 α ,20-diol
Flavonoïdes	Quercétine (4p-O-[α -L-rhamnopyranosyl]-3-O-[6-O-(α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl])
Divers	β -tocophérol (Vit E), acide linoléique
Graines	
Acides gras (32,9 %)	Acide oléique (61,93 %), acide linoléique (18,31 %), acide palmitique (9,14 %)
Protéines (19,1 %)	3 protéines riches en thréonine, acide glutamique, leucine, arginine et acide aspartique
Stérols	Δ 7-campestérol et β -sitostérol
Divers	β -tocophérol (Vit E), acide ascorbique (Vit C), carbohydrates (40,8 %)
Fruit (pulpe)	
Acides gras	Acide linoléique
Vitamines	Rétinol (Vit A), acide ascorbique (Vit C)

Chapitre II :
Les radicaux libres et le
stress oxydatif

Chapitre II : Les radicaux libres et le stress oxydatif

1. Les radicaux libres

1.1 Généralités

Sur le plan chimique, les radicaux libres sont des atomes, des molécules ou des ions avec des électrons non appariés qui peuvent avoir une charge positive, négative ou nulle. Le nombre impair d'électrons d'un radical libre le rend instable, éphémère et très réactif. En raison de cette grande réactivité, ils peuvent extraire des électrons d'autres composés pour atteindre la stabilité. Ainsi, la molécule attaquée perd son électron et devient elle-même un radical libre, ce qui déclenche une réaction en chaîne en cascade qui finit par endommager la cellule vivante. (Schmidt *et al.*, 2016; Phaniendra *et al.*, 2015)

1.2 Sources des radicaux libres

La principale source de radicaux libres dans l'organisme est le métabolisme physiologique, mais ils peuvent également être générés par l'exposition à des facteurs externes tels que les bactéries, les rayonnements ionisants et ultraviolets, la pollution alimentaire et atmosphérique, l'alcool et le tabagisme. Les tissus buccaux étant le principal orifice d'ingestion des aliments, ils sont fréquemment exposés aux radicaux libres après la consommation de boissons et d'aliments, ce qui peut entraîner des effets néfastes sur la santé. D'autres sources de ces radicaux dans l'environnement buccal peuvent également inclure les médicaments, les drogues, les traitements dentaires, ainsi que le matériel dentaires ...etc. (Zukowski *et al.*, 2018)

1.3 Classifications

Généralement, les éléments radicalaires sont subdivisés en deux groupes, les dérivés d'oxygène et les dérivés d'azote. Les radicaux libres, les plus importants, produits au cours des réactions métaboliques sont les espèces dérivées de l'oxygène (les ROS). Les ROS et les RNS peuvent être classés en deux groupes de composés : les radicaux et les non-radicaux. Les radicaux sont les espèces qui contiennent au moins un électron non apparié dans les couches autour du noyau atomique et qui sont capables d'une existence indépendante. La molécule d'oxygène elle-même est un radical et, en raison de la présence de deux électrons non appariés, elle est appelée bi-radical. Parmi les exemples de radicaux, citons le superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical oxygène ($O_2^{\cdot \cdot}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le radical alkoxy (RO^{\cdot}), le radical peroxyde (ROO^{\cdot}), l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) et le dioxyde d'azote (NO_2^{\cdot}).

La forte réactivité de ces radicaux est due à la présence d'un électron non apparié qui a tendance à le donner ou à obtenir un autre électron pour atteindre la stabilité. Les espèces non radicalaires comprennent le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'acide hypochloreux (HOCl), l'acide hypobromeux (HOBr), l'ozone (O₃), l'oxygène singulet (1O₂), l'acide nitreux (HNO₂), le cation nitrosyle (NO⁺), anion nitroxyle (NO⁻), trioxyde de diazote (N₂O₃), tétraoxyde de diazote (N₂O₄), cation nitronium (nitryle) (NO₂⁺), peroxydes organiques (ROOH), aldéhydes (HCOR) et peroxydinitrite (ONOOH). Ces espèces non radicalaires ne sont pas des radicaux libres mais peuvent facilement conduire à des réactions radicalaires dans les organismes vivants. **(Phaniendra *et al.*, 2015)**

Tableau 5: Différents types des espèces réactives (Gutowski et Kowalczyk., 2013).

Espèce radicalaires		Espèce non radicalaires	
Nom	Symbole	Nom	Symbole
Anio superoxyde	O ₂ ^{•-}	Acide hypochlorique	HOCl
Monoxyde d'azote	NO [•]	Oxygène singulet	O ₂
Radical alkoxyde	RO [•]	Pyroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Radical hydroxyle	OH [•]	Peroxyde organique	ROOH
Radical peroxyde	ROO [•]	peroxydinitrite	ONOO ⁻

2. Les antioxydants

2.1 Généralités

Les antioxydants sont des substances capables de contrecarrer les effets néfastes du processus physiologique d'oxydation. L'oxydation est une réaction chimique qui peut produire des radicaux libres, entraînant ainsi des réactions en chaîne capables d'endommager les cellules de l'organisme. Ces antioxydants sont généralement des nutriments (vitamines et minéraux) ou des enzymes (protéines) présents dans notre organisme qui participent aux réactions chimiques. Ils jouent un rôle dans la prévention du développement de maladies chroniques telles que le cancer, le diabète, les maladies cardiaques, la maladie d'Alzheimer ... etc. **(kumar *et al.*, 2017 ; Salehi *et al.*, 2018)**

2.2 Sources des antioxydants

2.2.1 Antioxydants endogènes

Il existe plusieurs antioxydants piégeux produits dans l'organisme lui-même. L'organisme s'appuie sur plusieurs mécanismes de défense endogènes pour se protéger des dommages cellulaires induits par les radicaux libres, ils les transforment en molécules bénignes.

Les principaux antioxydants endogènes enzymatiques comprennent le superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase (CAT).

2.2.2 Antioxydants exogènes

Les antioxydants exogènes peuvent dériver de sources naturelles (aliments et plantes, vitamines, flavonoïdes, anthocyanines, certains composés minéraux), mais peuvent aussi être des composés synthétiques comme le butylhydroxyanisole, le butylhydroxytoluène, les gallates, etc. Les antioxydants présentent un intérêt croissant, notamment ceux destinés à prévenir les effets nocifs présumés des radicaux libres dans le corps humain. (Yadav *et al.*, 2016 ; Sanjay *et al.*, 2021)

2.3 Classification des antioxydants

A l'heure actuelle, divers antioxydants sont présents dans les aliments, à savoir les antioxydants naturels, les antioxydants synthétiques, les antioxydants alimentaires et les antioxydants endogènes, ils jouent un rôle important dans la conservation des aliments.

2.3.1 Antioxydants d'origine naturelle

Les antioxydants sont présents en abondance dans les fruits et légumes, ainsi que dans d'autres aliments, notamment les noix, les céréales et certaines viandes, volailles et poissons. Les vitamines C et E, le β -carotène et le coenzyme Q10 sont les antioxydants les plus courants de l'alimentation. (Rasheed *et al.*, 2019). Le système antioxydant naturel se divise en deux grands groupes, enzymatique et non enzymatique.

2.3.1.1 Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques comprennent les antioxydants à action directe, ils sont extrêmement importants dans la défense contre le stress oxydatif. La plupart d'entre eux, notamment l'acide ascorbique et l'acide lipoïque, les polyphénols et les caroténoïdes, proviennent de sources alimentaires. La cellule elle-même synthétise une minorité de ces molécules. (Atta *et al.*, 2017)

2.3.1.2 Antioxydants enzymatiques

Les enzymes antioxydantes sont capables de stabiliser ou de désactiver les radicaux libres avant qu'ils n'attaquent les composants cellulaires. Elles agissent en réduisant l'énergie des radicaux libres ou en leurs sacrifiant certains de leurs électrons, ce qui les rend stables. En outre, ils peuvent également interrompre la réaction en chaîne oxydante pour réduire les

dommages causés par les radicaux libres. En réduisant l'exposition aux radicaux libres et en augmentant la consommation d'aliments riches en enzymes antioxydantes ou de suppléments d'enzymes antioxydantes, le potentiel de notre organisme à réduire le risque de problèmes de santé liés aux radicaux libres devient plus palpable. (Atta et al., 2017)

2.3.2 Antioxydants d'origine synthétique

Ce sont des produits synthétisés chimiquement, ils n'existent pas dans la nature, ils sont ajoutés aux aliments comme conservateurs pour aider à prévenir l'oxydation des lipides. Ces antioxydants se répartissent en deux grandes catégories selon leur mode d'action : les antioxydants primaires et les antioxydants secondaires. Les antioxydants primaires, qui empêchent la formation de radicaux libres lors de l'oxydation. (Yadav et al., 2016)

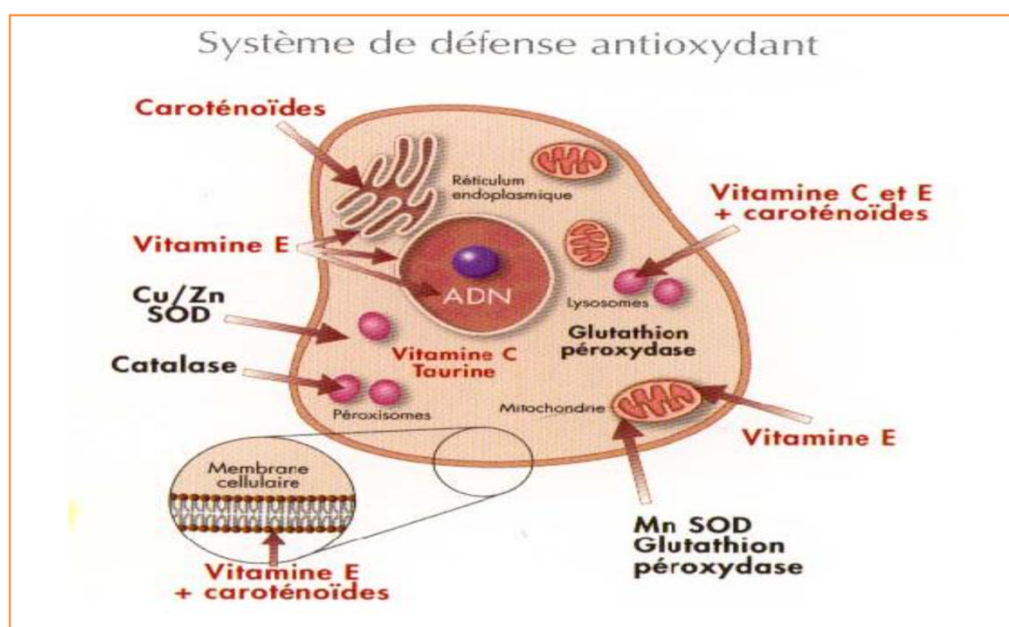


Figure 5: Sites d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes anti oxydantes (en noir) (Opara., 2002)

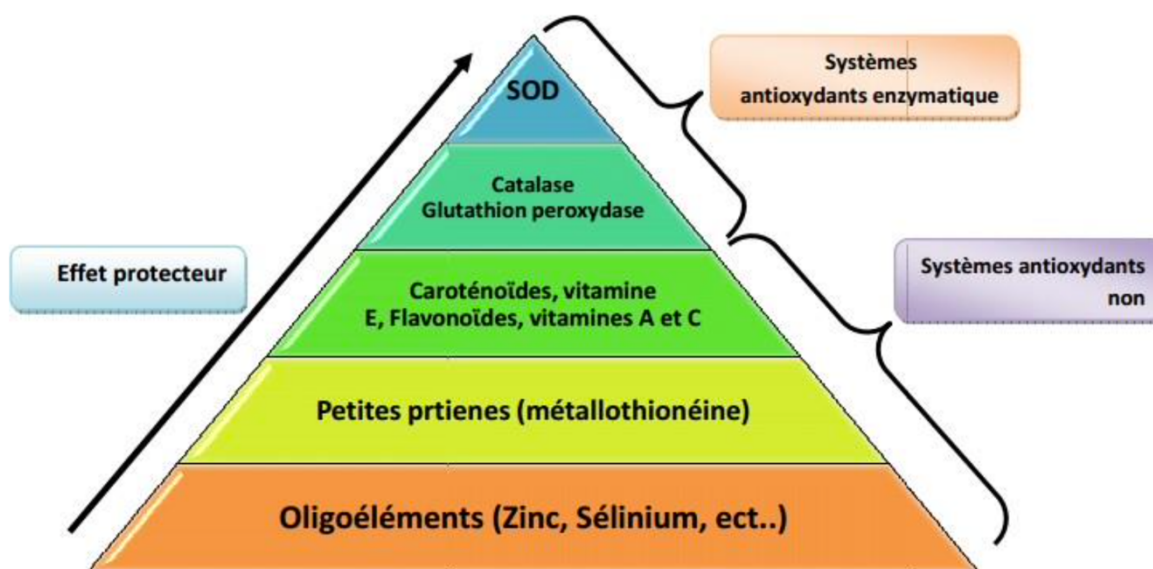


Figure 6: Pyramide des systèmes de défenses antioxydants.

3. Le stress oxydatif

3.1 Généralités

Le stress oxydatif, parfois appelé stress oxydant, est généralement défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Cette situation peut être due à une augmentation de production des radicaux libres ou à une diminution des défenses antioxydants. (Orban, 2010) Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même l'exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants comme le tabac, l'alcool, les médicaments, les rayons gamma, les rayons ultraviolets, les herbicides, l'ozone, l'amiante ou les métaux lourds toxiques). (Favier, 2009). Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique. (Pincemail et al., 2013)

3.2 Effets néfaste sur la santé humaine

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies telles que les troubles inflammatoires, les infections, le diabète, l'athérosclérose, l'hypertension, le cancer, les troubles métaboliques et de nombreuses autres maladies liées au mode de vie, la plupart de

ces maladies apparaissent avec l'Age car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux libres. En cas de maladie, une production excessive et non régulée d'oxydants se produit. Le système de piégeage (les agents enzymatiques et non enzymatiques) ne parvient pas à contrôler les oxydants, ce qui entraîne des lésions tissulaires continues. (Sujita *et al.*, 2019 ; Favier, 2013)

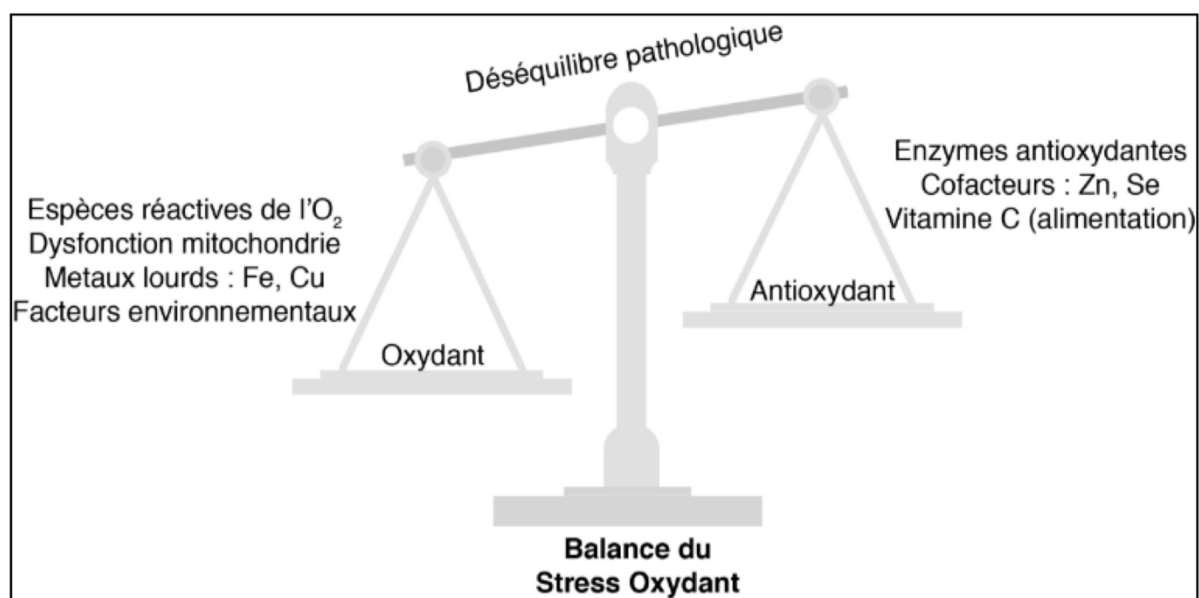


Figure 7: Balance radicaux libres/ antioxydants

4. Stress oxydatif et maladies chroniques

On appelle une maladie chronique une maladie ou un état qui dure habituellement 3 mois ou plus et qui peut s'aggraver avec le temps. Les maladies chroniques ont tendance à se manifester chez les adultes et les âgés, elles peuvent généralement être contrôlées mais pas guéries. Les types les plus courants de maladies chroniques sont le cancer, les maladies cardiaques, le diabète et l'arthrite. Le stress oxydant est un des facteurs déclenchant et/ou potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles et chroniques tels que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires ...etc.

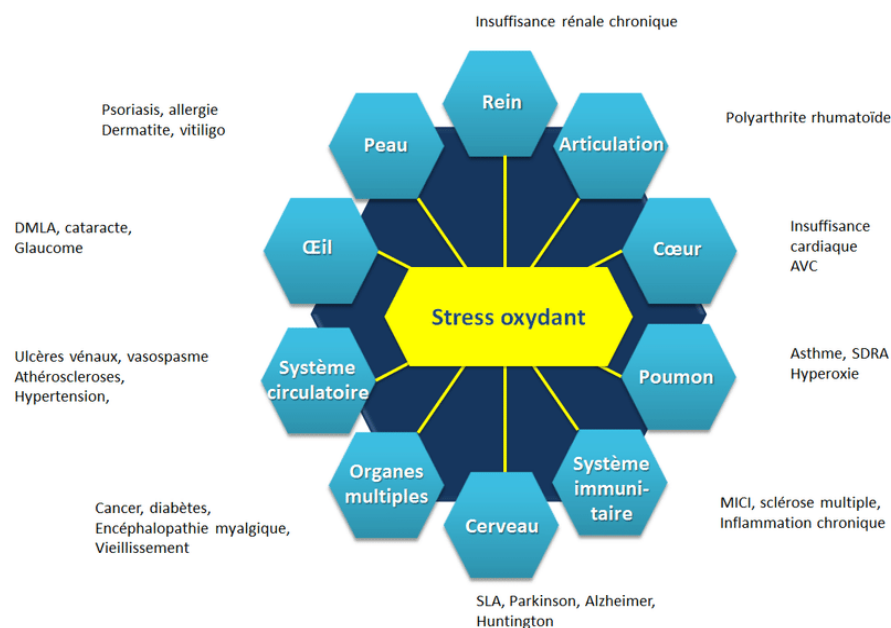


Figure 8: Pathologies liées au stress oxydatif

4.1 Le Diabète

Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. L'insuline est une hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang. L'hyperglycémie, ou concentration sanguine élevée de sucre, est un effet fréquent du diabète non contrôlé, il conduit avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins. **(OMS)**. Le dépistage du diabète est réalisé grâce à une prise de sang à jeun. On parle de diabète lorsque la concentration de glucose à jeun dans le sang veineux est supérieure à 1,26 g/l. Au cours de son évolution, le diabète peut engendrer de nombreuses complications touchant le cœur, les reins ou les yeux. **(IVS, 2010)**. Il existe plusieurs types de diabète dont les plus importants sont de type 1 et 2.

4.1.1 Diabète type 01

Autrefois appelé diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile. Ce type de diabète est caractérisé par une absence ou une trop faible production d'insuline par les cellules du pancréas. Il débute généralement chez l'enfant ou le jeune adulte, mais il peut survenir à tout âge, souvent de façon brutale accompagné de troubles de la vision et d'une fatigue inhabituelle. Il s'apparente à une maladie auto-immune où les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (synthétisant l'insuline) sont détruites par le système immunitaire. L'insuffisance de sécrétion d'insuline dans

le sang rend donc le patient diabétique de type 1 insulino-dépendant. Le risque de transmission génétique de ce type de diabète est faible (autour de 5 %). (Ali *et al.*, 2013 ; Dagorne *et al.*, 2014)

4.1.2 Diabète type 02

Appelé également le diabète non insulino-dépendant, c'est la forme la plus répandue, représentant près de 90 % des formes diagnostiquées de diabètes. Il se caractérise par une résistance à l'insuline progressivement acquise au cours de la vie, il peut évoluer vers une insulino-pénie, c.-à-d. une trop faible production d'insuline par le pancréas, grâce à un épuisement des cellules sécrétrices d'insuline. Il en résulte une hyperglycémie chronique. Le diabète de type 2 est souvent associé à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire, comme l'hypertension artérielle, le surpoids et l'obésité, la dyslipidémie et le syndrome métabolique. (Tenenbaum *et al.*, 2018)

4.1.3 Le diabète gestationnel

C'est une forme qui ne se déclare qu'au cours d'une grossesse. L'organisation mondiale de la santé (OMS) définit le diabète gestationnel comme « un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse et qui est un facteur de risque pour le nouveau-né, quels que soient le traitement nécessaire et l'évolution dans le post-partum. (Fougere, 2019 ; IDF)

4.1.4 Modes de traitement

Le diabète type 1 se traite par des injections quotidiennes d'insuline ou par l'utilisation d'une pompe à insuline et par un régime alimentaire spécial. De nos jours, différents traitements, tels que l'insulinothérapie (des injections quotidiennes d'insuline), la pharmacothérapie et la diététique, sont disponibles pour contrôler le diabète. Il existe plusieurs types de médicaments hypoglycémisants qui exercent des effets antidiabétiques par différents mécanismes. Ces mécanismes comprennent la stimulation de la sécrétion d'insuline par les sulfonyles et les méglitinides, l'augmentation de l'absorption périphérique du glucose par les biguanides et les thiazolidinediones, le retardement de l'absorption des glucides dans l'intestin par l'alpha-glucosidase et la réduction de la gluconéogenèse hépatique par les biguanides. Au cours de ces dernières années, malgré les progrès significatifs réalisés dans le traitement du diabète, les résultats du traitement chez les patients sont encore loin d'être parfaits. (Kooti *et al.*, 2016)

4.2 L'Alzheimer

4.2.1 Généralité

La maladie d'Alzheimer (MA) est une affection cérébrale progressive et irréversible du système nerveux central, elle survient généralement à un âge avancé. Débutant souvent par des troubles de la mémoire des faits récents, elle provoque progressivement des troubles des fonctions exécutives (organisation et programmation), du langage, des praxies et de la reconnaissance. À côté des troubles cognitifs, on observe également des troubles de l'humeur et du comportement (repli sur soi, apathie, symptômes dépressifs...) et des troubles neurologiques (de l'équilibre, de la marche). (Gzil, 2009 ; Ashraf *et al.*, 2019). Les caractéristiques neuropathologies principales de la MA sont constituées de deux types d'agrégats protéiques (les plaques extracellulaires de protéine β –amyloïde et les dépôts neurofibrillaires intracellulaires, DNF) ainsi que l'activation microgliale (neuroinflammation) et la mort neuronale. (Delrieu *et al.*, 2020)

4.2.2 Modes de traitement

La recherche thérapeutique dans la MA peut se schématiser en 3 grandes périodes :

- De 1990 à 2000 où la majorité des essais thérapeutiques étaient centrés sur la recherche d'un traitement symptomatique de la MA visant à compenser le déficit de certains neurotransmetteurs.
- De 2000 à 2010 où la recherche était axée sur la recherche d'un traitement « disease modifying », c'est-à-dire ciblant les processus physiopathologiques présumés de la MA comme la pathologie amyloïde.
- De 2010 à nos jours qui est dans la continuité de la précédente période avec cependant l'apport diagnostique mais également comme un critère de jugement des biomarqueurs de la MA. (Delrieu *et al.*, 2020)

Chapitre III :

Matériels et méthodes

Chapitre III : Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

1.1 Récolte de la matière végétale

Notre étude a été réalisée sur les parties aériennes d'une plante médicinale collectée dans son habitat naturel d'une région particulière du Sahara d'Algérie en printemps 2021.

L'identification botanique de la plante a été réalisée par Dr. Kadi Imad Eddine aidé par un spécialiste en botanique à l'université frères Mentouri Constantine.



Figure 9: Région de récolte de la plante

1.2 Préparation de la matière première

Après le lavage de la partie aérienne de la plante récoltée et afin de la débarrasser de la poussière et d'autres impuretés, elle a été mise en séchage à l'abri de la lumière et de l'humidité et de toutes sources d'énergie, à température ambiante durant deux semaines. Ensuite broyée finement

à l'aide d'un broyeur afin d'obtenir une poudre fine. Un spécimen d'herbier a été archivé à l'Herbarium du centre de recherche en biotechnologie.

1.3 Extraction des principes actifs

Pour l'extraction des principes actifs, deux types d'extraits ont été préparés l'extrait Méthanolique et l'extrait aqueux. 100g de la matière végétale sèche a été laissée dans le méthanol (100%) et l'eau distillé (100%) pendant 48 heures avec une répétition de trois fois en renouvelent le solvant .Le macérât obtenu a été filtré à l'aide d'un papier filtre (n°4). Le filtrat obtenu a été ensuite séché par un Rotavapor (35°C / 130 mbar) pour l'extrait Méthanolique et (35°C / 0 mbar) pour l'extrait aqueux.

2. Dosage

2.1 Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est effectué selon la méthode du réactif de Folin- Ciocalteu (FCR), adaptée au lecteur des microplaques de 96 puits, a été sélectionnée pour estimer la teneur en phénols totaux de nos extraits (**Singleton *et al.*, 1965**). Un volume de 20 µl d'extrait (1 mg /1 ml de méthanol) est ajouté à 100 µl de FCR dilué (1/10), ensuite un volume de 75 µl de carbonate de sodium (7,5%) est additionné, l'ensemble a été laissé à l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). L'acide gallique a été utilisé comme contrôle positif, à partir de lequel une courbe d'étalonnage a été tracé. Les résultats sont exprimés en µg équivalent de l'acide gallique par mg d'échantillon (µg EAG/mg).

2.2 Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par le protocole décrit par **Topçu *et al.*, 2007** adoptés aux micro-volumes. Dans chaque puits, on a mis le mélange de 50 µl de l'échantillon avec 130 µl de méthanol, 10 µl d'acétate de potassium (CH₃COOK) et 10 µl de nitrate d'aluminium Al(NO₃)₃.L'ensemble a été mis à température ambiante pendant 40 min. L'absorbance a été mesurée à 415 nm. La Quercétine, le standard de choix a été utilisé pour tracer la courbe d'étalonnage, il a été préparé de la même manière que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en µg équivalent de Quercétine par mg d'extrait (µg EAG/mg).

3. Activités biologiques

3.1 Activité antioxydante

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des composés phénoliques des échantillons étudiés, cinq tests *in vitro* ont été réalisés pour chaque échantillon : le test de DPPH, le pouvoir réducteur FRAP et le Mécanisme de transfert des protons ABTS, Phénanthroline et SNP (Mécanisme de transfert des électrons).

3.1.1 Piégeage du radical stable, le DPPH

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le réactif le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité du protocole (Molyneux., 2004).

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par Blois *et al.*, 1958 sur une microplaque à 96

Puits, une solution de 160 µl du DPPH• (A=0.7) a été mélangé à l'abri de la lumière avec 40 µl de l'échantillon à différentes concentrations. Le mélange a été maintenu à une température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le BHA, le BHT et la vitamine E ont été utilisés comme standards. La formule, en dessous, permet de déterminer le pourcentage d'inhibition.

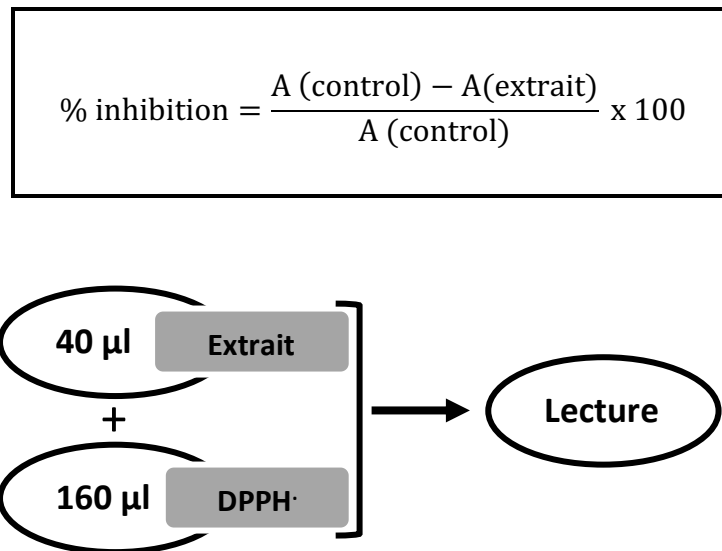


Figure 10: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (DPPH)

3.1.2 Piégeage du radical ABTS

Le piégeage du radical ABTS est déterminé selon la méthode de **Re et al., 1999**. Un volume de 40µl d'extrait a été additionné à 160 µl d'ABTS •+ (A=0.7). Le mélange a été incubé pendant 10 min à 25°C puis les absorbances ont été mesurées à 743nm en utilisant le BHA et le BHT comme standards. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la même formule précédente.

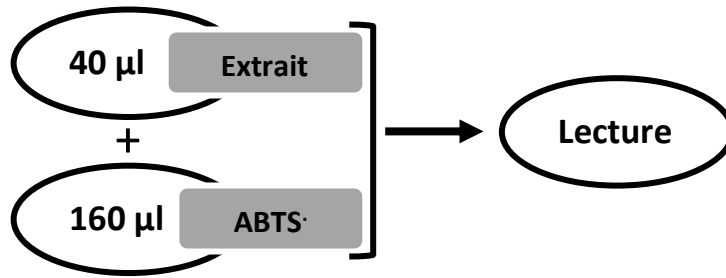


Figure 11 : Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (ABTS)

3.1.3 Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Le protocole expérimental suivi est celui d'Oyaizu (1986), 10 µl de solution de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 40 µl de tampon phosphate (pH=6,6) et 50 µl de solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble a été incubé dans l'étuve à 50 °C pendant 20 minutes, la réaction est stoppée par l'addition de 50 µl d'acide trichloracétique TCA (10%), 40 µl ml d'eau distillée et 10 µl de chlorure de fer anhydre $FeCl_3$ (0,1%), l'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 700 nm contre un blanc semblablement préparé de la même manière. Les résultats ont été calculés à titre de $A_{0,50}$ (µg/ml). Les vitamines C et E ont été utilisés comme standards.

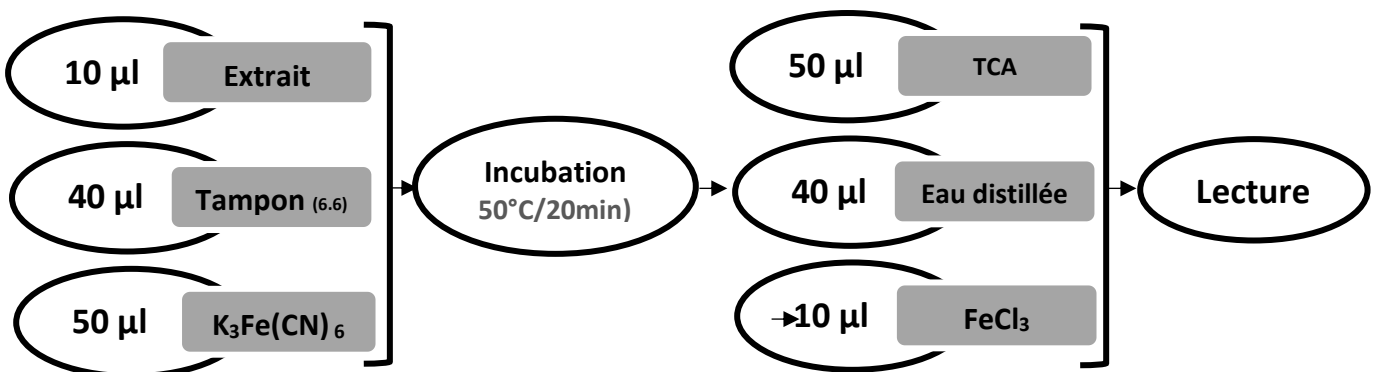


Figure 12: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (FRAP)

3.1.4 Activité de réduction par formation du complexe Fe⁺²-Phenanthroline

L'activité est déterminée selon la méthode de **Szydłowska-Czerniak *et al.*, (2008)**. Un volume de 10 µl de l'extrait à différentes concentrations ont été ajoutés à une solution de 50 µl de chlorure de fer anhydre FeCl₃ (0.2%), avec 30 µl Phenanthroline (0.5%) et 110 µl de méthanol. Le mélange obtenu est incubé dans l'étuve à 30°C pendant 20 min. L'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards. Les résultats ont été exprimés à titre de **A_{0,50}**.

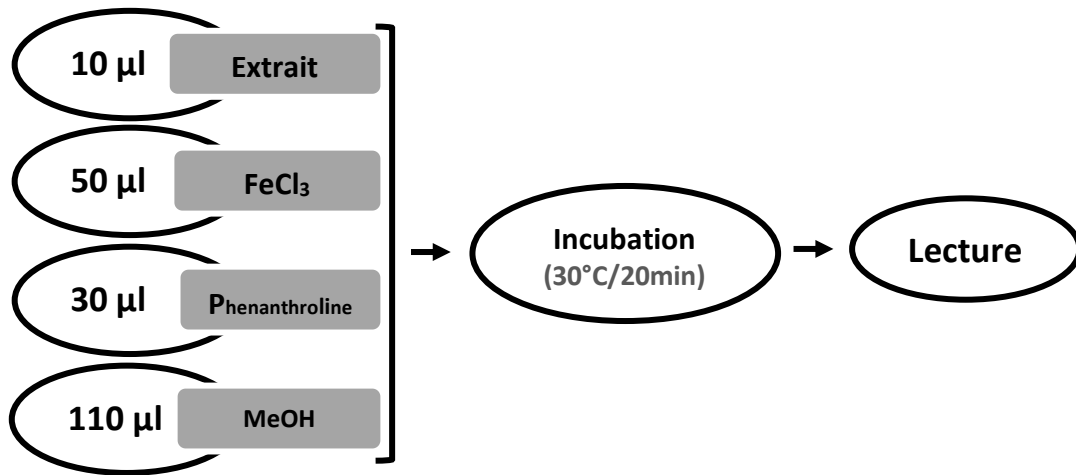


Figure 13: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (Fe⁺²-Phenanthroline)

3.1.5 Activité de réduction de l'Ag⁺ en nanoparticule d'Argent sphérique (SNP)

Selon la méthode décrite par **Mustafa Özyürek *et al.*, 2012**, nous avons évalué la réduction de l'Ag⁺ en nanoparticules d'argent sphériques par nos extraits. On a préparé une solution contenant 50 ml de (AgNO₃ (1.0 mM)) chauffé sur plaque chauffante pendant 10 min, après 5 ml de trisodium citrate (1%) a été ajouté goutte à goutte jusqu'à le virage de la couleur vers le jaune pâle (solution SNP). Après refroidissement, un volume de 20µl d'extrait, 130µl de la solution SNP et 50µl d'eau distillée ont été mélangés. L'ensemble a été incubé à 25°C pendant 30 min. le Trolox a été utilisé comme standard dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

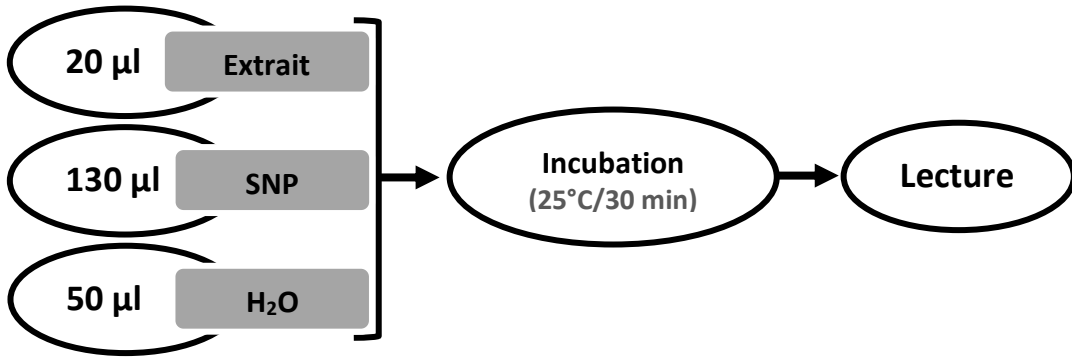


Figure 14: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (SNP)

3.2 Activité enzymatique

3.2.1 Activité antidiabétique via l'inhibition de l' α -amylase

La technique utilisée dans le cadre de ce travail est selon la méthode détaillée par **Zengin *et al.*, (2014)**. Sur une microplaque, un volume de 25 μ l d'extrait a été mélangé avec 50 μ l d'une solution d' α -amylase (1U), puis incubé à 37°C pendant 10 min. ensuite 50 μ l d'amidon (0,1%) une deuxième incubation pendant 10 minutes à 37°C a été maintenue. Après on a ajouté 25 μ l d'acide hypochlorique HCl (1M) et 100 μ l d'iodure de potassium iode IKI. L'absorbance a été mesuré à 630 nm. Le pourcentage d'inhibition de l' α -amylase a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{(Ac - Ae) - (As - Ab)}{(Ac - Ae)}$$

- Ac : Absorbance [Amidon+IKI+HCl+MeOH+Tampon]
- Ae : Absorbance [Enzyme+Amidon+IKI+HCl+ MeOH]
- As : Absorbance [Enzyme+Extrait+Amidon+IKI+HCl]
- Ab : Absorbance [Extrait+IKI+ tampon]

Tableau 6 : L'organisation de microplaque dans le test de α -amylase

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
A	Extrait 01 (As)			Blanc extrait 01 (Ab)		Extrait 02 (As)			Blanc extrait 02 (Ab)		Extrait 03			Blanc extrait 03 (Ab)	
B															
C															
D															
E															
F															
G	Ae			Ac			Ac			Ac					
H															

Tableau 7: Mode de remplissage de microplaque dans le test de α -amylase

Extraits	Blanc d'extrait	Ae	Ac
25 μ l extrait	25 μ l extrait	25 μ l MeOH	25 μ l MeOH
50 μ l Enzyme	50 μ l tampon	50 μ l Enzyme	50 μ l Tampon
Incubation à 37°C – 10 min			
50 μ l Amidon	50 μ l tampon	50 μ l amidon	50 μ l amidon
Incubation à 37°C – 10 min			
25 μ l HCL	25 μ l tampon	25 μ l HCL	25 μ l HCL
100 IKI	100 IKI	100I	101I

3.2.2 Activité anti-Alzheimer via l'inhibition de Butyrylcholinestérase

Les activités inhibitrices de la butyrylcholinestérase (BuChE) a été mesurée en utilisant la méthode détaillée par **Ellman *et al.*, (1961)**. Dans ce procédé Un mélange de 150 μ l de tampon phosphate de sodium à (pH 8) (100 mM), 10 μ l d'extrait et à 20 μ l d'enzyme BuChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U) a été incubé pendant 15 minutes à 25°C. Ensuite 10 μ l de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)) (0,5 mM) et 10 μ l acetylthiocholine iodide (0.71 mM) ont été additionné .La Galantamine a été utilisé comme composé de référence et l'absorbance a été mesurée à 412 nm.

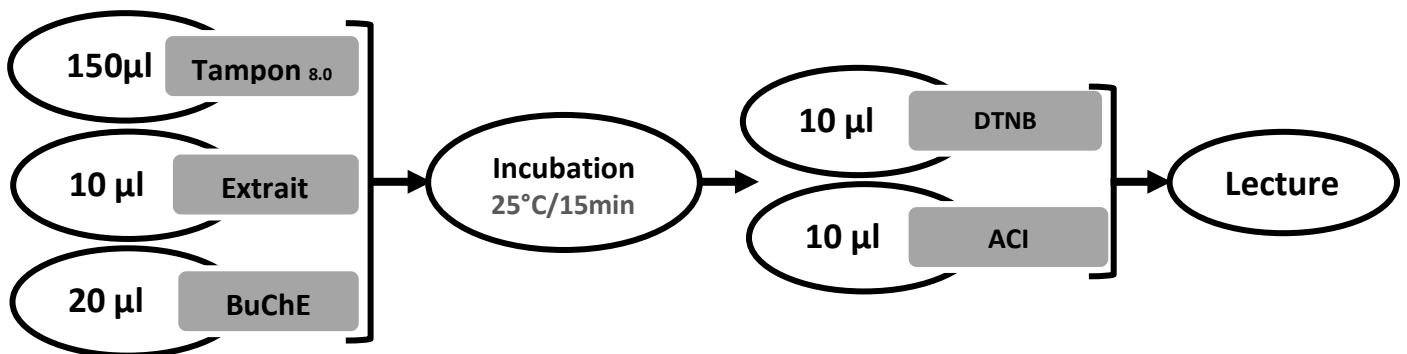


Figure 15: Mode de remplissage de la plaque pour chaque échantillon (BuchE)

3.3 Activité protectrice vis-à-vis les rayonnements solaires

Pour estimer l'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire on a opté pour la méthode de **Mansur *et al.* (1986)**. L'absorbance, dans l'intervalle de 290 à 320 chaque 5 nm (UV-B), de 200 μ l de chaque échantillon (2mg/ml) a été mesurée et la valeur du SPF est calculé selon l'équation de Mansur.

$$\text{SPF spectrophotométrique} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

- EE: spectre d'effet thermique
- I : spectre d'intensité solaire
- Abs: absorbance de l'échantillon
- CF: facteur de correction (= 10)

Tableau 8: Fonction normale de produit utilisée dans le calcul de la SPF

Longueur d'onde λ (nm)	EE (λ)x I(λ) (Normes)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0837
320	0,0180
Total	1

4. Étude statistique

Les résultats obtenus sont exprimés en termes d'IC₅₀ et de A_{0,5} (µg/ml) par une régression linéaire. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque essai et le résultat a été exprimé en moyenne ± SD. Les comparaisons des moyennes et la détermination des taux de signification statistique ont été fait par l'analyse de variance, ANOVA a un seul facteur contrôlé, suivi par un test post-hoc de tuckey. Les logiciels Graphpad Prism 7.0 et XLSTAT ont été utilisé pour les différents calculs et présentations graphiques. Les différences sont considérées statistiquement significatives à $\alpha=5\%$.

Chapitre IV :

Résultats et discussions

Chapitre IV : Résultats et discussions

1. Rendements d'extraction

L'extraction aqueuse et alcoolique, des feuilles et fruits, nous a donné les résultats organisés dans le **tableau 9**.

Tableau 9: Rendement d'extraction aqueuse et alcoolique.

	Extraits Méthanolique	Extraits aqueux
Feuilles	31.27%	17.42%
Fruits	26.84%	20.07%

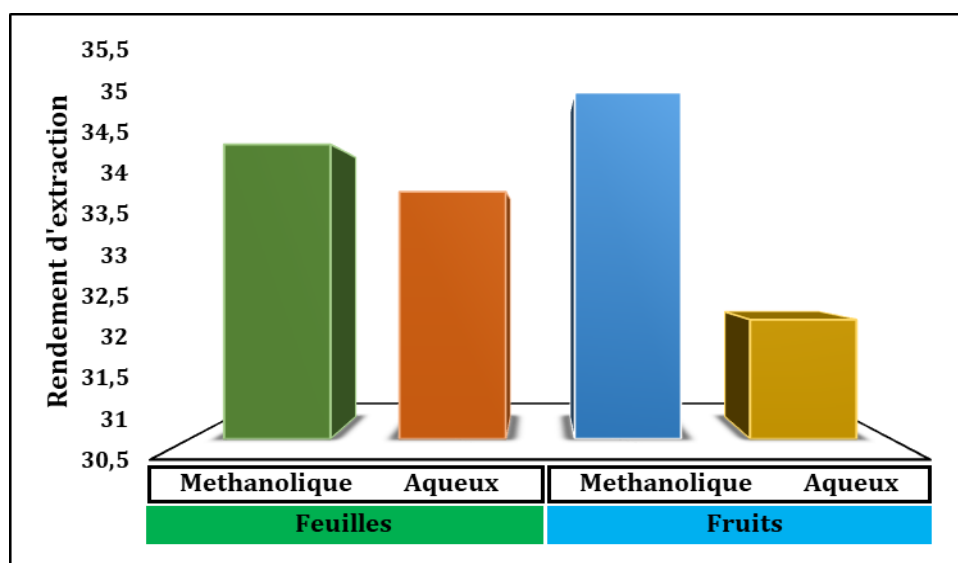


Figure 16: Rendements d'extraction des parties étudiées

2. Dosage des phénols et flavonoïdes totaux

A l'aide des courbes d'étalonnage de l'acide gallique et du Quercétine, Présentées en dessous, nous avons déduire le contenu en phénols totaux et en flavonoïdes. **Le tableau 10** résume nos résultats.

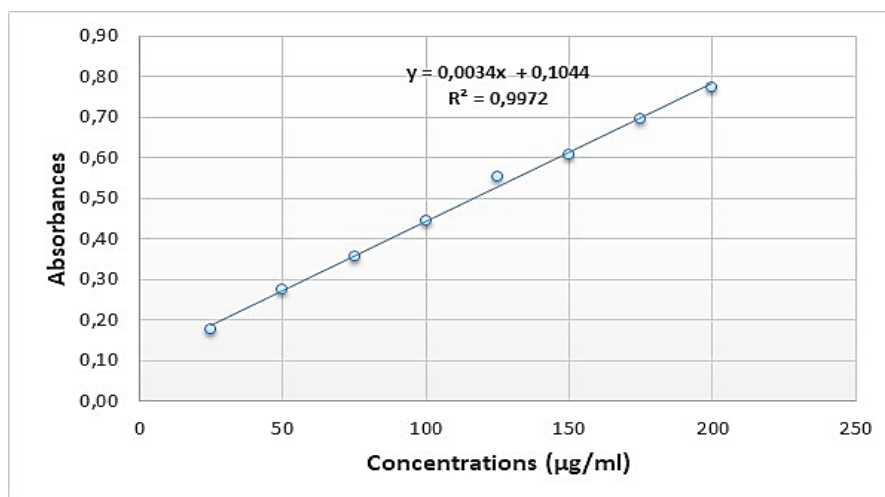


Figure 17: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

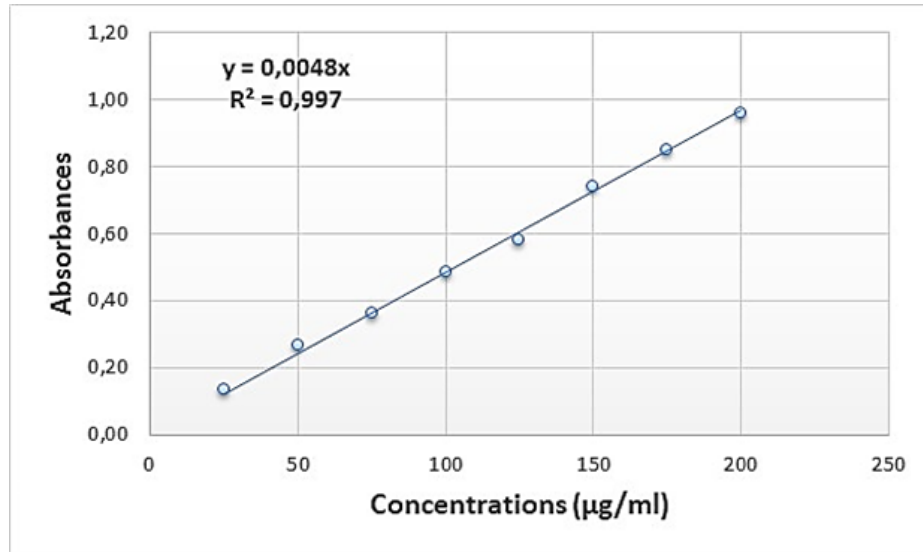


Figure 18: Courbe d'étalonnage du Quercétine

Le Tableau 10 résume nos résultats.

Tableau 10: Contenu en Phénols et flavonoïdes totaux

	Partie étudiée	µg EAG/ml/mg extrait	µg EQ/ml mg extrait
Extraits MeOH	Feuilles	558.01±10.26	150.69±00.58
	Fruits	374.58±07.31	079.02±02.35
Extraits Aqueux	Feuilles	429.68±08.83	101.25±04.78
	Fruits	176.94±5.49	046.59±3.21

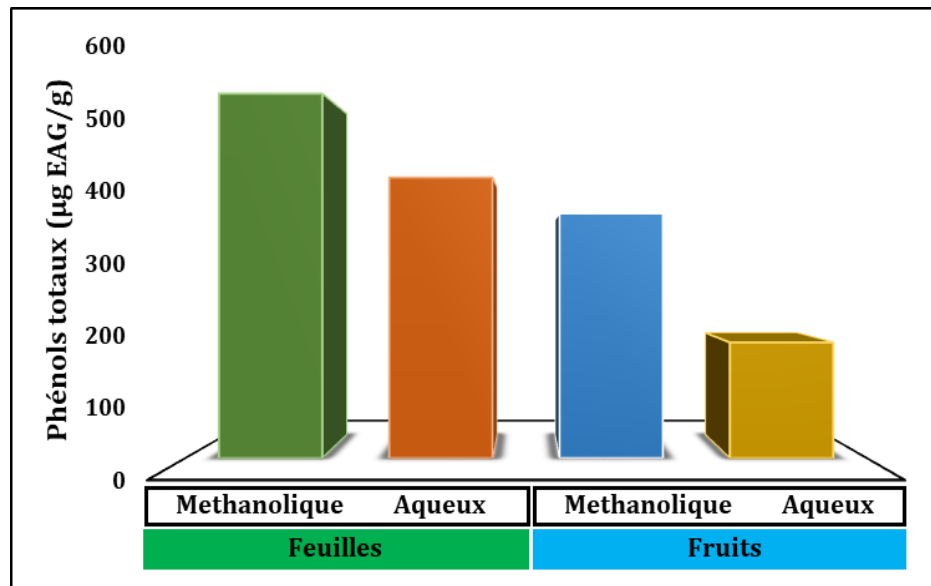


Figure 19: Teneur en Phénols totaux des parties étudiées

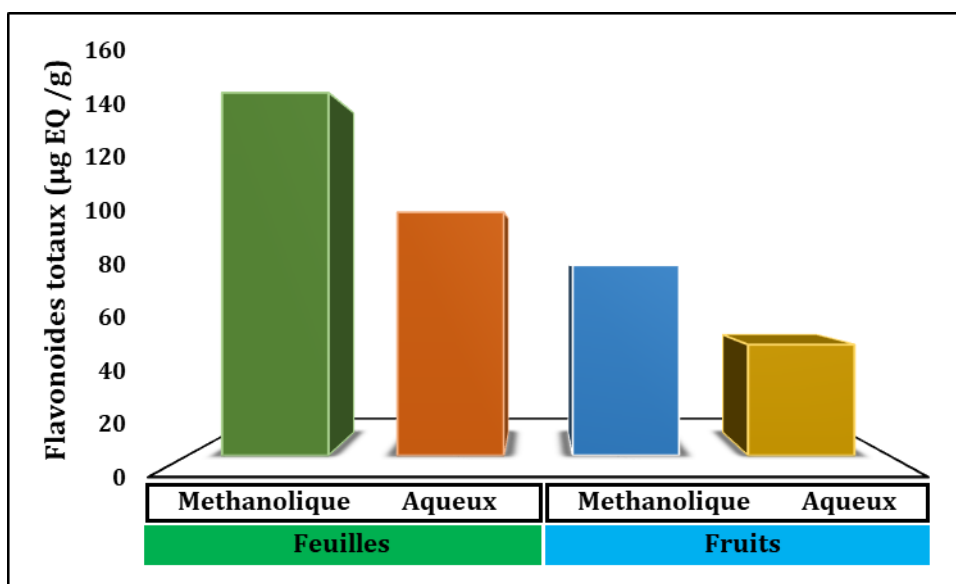


Figure 20: Teneur en Flavonoïdes totaux des parties étudiées

Les résultats représentés dans le **Tableau 09** ont révélé des rendements d'extraction importants particulièrement pour l'extrait Méthanolique des deux parties, les feuilles et les fruits et l'aqueux des fruits. Les rendements obtenus arrivent à 31% du poids de la matière première, ce qui reflète la richesse moléculaire de ces deux parties.

Pour déterminer la quantité des polyphénols totaux dans les deux organes (feuilles et fruits). Nous avons utilisé la courbe d'étalonnage d'acide gallique ($y=0.0034x+0.1044$, $R^2=0.9972$). Les résultats sont exprimés en microgrammes équivalent en acide gallique par milligramme d'extrait et par millilitre (**Tableau 10**). Les résultats ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles est le plus riche en polyphénols suivi par son extrait aqueux, l'extrait méthanolique des fruits et l'extrait aqueux des fruits respectivement.

Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits étudiés ont été obtenues à partir d'une courbe d'étalonnage ($y=0.0048x$, $R^2=0.997$) établie avec une gamme de concentrations de Quercétine. Elles sont exprimées en microgrammes équivalent en Quercétine par milligramme d'extrait et par millilitre (**Tableau 10**). Les extraits méthanolique et aqueux des feuilles présentent des teneurs élevées en flavonoïdes par rapport aux extraits des fruits.

Une étude faite par (Elaloui et al., 2017) sur une espèce du genre *Zizyphus* (*Zizyphus jujuba*) montre aussi que l'extrait méthanolique présente des teneurs plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes par rapport à l'extrait aqueux de toutes les parties de cette plante.

Ces variations peuvent s'expliquer par le fait que la quantité des composés phénoliques des extraits de la plante étudié (*Zizyphus lotus*) dépend essentiellement de la solubilité de leur composés dans les solvants utilisés (méthanol, eau distillée) ainsi que la polarité de ces derniers, de la localisation géographique, de la saison de culture et de récolte, la maturité et la durée de conservation de la plante.

De nombreuses études ont rapporté la relation étroite entre les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, et l'activité biologique des extraits de plantes médicinales. Dans la partie suivante de ce travail, nous allons focaliser la lumière sur les activités biologiques de notre plante d'intérêt et de faire le lien avec son contenu moléculaire.

3. Activité antioxydante

3.1 Activité de piégeage du radical libre DPPH

Les résultats de piégeage du radical DPPH sont résumés dans le **tableau 11**.

Tableau 11: Pourcentages d' inhibition du radical DPPH

Parties étudiées	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	1600 µg	IC ₅₀ (µg/ml)	
Extrair MeOH	Feuilles	13,52±1.40	27,63±1.40	47,99±1.65	80,38±1.71	84,61±0.71	85,69±0.20	Nt	53.72±4.1	
	fruits	07,07±0.35	09,29±2.12	13,32±2.02	24,07±2.44	34,29±0.60	58,68±0.70	80,45±0.40	Nt	360.6±6.5
Extrair aqueux	Feuilles	Nt	05,39±1.68	13,39±1.23	22,05±1.69	29,78±1.92	37,44±1.92	49,87±0.47	906.1±8.2	
	fruits	Nt	06,47±1.45	13,99±1.03	19,76±1.41	28,04±1.65	39,32±0.20	48,73±1.71	945.7±7.6	
Standards	BHA*	76,55± 0,48	79,89± 0,26	81,73±0,10	84,18±0,10	87,13±0,17	89,36±0,19	90,14±0,00	Nt	006.14±0
	BHT*	49,09± 0,76	72,63± 2,06	88,73±0,89	94,00±0,31	94,97±0,08	95,38±0,41	95,02±0,23	Nt	012.99±0
	α-tocophérol*	37,21±1,82	81,53±1,51	89,23±0,12	89,38±0,19	89,45±0,22	89,99±0,23	89,52±0,33	Nt	013±5,17

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (*) les standards : molécules de références
- BHA : hydrox-yanisole butylé
- BHT : hydroxy-toluene butylé
- Nt : non testée

3.2 Activité de piégeage du radical libre ABTS

Les résultats de piégeage du radical ABTS sont résumés dans le **tableau 1**

Tableau 12 : Pourcentages d' inhibition du radical ABTS

Parties étudiées	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	1600 µg	IC ₅₀ (µg/ml)	
Extrairts MeOH	Feuilles	32,63±1.9 9	44,87±1.5 2	78,04±2.7 7	89,62±0.2 7	91,99±1.1 0	92,77±0.70 4	91,89±0.2 4	Nt	27.69±0.4
	fruits	9,89±2.60	14,34±1.8 0	21,98±1.4 3	33,56±2.0 6	63,68±1.5 2	90,80±0.88	91,73±0.2 4	Nt	153.1±4.9
Extrairts aqueux	Feuilles	Nt	11,24±0.7 4	16,66±1.3 5	24,15±1.2 5	37,02±0.9 8	47,56±0.09	54,74±1.6 1	76,60±1.0 7	557.8±1.4
	fruits	Nt	11,75±1.4 3	17,23±0.8 1	25,08±2.2 4	34,80±2.4 0	47,71±0.45	67,14±1.3 4	72,36±0.9 1	459.9±1.1
Standards	BHA*	92.83±1,42	94.68±0,42	94.95±0,90	95.32±0,25	95.59±0,47	95.83±0,15	95,86±0,10	Nt	1.81±0.10
	BHT*	69.21±0,40	78.23±1,34	88.12±1,28	88,76±3,07	90.85±1,74	90.95±0,51	96.68±0.39	Nt	1.29±0.30

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (*) les standards : molécules de références
- BHA : hydrox-yanisole butylé
- BHT : hydroxy-toluene butylé
- Nt : non testée

Tableau 13: Tableau récapitulatif des valeurs IC₅₀

	Extrait	DPPH	ABTS
Extraits MeOH	Feuilles	53.72±4.1	27.69±0.4
	Fruits	360.6±6.5	153.1±4.9
Extraits Aqueux	Feuilles	906.1±8.2	557.8±1.4
	Fruits	945.7±7.6	459.9±1.1
Standards	BHA	06.14±0.0	1.81±0.10
	BHT	12.99±0.0	1.29±0.30
	α-tocopherol	013±5,17	/

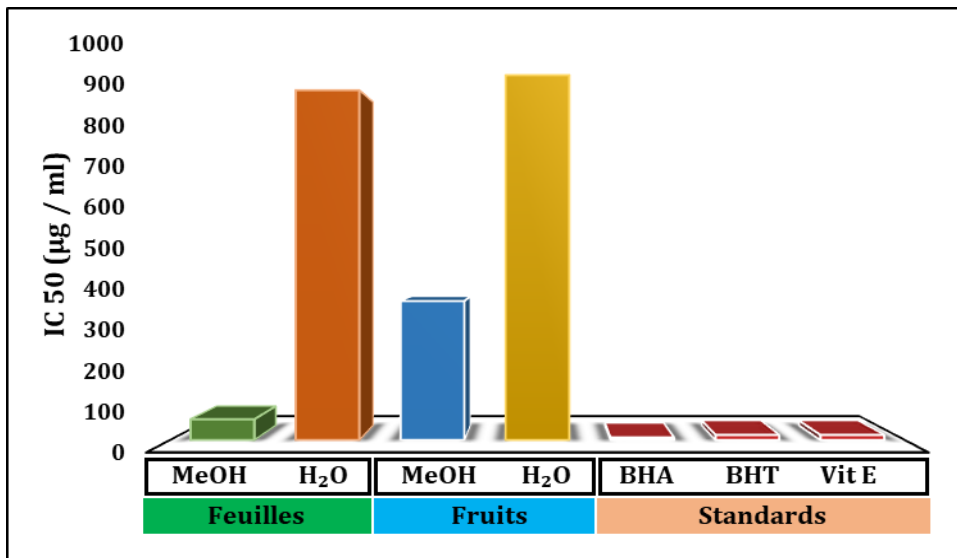


Figure 21: Piégeage du radical DPPH par les extraits étudiés

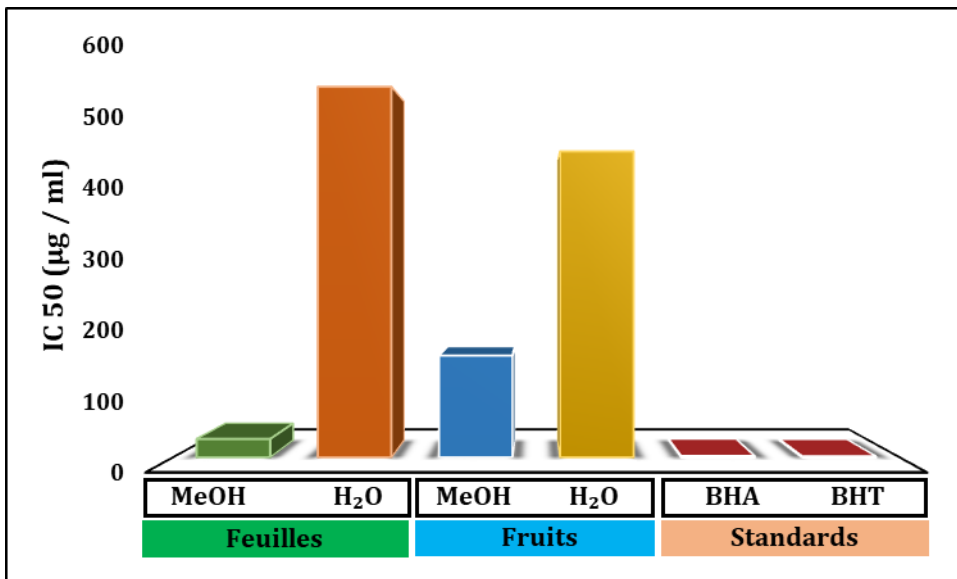


Figure 22 : Piégeage du radical ABTS par les extraits étudiés

Les maladies chroniques tels que le diabète, neurologiques sont en croissance progressive. Elles constituent la première cause de décès. Les études ont montré que le stress oxydatif y joue un rôle majeur, en tant que facteur déclenchant et/ou associant, ce stress résultant d'un apport insuffisant en antioxydants et/ou d'une surexposition à des facteurs oxydants. Ce contexte stimule les chercheurs à trouver des produits alternatifs, notamment d'origine naturelle, pour lutter contre le stress oxydatif et empêcher une grande variété de maladies, et surtout pour réduire l'utilisation des antioxydants d'origine synthétiques dans le domaine agroalimentaire et en cosmétique.

De nombreuses méthodes classiques comme celles de piégeage des radicaux DPPH et ABTS sont utilisées pour évaluer l'activité anti-oxydante des *in vitro*. Ces méthodes colorimétriques sont basées exclusivement sur la capacité de neutralisation des radicaux stables comme étant un indicateur de son potentiel antioxydant. La capacité antioxydante des différents extraits a été déterminée selon la valeur d'IC₅₀ (µg/ml), c'est la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire 50 % du radicaux DPPH ou ABTS dans le milieu réactionnel. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante du composé est puissante. (Hebi *et al.*, 2016)

D'après les résultats présentés dans le **Tableau 13**, les valeurs d'IC₅₀ obtenus pour les molécules de référence (l'α-tocopherol, BHT et BHA), ont été les plus puissants. A propos de nos extraits, l'extrait méthanolique des feuilles a donné l'effet antioxydant le plus élevé suivi par l'extrait aqueux des feuilles et les autres extraits respectivement. Par une comparaison simple, on trouve que le radical ABTS se neutralise mieux que le radical DPPH, cela peut être dû à la stéréochimie de la molécule de l'ABTS qui est plane et plus facile à être neutralisée, par rapport à celle du DPPH qui est complexe, ce qui gêne les protons d'hydrogènes à le neutraliser. D'autre part, le pouvoir inhibiteur du radical DPPH dépend non seulement du contenu phénolique total mais aux structures chimiques particulières riches en groupes hydroxyyles. (Wasowski *et al.*, 2013 ; Sanchez *et al.*, 2013)

3.3 Activité de réduction du complexe Fe⁺²-Phenanthroline

L'absorbance des extraits étudiés dans la méthode Phenanthroline est résumée dans le **tableau 14**

Tableau 14: Les absorbances des différents extraits dans la méthode se Phenanthroline

Parties étudiées	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	1600 µg	A _{0.5} (µg/ml)
Extrair MeOH									
Feuilles	0,19±0.01	0,25±0.00	0,37±0.02	0,54±0.10	0,87±0.03	1,49±0.02	2,73±0.00	Nt	84,52±0.9
fruits	0,15±0.00	0,17±0.00	0,27±0.01	0,51±0.05	0,73±0.02	1,13±0.07	2,05±0.16	Nt	116,8±5.6
Extrair aqueux									
Feuilles	Nt	0,14±0.00	0,15±0.00	0,24±0.01	0,38±0.02	0,65±0.02	1,35±0.61	02,09±0.40	283,7±9.4
fruits	Nt	0,13±0.01	0,14±0.01	0,15±0.00	0,19±0.01	0,29±0.01	0,51±0.01	00,84±0.03	760,4±7.2
Standards									
BHA*	1,12±0.05	01,95±0.31	03,14±0.46	03,58±0.42	03,35±0.20	03,77±0.19	03,92±0.13	Nt	05,35±0.7
BHT*	1,41±0.03	02,22±0.05	02,42±0.02	02,50±0.01	02,56±0.05	02,86±0.07	03,38±0.13	Nt	1,29±0.30

• Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai

- (*) les standards : molécules de références
- BHA : hydrox-yanisole butylé
- BHT : hydroxy-toluene butylé
- Nt : non testée

3.4 Activité de pouvoir réducteur (FRAP)

L'absorbance des extraits dans la méthode FRAP est résumée dans le **tableau 15**.

Tableau 15: Les absorbances des différents extraits dans la méthode FRAP

Parties étudiées	12.5 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	A _{0.5} (µg/ml)	
Extrairts MeOH	Feuilles	0,13 ±0.02	0,16±0.03	0,24±0.01	0,36±0.01	0,45±0.04	0,85±0.02	1,25±0.06	Nt	62.79±6.5
	fruits	0,19±0.09	0,28±0.00	0,31±0.03	0,35±0.02	0,44±0.01	0,64±0.06	0,95±0.02	Nt	73.48±2.9
Extrais aqueux	Feuilles	Nt	0,16±0.01	0,25±0.02	0,30±0.09	0,41±0.00	0,54±0.12	0,86±0.05	1,02±0.03	92.67±3.8
	fruits	Nt	0,12±0.03	0,18±0.00	0,24±0.08	0,38±0.12	0,49±0.06	0,61±0.03	0,83±0.01	104.8±6.1
Standards	A. Ascorbique*	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	1,44±0,21	Nt	06.77±1.1
	α-tocophérol*	0,11±0,00	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	Nt	34.93±2.3

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (*) les standards : molécules de références
- Nt : non testée

3.5 Activité de réduction des nanoparticules d'Argent (SNP)

L'absorbance des extraits dans la méthode SNP est résumée dans le **Tableau. 16**.

Tableau 16: Les absorbances des différents extraits dans la méthode SNP

Parties étudiées	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	A _{0.5} (µg/ml)
Extrairts MeOH									
Feuilles	0,21±0.08	0,33±0.01	0,47±0.08	0,62±0.01	0,98±0.09	1,19±0.10	1,44±0.14	Nt	31.77±2.8
fruits	0,13±0.01	0,24±0.05	0,38±0.01	0,45±0.00	0,66±0.03	0,91±0.02	1,25±0.06	Nt	64.12±3.1
Extrais aqueux									
Feuilles	Nt	0,19±0.01	0,24±0.01	0,36±0.03	0,47±0.06	0,59±0.00	0,71±0.03	0,94±0.08	126.7±5.9
fruits	Nt	0,18±0.00	0,22±0.04	0,27±0.05	0,39±0.02	0,51±0.00	0,64±0.06	0,76±0.02	191.2±7.3
Trolox*	0,23±0,00	0,30±0,01	0,43±0,01	0,64±0,03	1,04±0,01	1,90±0,03	2,35±0,01	Nt	34.17±1.2

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (*) les standards : molécules de références
- Nt : non testée

Tableau 17: Tableau récapitulatif des valeurs A_{0,5}

	Extrait	Phenanthroline	FRAP	SNP
MeOH	Feuilles	84.52±0.9	62.79±6.5	31.77±2.8
	Fruits	116.8±5.6	73.48±2.9	64.12±3.1
Aqueux	Feuilles	283.7±9.4	92.67±3.8	126.7±5.9
	Fruits	760.4±7.2	104.8±6.1	191.2±7.3
Standards	BHA	0,93±0,07	/	
	BHT	2,24±0,17	/	
	α-tocopherol	/	34.93±2.3	/
	A.ascorbique	/	06.77±1.1	/
	Trolox	/	/	34.17±1.2

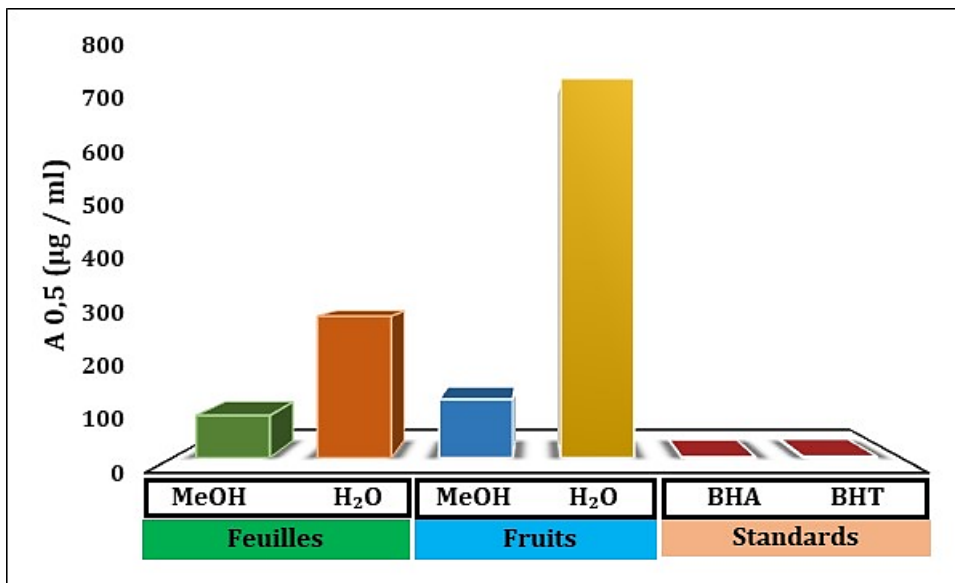


Figure 23: Réduction du complexe Fe²⁺-Phenanthroline par les extraits étudiés

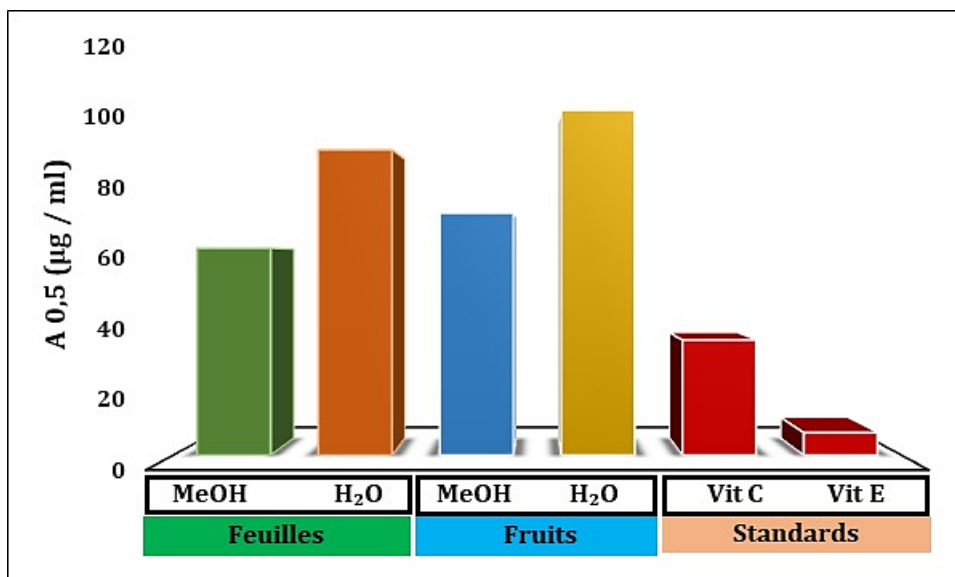


Figure 24: L'activité du pouvoir réducteur des extraits étudiés FRAP

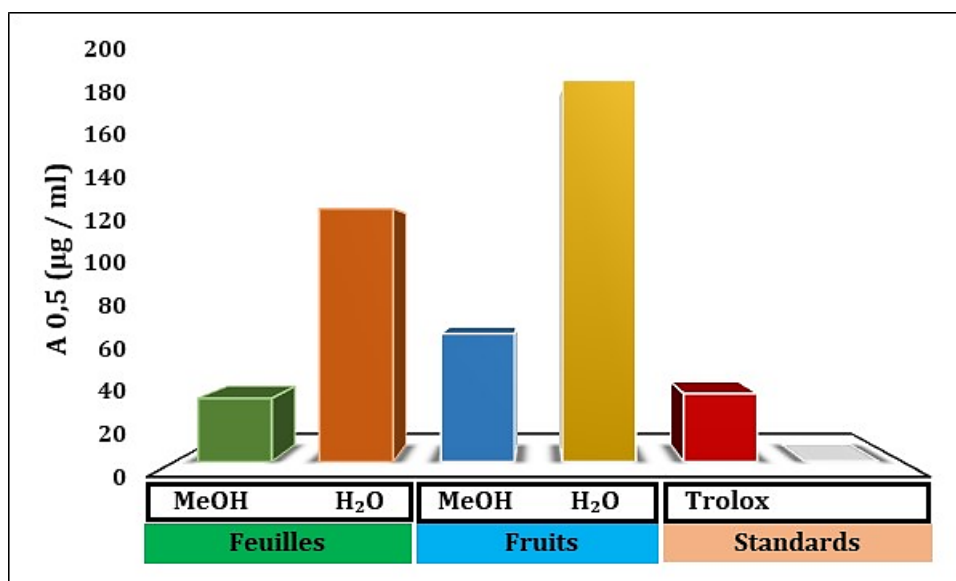


Figure 25: Réduction des nanoparticules d'Argent SNP

Dans cette partie, les propriétés antioxydantes des extraits ont été évalué par les méthodes FRAP et Phenanthroline (Réduction du fer) et SNP (réduction de l'Argent). Les résultats sont exprimés sous forme $A_{0,5}$ ($\mu\text{g/ml}$). Les valeurs obtenues dans la méthode du pouvoir réducteur (**Tableau 17**) ont montré que les extraits Méthanolique des deux parties possèdent une activité anti radicalaire intéressantes, tandis que les extraits aqueux ont apparu faibles en comparaison avec les valeurs des standards qui ont gardé l'activité la plus puissante. La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} (complexe ferricyanide à la forme ferrique) en formant les ions de Fer ferreux (Fe^{2+}). Le Fe^{2+} ainsi formé peut-être évalué en mesurant la densité de la couleur verte dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Bougandoura et al., 2012**). De nombreuses communications scientifiques ont rapporté la relation étroite entre la concentration en composés phénoliques, la puissance de réduction et l'activité antioxydante des extraits naturels. (**Bentabet et al., 2014**)

Dans le même contexte, les résultats obtenus dans le test de phenantroline (**Tableau 17**) ont révélé que l'extrait Méthanolique des feuilles a donné le meilleur pouvoir réducteur, l'extrait aqueux des fruits est le plus faible. L'ensemble des extraits sont loin à être comparés avec les standards qui ont donné le meilleur résultat. Dans cette méthode les ions de Fe^{3+} ont été réduits en ions Fe^{2+} en présence des antioxydants. Les ions Fe^{2+} formés réagissent avec le phénanthroline pour former un complexe stable rouge orangé, le complexe formé Fe^{2+} -phénanthroline est suivi par spectrophotométrie. Le dosage des ions ferreux détermine le pouvoir réducteur de l'antioxydant testé. Cette variabilité des niveaux de l'activité est due à la capacité réductrice des polyphénols en tant qu'antioxydants, cette capacité dépend du degré

d'hydroxylation et de la conjugaison des composés phénoliques. (Yefrida *et al.*, 2018 ; Apak *et al.* 2004).

Les résultats de nos extraits dans la méthode de réduction des nanoparticules d'argent (SNP) ont montré (**Tableau IV. 9**) que l'extrait Méthanolique des feuilles a donné une valeur $A_{0.5}$ intéressante, néanmoins les autres trois extraits ont été faible, ils sont loin à être comparés avec les molécules de référence, le Trolox. En effet, la réduction des nanoparticules d'Argent pourrait être due à la présence des polyphénols dans les extraits du fait que l'extrait Méthanolique des feuilles est très riche en polyphénols.

4. Activité inhibitrice des enzymes

4.1 L'activité antidiabétique via l'inhibition de l' α -amylase

L'inhibition de l' α -amylase par les extraits étudiés est organisée dans le **tableau 18**

Tableau 18: Les pourcentages d' inhibition de l' α -amylase par les extraits étudiés

Parties étudiées	06.25 μ g	12.5 μ g	25 μ g	50 μ g	100 μ g	200 μ g	400 μ g	800 μ g	IC ₅₀ (μ g/ml)	
Extraits MeOH	Feuilles	15.08±0.23	19.80±1.67	23.91±2.40	30.28±1.64	37.15±1.78	44,37±3.41	51.02±2.14	Nt	382,7±9.1
	fruits	14.20±0.31	14.62±0.14	15.30±1.74	19.28±0.91	26.48±1.35	31.05±0.16	36.61±3.17	Nt	> 400
	Feuilles	Nt	17.36±0.27	18.49±1.62	24.57±0.18	27.84±0.09	32.75±1.34	37.14±1.48	42.17±2.66	> 400
	fruits	Nt	21.08±0.61	25.87±1.44	29.85±1.33	36.62±0.37	41.38±0.84	46.18±1.47	59.77±1.95	376.1±8.2
Extraits Aqueux	62.5 μ g	125 μ g	250 μ g	500 μ g	1000 μ g	2000 μ g	4000 μ g	8000 μ g	IC ₅₀ (μ g/ml)	
	Acarbose *	07,76±0,17	08,08±0,30	09,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	Nt	3650,9±10

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne \pm SD des trois répétitions pour chaque essai
- (*) les standards : molécules de références
- Nt : non testée

4.2 L'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de butyrylcholinestérase

Les résultats d'inhibition de la BuChE sont organisés dans le **tableau 19**

Tableau 19: Les pourcentages d' inhibition de la BuChE par les extraits étudiés

Parties étudiées	3.12 µg	06.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	IC ₅₀ (µg/ml)
Extraits MeOH									
Feuilles	18.66±1.53	21.19±2.46	28.37±1.82	33.86±1.92	40.07±0.95	48.16±1.62	56.27±3.81	Nt	122.3±5.70
fruits	21.44±1.29	28.66±1.24	39.07±0.72	45.67±1.92	52.94±3.11	66.21±0.05	72.64±1.34	Nt	48.91±2.13
Extraits Aqueux									
Feuilles	Nt	24.08±1.43	31.11±2.65	36.84±2.87	43.95±1.60	52.09±0.00	59.44±2.17	62.14±1.33	86.41±3.57
fruits	Nt	30.07±3.47	38.13±0.94	46.17±0.11	55.86±1.96	64.19±1.68	77.52±0.88	83.67±2.18	43.72±2.95
Galantamin e *	3.12 µg	06.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	IC ₅₀ (µg/ml)
	35,93±2,28	43,77±0,00	68,50±0,31	80,69±0,41	85,78±1,63	91,80±0,20	94,77±0,34	Nt	06.27±1.15

- Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne ± SD des trois répétitions pour chaque essai
- (*) les standards : molécules de références
- Nt : non testée

À chaque instant, des milliers de réactions chimiques distinctes se produisent dans la cellule, ces réactions déterminent l'ensemble des phénomènes biologiques à l'échelle cellulaire et organique. Ces réactions sont catalysées par des enzymes qui diminuent l'énergie d'activation et accélèrent le temps réactionnel. Toutes perturbations dans le fonctionnement enzymatique peuvent provoquer un certain nombre de maladies qui sont parfois graves.

Plusieurs médicaments commercialisés dans le marché agissent par modulation enzymatique afin de traiter, soulager et prévenir les différentes formes de maladies. Les experts ont adopté des techniques et des stratégies y inclue la modulation enzymatique pour contrôler les patients souffrants des maladies métaboliques telles que le diabète type 02 et les maladies neuro-dégénératives comme l'Alzheimer. Dans cette étude, nous avons évalué l'activité de nos extraits à inhiber le butyrylcholinestérase (BChE) et l' α -amylase qui sont liées à l'Alzheimer, le diabète respectivement.

Le diabète est une maladie endocrinienne, ubiquitaire qui constitue un véritable problème de santé publique. Elle peut déclencher, a long-terme, de graves problèmes de santé au niveau du cœur, des vaisseaux sanguins, des reins, des yeux et du système nerveux. L'augmentation du nombre de diabétiques est principalement due à une multiplication du nombre de personnes atteintes par un DT2 insulino-résistant favorisé par les habitudes alimentaires, le niveau de vie et la sédentarité. Une étude récente décrit la valeur pronostique et les bénéfices du contrôle de la glycémie postprandiale dans la diminution du risque des complications micro vasculaires et du stress oxydatif. C'est dans ce contexte que nous somme intéressés à l'évaluation de l'activité antidiabétique de nos échantillons via l'étude du pouvoir inhibiteurs d' α -amylase dans le but de limiter l'hyperglycémie post-prandiale. D'après les résultats obtenus (**Tableau 18**) nous avons remarqué que les extraits étudiés ont montré une activité inhibitrice faible a modérée de l'alpha-amylase. Le meilleur effet a été présenté par l'extrait méthanolique des feuilles et l'extrait aqueux des fruits.

L'inhibition de butyrylcholinestérase est une stratégie efficace utilisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer dans les premiers stades. Plusieurs produits naturels particulièrement les huiles essentielles et les alcaloïdes ont montré une activité inhibitrice intéressantes de cette enzyme, et par conséquent représentent une source des nouveaux traitements de cette maladie.

Dans la présente étude, l'activité inhibitrice de butyrylcholinestérase des différents extraits a été évaluée, en mesurant l'IC₅₀ par rapport au standard, la galantamine. Les résultats obtenus

(Tableau 19) ont montré une activité inhibitrice considérable pour les extraits des fruits, d'une manière dose-dépendante, notamment pour les extraits des feuilles, mais ils sont moins efficaces en comparaison avec la molécule de référence la galantamine.

5. L'activité protectrice vis-à-vis la lumière solaire

Les facteurs de protection (SPF) des extraits étudiés vis-à-vis les rayonnements UV de la lumière solaire sont organisés dans le tableau 20.

Tableau 20: Valeurs de protection solaire des extrais étudiés

Extraits		SPF ₁	SPF ₂	SPF ₃	Moyenne ± SD	Commentaire
MeOH	Feuilles	36.34	36.92	37.46	36.90±0.37	Haute protection
	Fruits	31.67	32.18	31.64	31.83±0.23	Protection moyenne
Aqueux	Feuilles	40.12	41.57	41.85	41.18±0.70	Très Haute protection
	Fruits	35.81	35.42	34.28	35.17±0.59	Haute protection
Standards	Crème NIVEA®	/	/	/	50,11±0,53	Très Haute protection
	Crème VICHY®	/	/	/	44,22±0,35	Très Haute protection

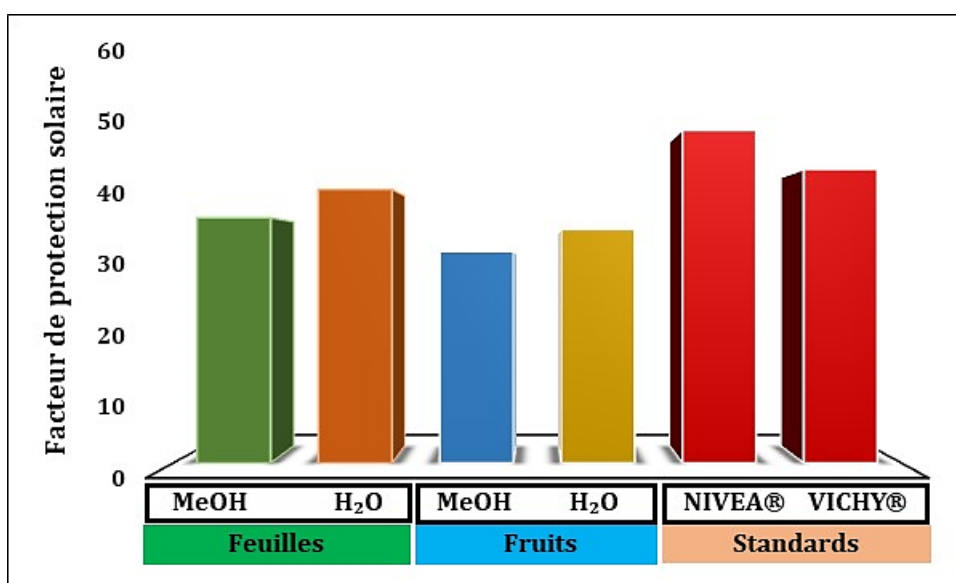


Figure 26: Valeurs SPF des extraits étudiés

Le facteur de protection solaire (SPF) ou « Sun Protection Factor » ou parfois simplement IP (indice de protection) consiste à mesurer le niveau de protection solaire d'un produit et son efficacité contre les UVB. Il est un essentiel lors de la préparation pharmaceutique et cosmétique des crèmes et produits antisolaires. Les extraits de notre plante ont donné des résultats de protection haute à très haute, notamment les extraits méthanolique et aqueux des fruits qui ont donné les meilleurs résultats (Tableau 20). Nous avons remarqué que la plante utilisée dans ce travail a un facteur plus élevé que la crème référence de VICHY®, Cela est probablement dû à sa croissance dans un climat aride (le désert).

Conclusion générale

Conclusion générale

En Algérie, la sécurité sanitaire a une priorité extrême dans les projets de recherches encadrés par la direction générale de recherche scientifique. Les experts cherchent à maîtriser les impacts socio-économiques liés aux problèmes de la santé publique, d'une part par une gestion adéquate des stratégies appliquées actuellement en face des maladies lourdes et chroniques et d'autre part, par la recherche des nouvelles alternatives puissantes. La médecine traditionnelle algérienne nous offre plusieurs plantes endémiques qui sont considérées comme sources des principes actifs qui nous permettent de contrôler le stress oxydatif, les maladies métaboliques neuro-dégénératives. Ce travail a été proposé pour valoriser les activités de la plante *Zizyphis lotus* L. Sur le plan méthodologique et technique, nous avons évalué le contenu en phénols et flavonoïdes totaux avec l'activité antioxydante des extraits de feuilles et fruits la plante d'intérêt. Par des méthodes standards, *in vitro*, le piégeage des radicaux DPPH et ABTS, la réduction du fer (FRAP et Phenanthroline) et d'Argent (SNP). En plus, nous avons évalué l'activité antidiabétique (DT2) via l'inhibition de l' α -amylase et l'activité anti-Alzheimer via l'inhibition de l'acétylcholinestérase. Ce travail a été terminé par une étude des facteurs de protections solaire. Nos résultats ont révélé des rendements d'extraction importants, particulièrement pour les extraits des feuilles. Ils arrivent à 31% du poids de la matière première. Ces extraits ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles est le plus riche en polyphénols et flavonoïdes suivi par son extrait aqueux, l'extrait méthanolique des fruits et l'extrait aqueux des fruits respectivement. A propos de l'activité antioxydante, les résultats ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles a donné l'effet antioxydant le plus élevé suivi par l'extrait aqueux des feuilles et les autres extraits dans les méthodes de neutralisation des radicaux DPPH et ABTS. Parallèlement, nos échantillons ont présenté des activités variables dans les méthodes FRAP, Phenanthroline et SNP. Les extraits Méthanolique des deux parties possèdent une activité intéressantes dans les méthodes précédentes, tandis que les extraits aqueux ont apparu faibles en comparaison avec les valeurs des standards qui ont gardé l'activité la plus puissante. D'autre part, l'activité inhibitrice des enzymes a montré que les extraits étudiés ont inhibé d'une manière faible a modérée de l' α -amylase. Le meilleur effet a été présenté par l'extrait méthanolique des feuilles et l'extrait aqueux des fruits. Tandis que les extraits ont montré une activité inhibitrice considérable du BuChE, pour les extraits des fruits, d'une manière dose-dépendante, mais ils sont moins efficaces en comparaison avec la molécule de référence la galantamine. En plus, nos extraits ont donné des excellents facteurs de protections solaires. Les résultats obtenus confirment l'usage traditionnel de la plante sélectionnée en Algérie.

Perspectives

- Analyser le contenu moléculaire par les techniques chromatographiques, spécialement LC-MS-MS.
- Fractionner l'extrait méthanolique des feuilles pour isoler les différentes familles moléculaires.
- Etudier les autres parties de la plante (graines, tiges, racines...etc.)
- Etudier d'autres formes d'extraits de cette plante aromatique telle que les huiles essentielles
- Elargir la gamme des activités vers l'antibactérienne, antiinflammatoire...etc.
- Pratiquer ces activités par des méthodes *in silico* et *in vivo*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abdoul-Azize, S., 2016.** Potential benefits of jujube (*Zizyphus Lotus L.*) bioactive compounds for nutrition and health. *Journal of nutrition and metabolism*.
- **Ali, W. J. H., & Ali, R. K., 2013.** Comparative study of oxidative stress in diabetes mellitus. *Baghdad Science Journal*, 10(1).
- **Anulika, N. P., Ignatius, E. O., Raymond, E. S., Osasere, O. I., & Abiola, A. H., 2016.** The chemistry of natural product: Plant secondary metabolites. *Int. J. Technol. Enhanc. Emerg. Eng. Res*, 4(8), 1-9.
- **Ashraf, Ghulam Md; Alexiou, Athanasios., 2019.** *Biological, Diagnostic and Therapeutic Advances in Alzheimer's Disease (Non-Pharmacological Therapies for Alzheimer's Disease)*, 10.1007/978-981-13-9636-6(), -. doi:10.1007/978-981-13-9636-6
- **Atta, E. M., Mohamed, N. H., & Silaev, A. A. A., 2017.** Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365-375.
- **Bakhtaoui, F. Z., Lakmichi, H., Megraud, F., Chait, A., & Gadhi, C. E. A., 2014.** Gastro-protective, anti-*Helicobacter pylori* and, antioxidant properties of Moroccan *Zizyphus lotus L.* *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(10), 081-087.
- **Beutler, J. A., 2019.** Natural products as a foundation for drug discovery. *Current protocols in pharmacology*, 86(1), e67.
- **Buckingham, J., Baggaley, K.H., Roberts, A.D., Szabo, L.F., 2010.** Dictionary of Alkaloids, with CD-ROM. CRC press.
- **Chowański, S., Adamski, Z., Marciniak, P., Rosiński, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., .. & Bufo, S. A., 2016.** A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. *Toxins*, 8(3), 60.
- **Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., 2008.** Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. John Wiley & Sons.
- **Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P. B., Warber, S., Duke, J. A., & Brielmann, H. L., 2016.** *Natural products from plants*. CRC press.
- **Dagorne, C., & Rangé, H., 2014.** Diabète et maladies parodontales. *Actualités Odonto-Stomatologiques*, (267), 27-34.
- **Delrieu, J., & Vellas, B., 2020.** Les nouveaux traitements de la maladie d'Alzheimer. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 204(3), 237-247.

- **Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., .. & Kim, H. S., 2020** Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In *Recent advances in natural products analysis* (pp. 505-567). Elsevier.
- **Elaloui M., Ennajah A., Ghazghazi H., Ben Youssef I., Ben Othman N., RabeH H.M., Khouja A. & Laamouri A ., 2017:** Quantification of total phenols, flavonoides and tannins from *Ziziphus jujuba* (mill.) and *Ziziphus lotus* (l.) (Desf). Leaf extracts and their effects on antioxidant and antibacterial activities. *International journal of secondary metabolite* 4,18-26
- **Favier A., 2003** Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'act. chim*, 2003 : 108-115.
- **Favier A., 2009** Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin*. 2009 ; 54(1) : 9-16.
- **Fernandez X., Chemat F., 2012** *La chimie des huiles essentielles*. Editions Vuibert . 288p
- **Fougere, É., 2019.** Le diabète gestationnel. *Actualités Pharmaceutiques*, 58(586), 57-59.
- **Ghedira, K., 2013.** *Zizyphus lotus*(L.) Desf. (Rhamnaceae): jujubier sauvage. *Phytothérapie*, 11(3), 149–153.doi:10.1007/s10298-013-0776-8
- **Glenn, W. S., Runguphan, W., S. E O'Connor., 2013.** Recent progress in the metabolic engineering of alkaloids in plant systems, *Current Opinion in Biotechnology* 24: 354–365.
- **Gök, S. B., Kalnkara, E. C., & Erdoğdu, Y., 2013 .** The use of plant secondary metabolites as food additives. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, S89.
- **Gutowski, M., et Kowalczyk, S., 2013.** A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *ACTA biochimica polonica*, 60(1); 1-16.
- **Gzil, F., 2009.** La maladie d'Alzheimer. *Problèmes philosophiques*. PUF, Paris.
- **IDF, I. D. F., 2017.** Diabetes Atlas - Eighth edition.
- **Institut de veille sanitaire (France) 2010..** Prévalence et incidence du diabète, et mortalité liée au diabète en France: synthèse épidémiologique. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire.

- **J Pincemail, M Meurisse, R Limet et JO Defraigne., 2013.** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention. *Medi sphère*. 2013 ; 87 (12) :1-4
- **Jahangeer, M., Fatima, R., Ashiq, M., Basharat, A., Qamar, S. A., Bilal, M., & Iqbal, H. M., 2021.** Therapeutic and biomedical potentialities of terpenoids—A Review. *J. Pure Appl. Microbiol*, 15, 471-483.
- **Jamloki, A., Bhattacharyya, M., Nautiyal, M. C., & Patni, B., 2021.** Elucidating the relevance of high temperature and elevated CO₂ in plant secondary metabolites (PSMs) production. *Heliyon*, 7(8), e07709.
- **Jean, BRUNETON., 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.): Lavoisier.
- **Kooti, Wesam; Farokhipour, Maryam; Asadzadeh, Zahra; Ashtary-Larky, Damoon; Asadi-Samani, Majid., 2016.** *The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. Electronic physician*, 8(1), 1832–1842. doi:10.19082/1832
- **Kumar, S., & Pandey, A. K., 2013.** Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.
- **Kumar, Suresh; Sharma, Sunil; Vasudeva, Neeru., 2017.** *Review on antioxidants and evaluation procedures. Chinese Journal of Integrative Medicine*, (), – .doi:10.1007/s11655-017-2414-z
- **Mazid, M., Khan, T.A., Mohammad, F., 2011.** Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants, *Biology and Medicine* 3 (2): 232-249.
- **Mello, B., (2015).** Phenolic Compound. *Encyclopedia of Membranes*, 1–2. doi:10.1007/978-3-642-40872-4_458-4
- **Molyneux P., 2004:** The use of the stable free radical of Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) for estimation antioxidant activity .*songklankarin J. sectechnol* 26, 211-219.
- **Mounni S., 2008.** Étude de la fraction glucidique des fruits de *Celtis australis* L., *Crataegus azarolus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Elaeagnus angustifolia* L., et *Zizyphus lotus* L. Mémoire de Magistère en Agronomie. Université de Batna.
- **OMS ,l'Organisation mondiale de la santé.** <https://www.who.int/fr/>
- **Opara E S., 2002.** Oxidative stress, micronutriments, diabetes mellitus and its complications. *J of the Royal Soc for the promotion of Health*, vol 122, p. 28-34.

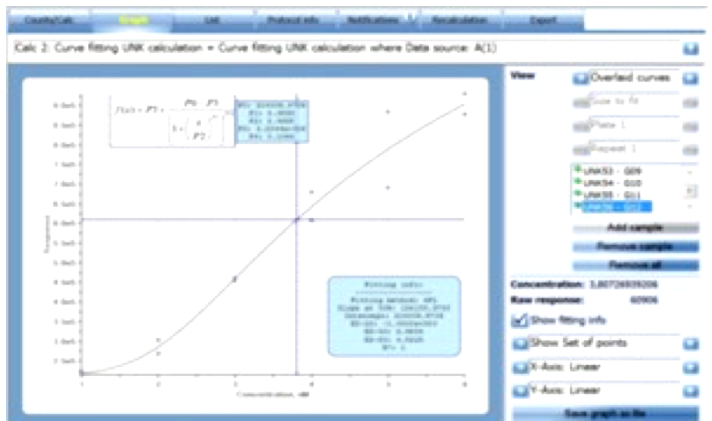
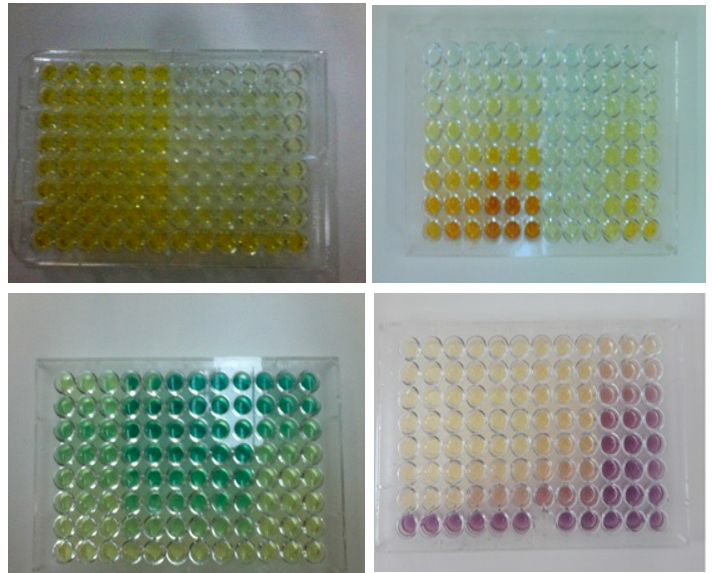
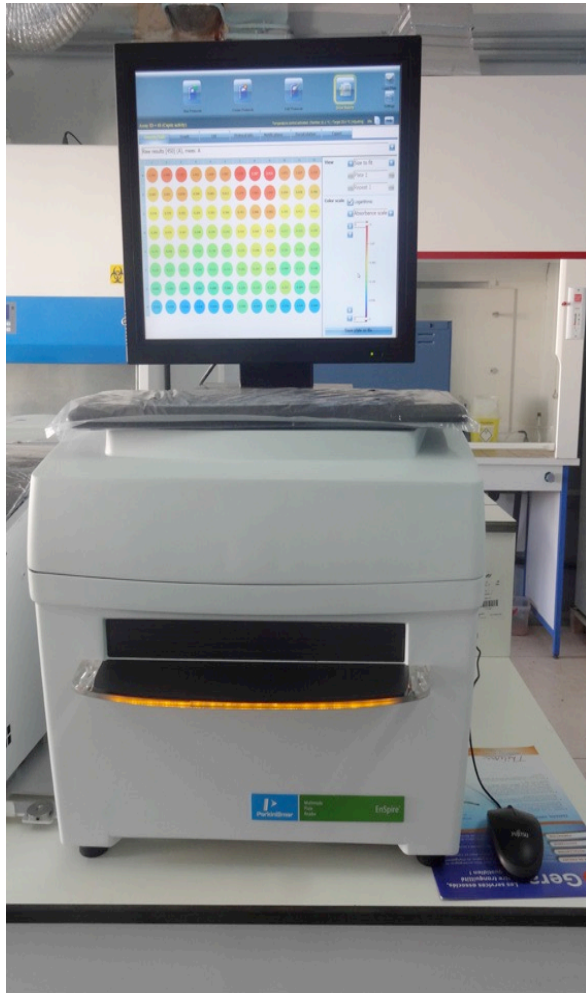
- **Orban, J. C., 2010.** Oxygène, stress oxydant. Chapitre : Désordres métaboliques et réanimation, p, 427-437.
- **Pal, D., & Nayak, A. K. (Eds.), 2021.** *Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications*. Springer.
- **Phaniendra, Alugoju; Jestadi, Dinesh Babu; Periyasamy, Latha., 2015.** *Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 30(1), 11–26.* doi:10.1007/s12291-014-0446-0
- **Ramar, P.S., and Ponnampalam, G., 2010.** Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery, *Evid Based Complement Alternat Med* 7 (3): 283-294.
- **Rasheed, A., & Azeez, R. F. A., 2019.** A review on natural antioxidants. *Traditional and Complementary Medicine*.
- **Rira, M., 2019.** *Les tanins hydrolysables et condensés: une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical* (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne).
- **Roberts, M.F., 2013.** Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications. Springer Science & Business Media.
- **Roy, A., 2017.** A review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *IJPB, 3(2), 1-9.*
- **Sabater, F., 2012.** *Détermination d'une dose efficace et d'une dose toxique de tanins condensés dans le contrôle des strongyloses digestives chez les caprins* (Doctoral dissertation).
- **Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J. L., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P. K., ... & Sharifi-Rad, J., 2018.** Antioxidants: positive or negative actors?. *Biomolecules, 8(4), 124.*
- **Sanjay, S. S., & Shukla, A. K., 2021.** *Potential Therapeutic Applications of Nano-antioxidants*.
- **Sujita Kumar Kar and Amit Singh., 2019.** Department of Psychiatry, King George's Medical University, Lucknow, UP, India Department of Psychiatry and National Drug Dependence Treatment Center, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi, India
- **Tenenbaum, Mathie; Bonnefond, Amélie; Froguel, Philippe; Abderrahmani, Amar., 2018.** *Physiopathologie du diabète. Revue Francophone des Laboratoires, 2018(502), 26–32.* doi:10.1016/S1773-035X(18)30145-X

- **Tiwari, R., & Rana, C. S., 2015.** Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.
- **U. Schmidt-Erfurth, T. Kohnen (eds.), 2016.** Encyclopedia of Ophthalmology.
- **Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J. P., Srivatva, S., & Prabha, S., 2016.** Antioxidants and its functions in human body-A Review. *Res. Environ. Life Sci*, 9(11), 1328-1331
- **Żukowski, Piotr; Maciejczyk, Mateusz; Waszkiel, Danuta., 2018.** Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 92(), 8–17.[doi:10.1016/j.archoralbio.2018.04.018](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.04.018)

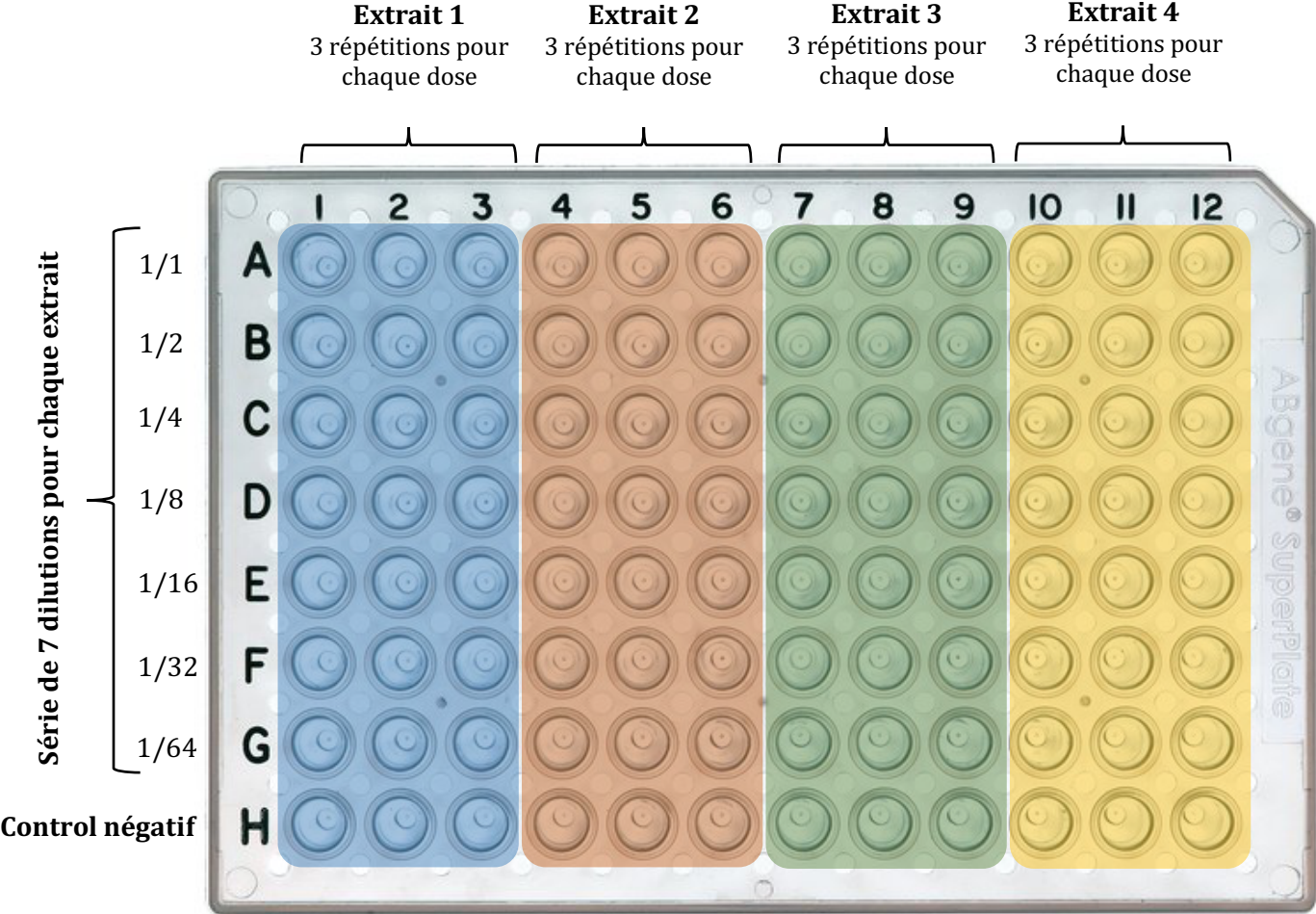
Annexes

Annexes

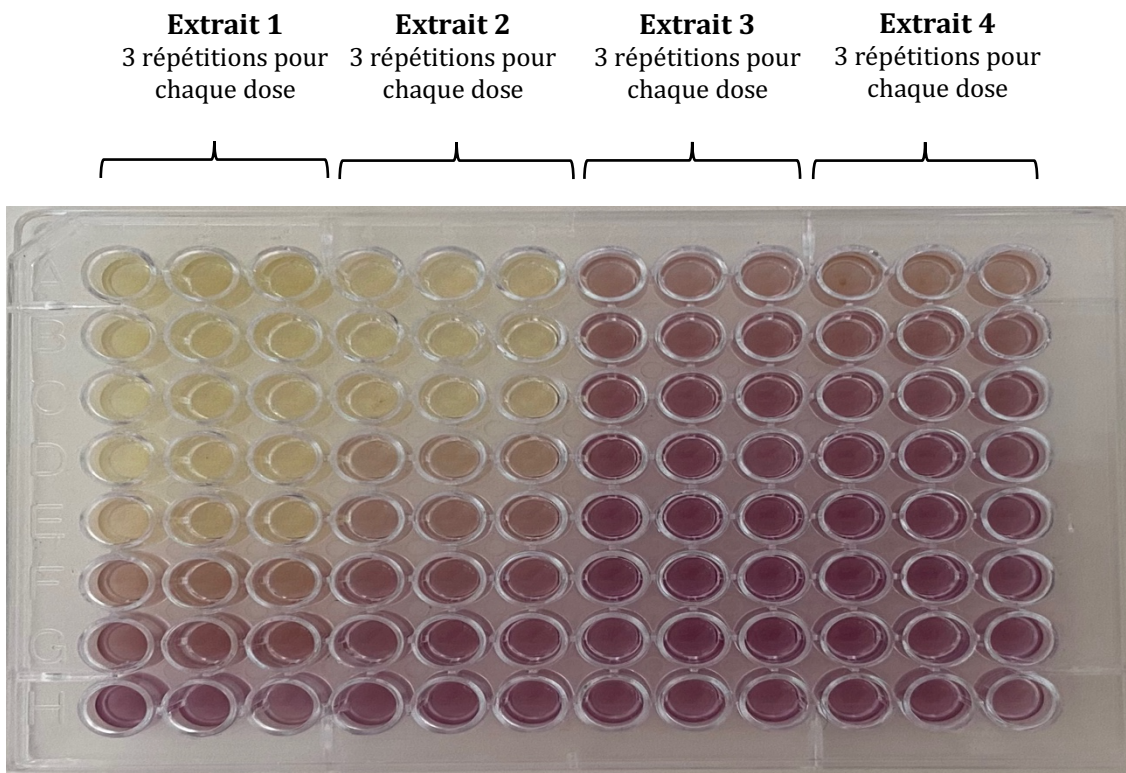
Annexe 01 : lecteur des microplaques a 96 puits utilisé dans différents tests



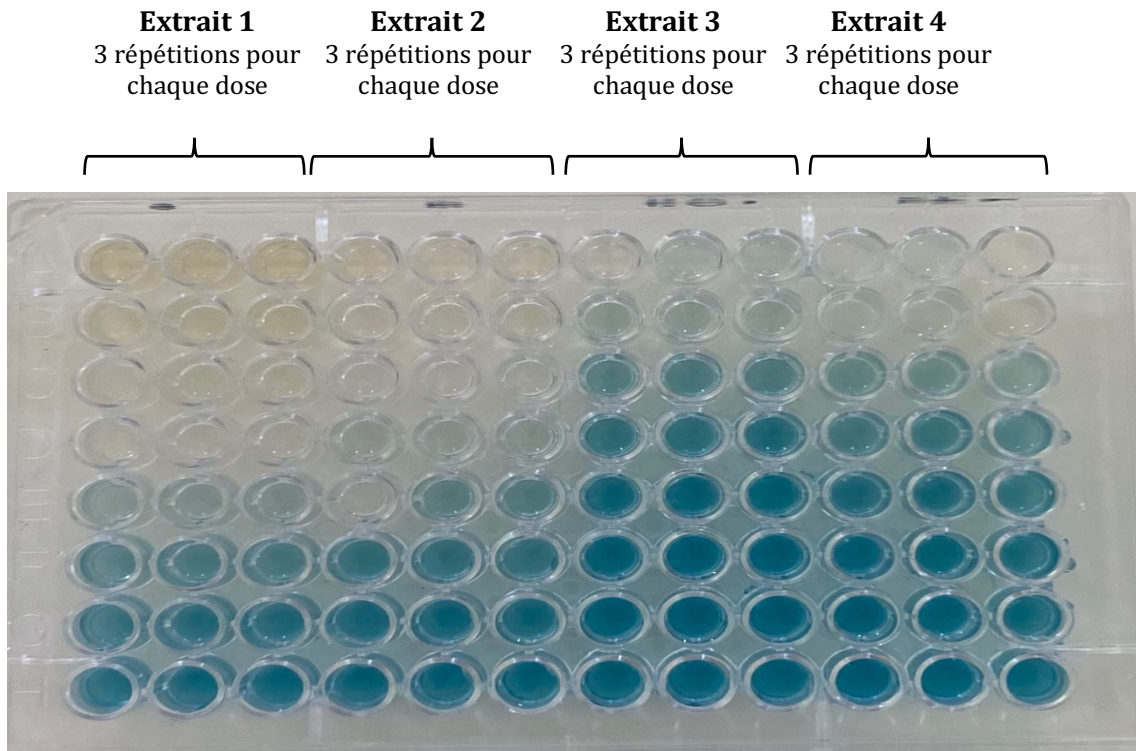
Annexe 02 : Organisation de la microplaque a 96 puits dans les différents tests



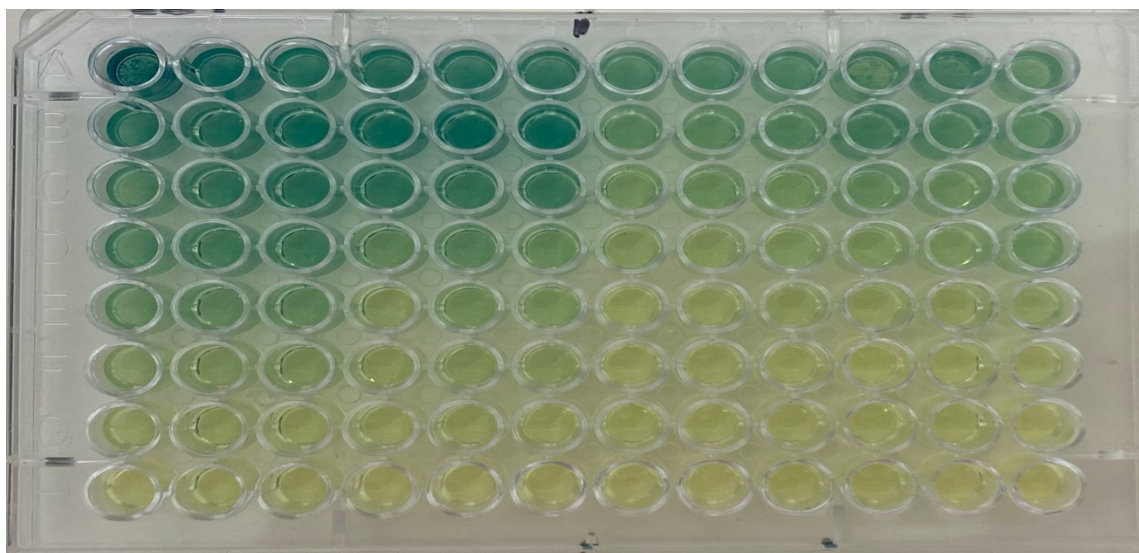
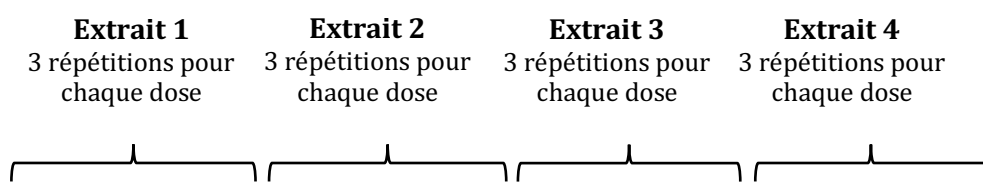
Annexe 03 : Image de la plaque dans le test du piégeage du DPPH



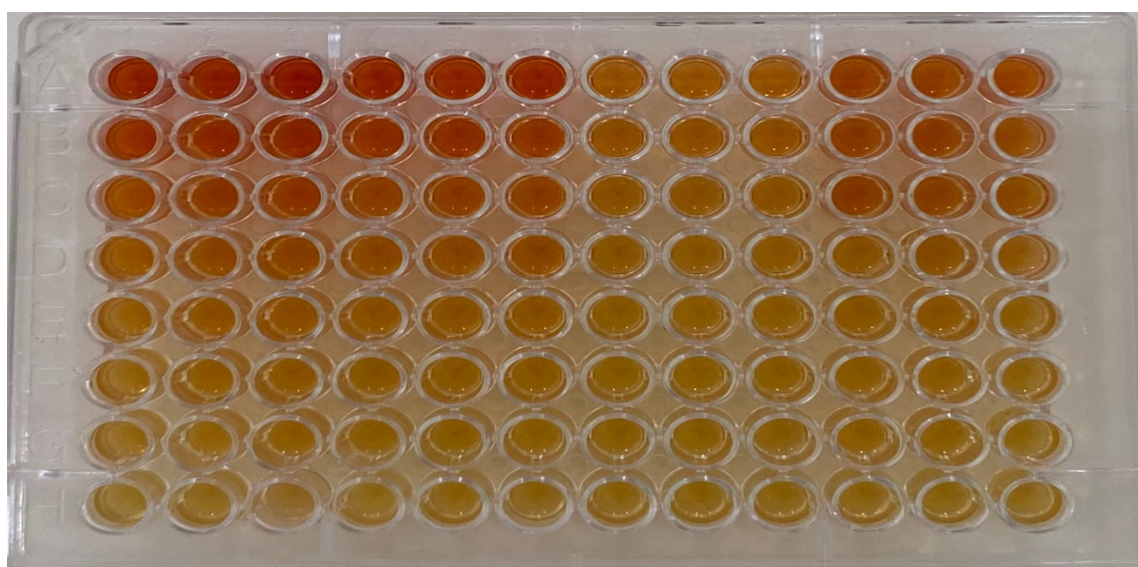
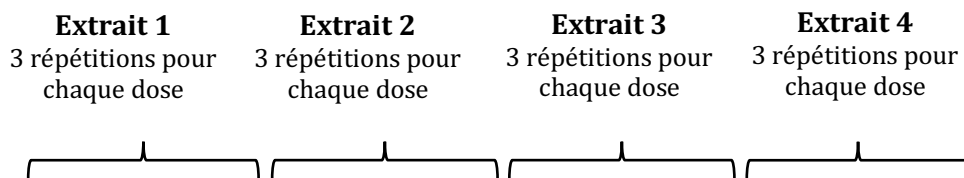
Annexe 04 : Image de la plaque dans le test du piégeage de l'ABTS



Annexe 05 : Image de la plaque dans le test du FRAP



Annexe 06 : Image de la plaque dans le test du Phenanthroline



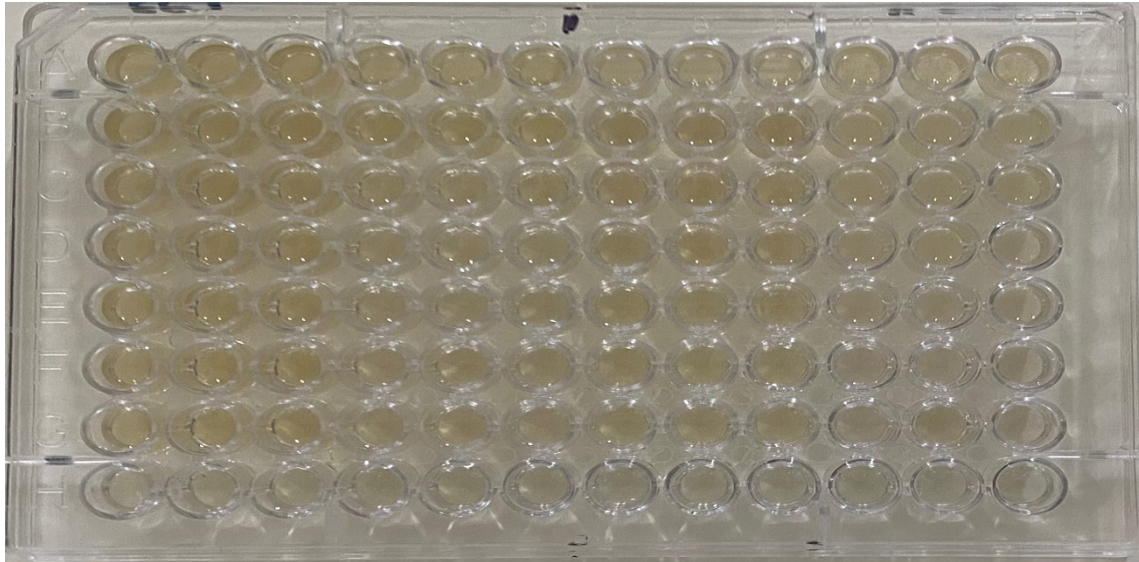
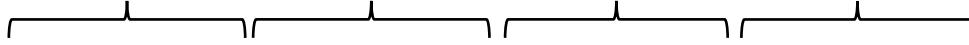
Annexe 07 : Image de la plaque dans le test du SNP

Extrait 1
3 répétitions pour
chaque dose

Extrait 2
3 répétitions pour
chaque dose

Extrait 3
3 répétitions pour
chaque dose

Extrait 4
3 répétitions pour
chaque dose



Annexe 08 : Image de la plaque dans l'activité inhibitrice de l' α -amylase

Extrait 1
3 répétitions
pour chaque
dose As

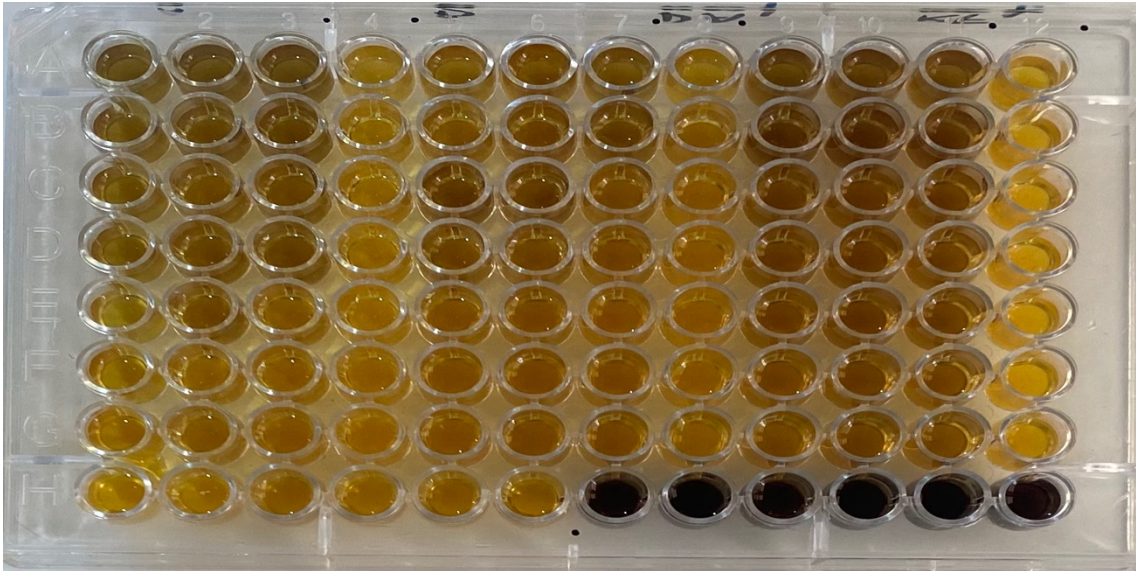
B.E
1
Ab

Extrait 2
3 répétitions
pour chaque
dose As

B.E
2
Ab

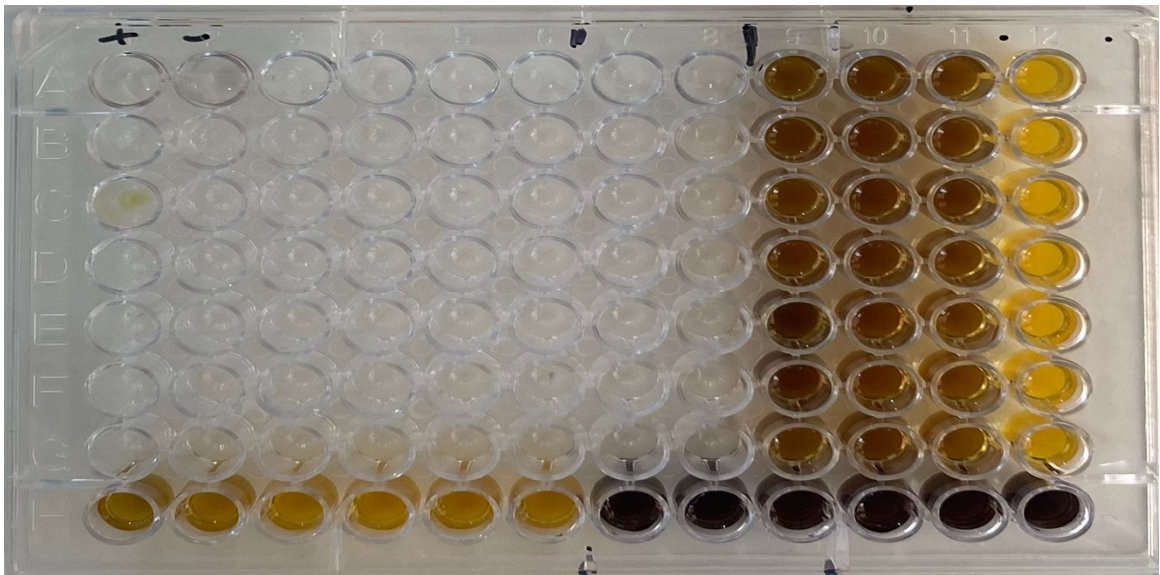
Extrait 3
3 répétitions
pour chaque
dose As

B.E
3
Ab



Extrait 4
3 répétitions
pour chaque
dose As

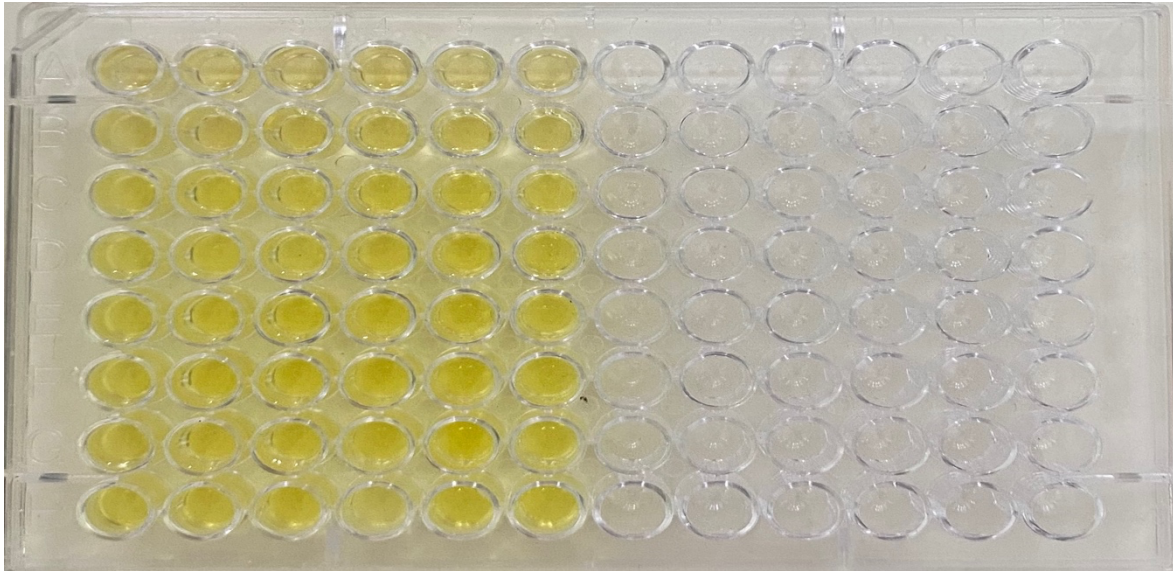
B.E
4
Ab



Annexe 09 : Image de la plaque dans l'activité inhibitrice de l'Acéthylcholinesterase

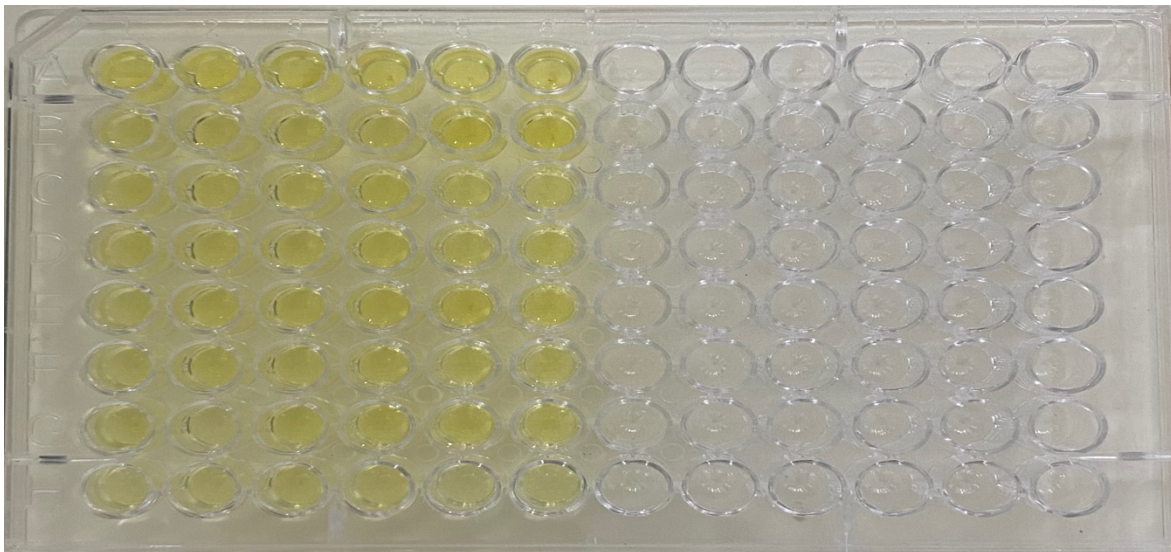
Extrait 1
3 répétitions pour
chaque dose

Extrait 2
3 répétitions pour
chaque dose



Extrait 3
3 répétitions pour
chaque dose

Extrait 4
3 répétitions pour
chaque dose



Annexe 10 : Image de la plaque dans Activité protectrice vis-à-vis les rayonnements solaires

