

République Algérienne démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature de la Vie, des sciences de la Terre et de
l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

THESE

Présentée par : M^{elle} **GHALEM Meriem**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En Physiologie et Biochimie de la Nutrition

Thème

**Effets antioxydants et anti-inflammatoires des extraits de
Zizyphus lotus et *Anthyllis vulneraria***

Soutenue le : // 2014

devant le jury composé de :

Présidente :	Mme MERZOUK Hafida	Professeur	Université de Tlemcen
Directrice de thèse :	Mme BELARBI Meriem	Professeur	Université de Tlemcen
Co-Directrice de thèse :	Mme MERIAH Salima	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur :	Mr HICHAMI Aziz	Maitre de conférences	Université de Bourgogne
Examineur :	Mr RIALLAND Mickael	Maître de conférences	Université de Bourgogne
Examineur :	Mr BEGHALIA Mohamed	Maître de conférences	Université de Relizane

Année Universitaire : 2013-2014

Dédicaces

*A mes chers parents, pour leur amour, leur soutien et tous leurs
sacrifices*

A mes chères sœurs (Asma, Kawther).

A mes chers frères (Mohamed, Othmen, Mohsen).

A mes grands-parents.

A mes tantes et mes oncles.

A mes cousins et cousines surtout Amel.

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

Remerciements

C'est avec un réel plaisir que je réserve ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Avant tout, je remercie Dieu tout puissant pour m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail.

Je tiens tout d'abord à remercier :

Mr CHAABANE SARI Daoudi, Professeur à l'université de Tlemcen faculté SNV-STU et Directeur du laboratoire de recherche LAPRONA " produits naturels", pour son aide et sa gentillesse.

Mr GHALEM Said, Professeur à l'université de Tlemcen faculté des sciences et Directeur du laboratoire de recherche LASNABIO" Substances naturelles et bioactives", pour son aide et son soutien moral.

J'adresse mes sincères remerciements à *Mme BELARBI Meriem*, Professeur à l'université de Tlemcen et Vice-Doyenne de la faculté SNV-STU, ainsi que *Mme MERJAH Salima*, Professeur à l'université de Tlemcen faculté des sciences, pour leurs encadrements, leurs accueils bienveillants qu'elles ont su me réserver au sein de leurs équipes et leurs orientations. Qu'elles soient rassurées de ma profonde gratitude.

Je suis particulièrement reconnaissante à *Mme MERZOUK Hafida* Professeur à l'université de Tlemcen pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir acceptée la présidence du jury de ma thèse. Qu'elle soit assurée de ma respectueuse considération.

J'exprime mon estime et mes remerciements aux honorables membres de jury :

Je remercie énormément *Mr HICHAMI Aziz*, Maître de conférences à l'université de Bourgogne-Dijon (France), pour ses précieux conseils de tout ordre, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse lors de mes séjours à Dijon ainsi que pour avoir accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail.

Mes remerciements sincères et respectueux vont à *Mr Mickael Rjalland*, Maître de conférences à la Faculté Science Gabriel de Dijon de l'Université de Bourgogne, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger mon travail.

J'adresse mes sincères remerciements à *Mr BEGHALIA Mohamed*, Maître de conférences à l'Université de Relizane, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ce travail et de participer à ce jury.

Je remercie le *Mr GHIRJINGHELLI François*, Professeur à l'université de Bourgogne-Dijon, Je le remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire de « Lipides, Cancer » à Dijon.

Je tiens à remercier *Mr BENMAHDI Tarik*, Maître-Assistant en anapathologie du centre vétérinaire de Mostaganem, pour son aide précieuse, sa gentillesse. Mes remerciements vont aussi au Directeur du centre vétérinaire de Mostaganem.

J'ai le plaisir sincère de remercier *Pr DIB*, chef de service anapathologie et *Mr KARA*, Maître-Assistant en anapathologie au CHU de Tlemcen, pour leurs aides précieuses.

Je témoigne également ma reconnaissance sincère à *Mr MERZOUK Sid Ahmed*, Professeur à l'université de Tlemcen, pour ses critiques constructives dans le domaine des statistiques.

Je remercie très chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail, particulièrement :

Mr GHOUALI Nouredine, Professeur et Recteur de l'Université de Tlemcen

Mr Bensalah Mustapha, Professeur à l'université de Tlemcen et Doyen de la faculté SNV-STU, ainsi que *Mr Tabti Boufeldja*, Professeur à l'université de Tlemcen et Doyen de la faculté des sciences, pour leurs aides.

Mme BENYELLEES Lila Maître- Assistante à la Faculté SNV-STU, je la remercie pour ses précieux conseils, et son soutien moral.

Mr Souleymane Abdoulaziz thésard à l'université de Bourgogne pour son encouragement et ses précieux conseils.

Merci aux membres du laboratoire « Lipides, cancer » de l'université de Bourgogne et les membres des laboratoires LAPRONA et LASNABIO de l'université de Tlemcen, pour les échanges scientifiques ainsi que *Melle Djaziri F.z*, *Mme KHALDI Darine*, *Melle DIB Hanane* doctorantes à l'université de Tlemcen pour leurs qualités humaines, leurs soutiens, et leurs générosités, merci.

Que tous mes amis du Département de Biologie à la Faculté des SNV-STU de Tlemcen trouvent ici l'expression de ma profonde amitié.

"Un travail ne vaut que s'il est partagé par tout le monde"

المخلص

قمنا بدراسة التركيبية الكيميائية لنتائج الابيض الأولية والثانوية- لنبات السدر الجبلي المعروف بالنبق (ثمار منزوعة النواة و جذور النبتة) من عائلة النبقيات ونبات البرسيم المعروف بالنقل (الأزهار و الأوراق) من عائلة البقولية. أظهرت نتائج الفحص المخبري غنى كل من جذور وثمار النبق المنزوعة النواة بالألياف الغذائية و بمتعددات الفينول, لاحظنا تواجد حمض يروسيك ضمن تركيبة الأحماض الدسمة المتواجدة في الزيت المستخلص. من جهة أخرى لاحظنا غنى أوراق و أزهار البرسيم بالأحماض المعدنية, بالأحماض الدسمة الغير مشبعة و أيضا بمتعددات الفينول. بعد معرفة التركيبية الكيميائية لمختلف أجزاء النبتتين و التأكد من غناها بالمواد الفعالة ذات الخصائص العلاجية, خاصة المركبات الفينولية (العفص و الفلافونويدات) كان لزاما علينا أن نتأكد من عدم سميتها و دراسة قدراتها و نشاطاتها البيولوجية. اثبت الفحص المخبري انعدام سمية مختلف المستخلصات الفينولية عند كلتا النبتتين. أظهر تقدير النشاط المضاد للأكسدة, للمركبات الفينولية بتركيز منخفض, قدرة عالية وذلك بمختلف طرق قياس الطيف الضوئي (النشاط العام, قدرة تنظيف الجذور الحرة, قدرة إرجاع شوارد الحديد, قدرة حماية المواد الدسمة من الأكسدة من خلال طريقة β كاروتين). بالنسبة للنشاط المضاد للالتهاب للمركبات الفينولية, بطريقة قياس كمية أكسيد النتروجين المحررة نلاحظ ان المركبات الفينولية في جذور نبات النبق في أزهار نبات البرسيم تتمتع بقدرة تثبيط عالية لأكسيد النتروجين مقارنة بالأجزاء الأخرى (الثمار المنزوعة النواة و الأوراق). جاءت دراسة مختلف النشاطين البيولوجيين لثمار النبق بما في ذلك القدرة المضادة للأكسدة والالتهاب عند جردان التجارب من نوع ويستر كمرحلة أساسية مكملة للتجارب السابقة. خضعت الجردان لنظام غذائي مشبع بالدهم و غني بثمار النبق المنزوعة النواة. أظهرت الفحوصات المخبرية من جهة , تراجع مستويات الغلوكوز و التريغليسيريدات في المصل و كذا انخفاض ملحوظ في معدل الوزن و من جهة أخرى ارتفاع في نشاط أنزيمي غلوتاتيون بيروكسداز و الغلوتاتيون ريديكتاز.

الكلمات المفتاحية : البرسيم, النبق المنزوع النواة, متعددات الفينول, النشاط المضاد للأكسدة القدرة المضادة للالتهاب

Résumé

L'étude de *Zizyphus lotus* (*Rhamnaceae*) et *Anthyllis vulneraria* (*Fabaceae*) a porté sur un screening phytochimique (dosage des métabolites primaires et secondaires). Les résultats obtenus montrent que la pulpe et la racine de *Zizyphus lotus* sont riches en fibre et en polyphénols. On note la présence de l'acide érucique dans les deux parties. Cependant, la feuille et la fleur d'*Anthyllis vulneraria* sont riches en matière minérale, en polyphénols et en acides gras insaturés. L'évaluation du pouvoir antioxydant *in vitro* par des méthodes colorimétriques (CAT, DPPH, FRAP, β -carotène) a montré que les différents extraits de *Zizyphus lotus* et d'*Anthyllis vulneraria* ont une forte activité antioxydante à faible concentration. Les tests de toxicité montrent que les différents extraits phénoliques de *Zizyphus lotus* et d'*Anthyllis vulneraria* ne présentent aucune toxicité pour des concentrations comprises entre 31.25 $\mu\text{g/ml}$ et 10 mg/ml . Par ailleurs, l'évaluation du pouvoir anti-inflammatoire des extraits phénoliques de *Zizyphus lotus* et d'*Anthyllis vulneraria* par le dosage du taux de la libération de NO_2 par les RAW2647 a été étudiée. Il a été montré qu'à une concentration de 0.5 mg/ml , l'extrait phénolique de la racine a un pouvoir d'inhiber la libération de NO_2 plus élevée que celui de la pulpe de *Zizyphus lotus*. Pour l'*Anthyllis vulneraria*, la fleur a montré le même effet par rapport à la feuille. De plus, nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de la pulpe de *Zizyphus lotus* chez les rates de souche « Wistar » recevant des régimes hypergras enrichis en pulpe de *Zizyphus lotus*. Les résultats obtenus montrent que la pulpe diminue le poids, les taux de la glycémie ainsi que les triglycérides plasmatiques d'une part et d'autre part elle augmente l'activité de la glutathion peroxydase et la glutathion réductase. En outre la pulpe de *Zizyphus lotus* augmente la peroxydation lipidique intracellulaire et favorise l'accumulation des acides gras au niveau des hépatocytes. La pulpe de *Zizyphus lotus* a un effet protecteur de la paroi colique et également un effet anti-inflammatoire. En conclusion, l'étude a révélé que l'*Anthyllis vulneraria* et *Zizyphus lotus*, deux plantes largement utilisées en médecine traditionnelle, ont effectivement des pouvoirs antioxydant et anti-inflammatoire.

Mots clés : *Anthyllis vulneraria*, *Zizyphus lotus*, polyphénols, pouvoir antioxydant, activité anti-inflammatoire.

Abstract

The study of *Zizyphus lotus* (*Rhamnaceae*) and *Anthyllis vulneraria* (*Fabaceae*) concerned a phytochemical screening (dosage of the primary and secondary metabolites). The obtained results show that the pulp and the root of *Zizyphus lotus* are rich in fiber and in polyphenols and we note the presence of the erucic acid in both parts. While the leaf and the flowers of *Anthyllis vulneraria* are rich in mineral matter, in polyphenols and in unsaturated fatty acids. The evaluation of the *in vitro* antioxidant power by colorimetric methods (CAT, DPPH, FRAP, β - carotene) showed that the different extracts of *Zizyphus lotus* and *Anthyllis vulneraria* have a strong antioxidant activity at low concentrations. The tests of toxicity show that the different phenolic extracts of *Zizyphus lotus* and *Anthyllis vulneraria* present no toxicity with concentrations ranged between 31.25 $\mu\text{g/ml}$ and 10 mg/ml . Moreover, the evaluation of anti-inflammatory power of phenolic extracts from *Zizyphus lotus* and *Anthyllis vulneraria* by assaying the release rate by NO_2 RAW2647 was studied. The results showed that at the concentration of 0.5 mg/ml , the phenolic extract root has the power to inhibit the release of NO_2 higher than that of pulp *Zizyphus lotus*. For *Anthyllis vulneraria*, the flowers showed the same effect than the leaves. Furthermore, we are interested to the *in vivo* study of antioxidant and anti-inflammatory properties of pulp from *Zizyphus lotus* on strain rats "Wistar" receiving hypergras enriched by pulp *Zizyphus lotus*. The results demonstrate that the pulp reduces weight, blood glucose and plasma triglycerides in the other hand, it increases the activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase. Furthermore pulp *Zizyphus lotus* increased intracellular lipid peroxidation and promotes the accumulation of fatty acids in hepatocytes. However, *Zizyphus lotus* pulp has a protective effect of the colonic wall and also an anti-inflammatory effect. In conclusion, the study revealed that *Anthyllis vulneraria* and *Zizyphus lotus*, two plants actually widely used in traditional medicine, have antioxidant and anti-inflammatory powers.

Keywords: *Anthyllis vulneraria*, *Zizyphus lotus*, polyphenols, antioxidant power, anti-inflammatory activity.

Abréviation

AA : acide arachidonique.

ACC : acétyl-coenzymeA carboxilase.

AGM: acide gras mono- insaturé.

AGPI: acide gras poly-insaturé.

AGS: acide gras saturé.

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens.

AIS : anti-inflammatoires stéroïdiens.

AMP cyclique : Adénosine monophosphate cyclique.

ATP : Adénosine triphosphate.

BHA : butylhydroxyanisole.

CAT : capacité antioxydante totale (Total antioxidant capacity).

COX: cyclooxygénase.

CPG: Chromatographie en phase gazeuse.

DNPH: Dinitrophénylhydrazine.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.

EAA : équivalent d'acide ascorbique.

EC₅₀ (IC₅₀) : concentration inhibitrice à 50 %.

EDTA: Acide éthylènediaminetetraacétique.

EM: enzyme malique.

EOR: espèces oxygénées.

FRAP: Capacités réductrices ferriques d'antioxydants (Ferric reducing/antioxidant power).

GA : acide gallique.

GK: glucokinase.

GPx : glutathion peroxydase.

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène.

HDL: High-density lipoprotein (lipoproteins de haute densité).

HFAD P: high fatty acid diet with pulp of *Zizyphus lotus*.

HFAD: high fatty acid diet.

IL : interleukine.

LDL: Low-density Lipoprotéin (lipoprotéine de faible densité).

LPL : lipoprotéine-lipase.

LT : Leucotriène.

M : million.

MDA: Malondialdéhyde.

MS : matière sèche.

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NASH : Non Alcoholic Stéatohepatitis.

NO: monoxyde d'azote

OH : groupe hydroxyle.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PAF : facteur activateur de plaquettes.

PK : pyruvate kinase.

PNN : polynucléaires neutrophiles.

PPAR- γ : Peroxisomal Proliferator Activated Receptor- γ .

ROS espèces réactives oxygénées.

SOD : superoxyde dismutase.

TA : acide tannique.

TBA: Acide ThioBarbiturique.

TCA: Acide Trichloroacétique.

TG: Triglycérides.

TNF α : facteur de nécrose tumorale.

TX : thromboxane.

Liste des tableaux

Tableau 1. Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires	14
Tableau 2. Les principales activités biologiques des composés polyphénoliques	21
Tableau 3. Période de la récolte des plantes étudiées	23
Tableau 4. Les parties utilisées de plantes	24
Tableau 5. Taux de la matière sèche	36
Tableau 6. Résultats des tests phytochimiques des plantes étudiées.	37
Tableau 7. Les teneurs en métabolites primaires exprimées en pourcentage de matière sèche	38
Tableau 8. Teneur en lipides totaux	38
Tableau 9. Composition en acides gras (g/100 g de lipides totaux) des différentes parties de <i>Zizyphus lotus</i>	39
Tableau 10. Composition en acides gras (g/100 g de lipides totaux) des différentes parties d' <i>Anthyllis vulneraria</i>	40
Tableau 11. Les rendements des extraits des plantes étudiées	40
Tableau 12. Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des plantes étudiées	41
Tableau 13. Teneurs en tanins des plantes étudiées	41
Tableau 14. La composition moyenne en acides gras des principales huiles végétales comestibles.	62
Tableau 15. Composition des régimes témoins et expérimentaux en pourcentage pondéraux	71
Tableau 16. Poids relatif (g/100g) des organes des rates témoins et expérimentaux	86
Tableau 17. Interprétation de l'étude histologique du foie des rates de différents lots.	86
Tableau 18. Interprétation de l'étude histologique du colon des rates de différents lots	88

Liste des figures

Figure1. Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant	5
Figure 2. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	6
Figure3. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	7
Figure 4. Les grandes étapes de la réaction inflammatoire aiguë	11
Figure 5. Squelette de base des composées phénoliques	17
Figure 6. Les différentes classes des polyphénols	18
Figure 7. Méthode d'isolement et purification des splénocytes	34
Figure 8. Pourcentage de réduction en fonction de la concentration des extraits phénoliques d' <i>Anthyllis vulneraria</i> .	44
Figure 9. Pourcentage de réduction en fonction de la concentration des extraits phénoliques de <i>Zizyphus lotus</i> .	44
Figure 10. 50% d'inhibition du radical libre DDPH des différentes fractions de la racine de <i>Zizyphus lotus</i>	45
Figure 11. 50% d'inhibition du radical libre DDPH des différentes fractions de la pulpe de <i>Zizyphus lotus</i> .	45
Figure 12. 50% d'inhibition du radical libre DDPH des différentes fractions de la feuille d' <i>Anthyllis vulneraria</i>	46
Figure 13. 50% d'inhibition du radical libre DDPH des différentes fractions de la feuille d' <i>Anthyllis vulneraria</i>	46
Figure 14. 50% d'inhibition le blanchiment du β -carotène des différentes fractions de la pulpe de <i>Zizyphus lotus</i>	48
Figure 15. 50% d'inhibition le blanchiment du β -carotène des différentes fractions de la racine de <i>Zizyphus lotus</i>	48
Figure 16. 50% d'inhibition le blanchiment du β -carotène des différentes fractions de la fleur d' <i>Anthyllis vulneraria</i>	49
Figure 17. 50% d'inhibition le blanchiment du β -carotène des différentes fractions de la feuille d' <i>Anthyllis vulneraria</i>	49
Figure 18. Réduction du fer des extraits des fleurs et feuilles d' <i>Anthyllis vulneraria</i>	51
Figure 19. Réduction du fer des extraits de racine et pulpe de <i>Zizyphus Lotus</i>	51
Figure 20. Comparaison de la capacité antioxydante totale des extraits des plantes étudiées	52
Figure21. Effets des extraits phénoliques de la racine et de la pulpe de <i>Zizyphus lotus</i> et fleur et feuille d' <i>Anthyllis vulneraria</i> sur la prolifération des splénocytes	54
Figure22. Le taux d'ADN cellulaire mesuré par Cyquant NF Cell Prolifération Assay Kit dans des splénocytes traité par les extraits phénoliques de deux plantes étudiées	54
Figure 23. Taux de NO ₂ libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits phénoliques de la pulpe <i>Zizyphus lotus</i>	56
Figure 24. Taux de NO ₂ libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits phénoliques de la racine <i>Zizyphus lotus</i>	56
Figure 25. Taux de NO ₂ libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits phénoliques de la fleur d' <i>Anthyllis vulneraria</i>	57
Figure 26. Taux de NO ₂ libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits phénoliques de la feuille d' <i>Anthyllis vulneraria</i>	57

Figure 27. Protocole expérimental	70
Figure 28. Gain du poids corporel (g) chez les rates témoins et expérimentales.	76
Figure 29. Évolution de la glycémie (g/L) chez les rates témoins et expérimentales.	77
Figure 30. Teneur plasmatique en cholestérol totale (g/dl) chez les rates témoins et expérimentales	79
Figure 31. Teneur plasmatique en triglycérides (g/L) chez les rates témoins et expérimentales	79
Figure 32. Teneur plasmatique en glutathion peroxydase (mmol/min/ml) chez les rates témoins et expérimentales	81
Figure 33. Teneur plasmatique en glutathion réductase (Unit/ml) chez les rates témoins et expérimentales	81
Figure 34. Teneur plasmatique en catalase (U/ml/min) chez les rates témoins et expérimentales	82
Figure 35. Teneur plasmatique en SOD (U/ml) chez les rates témoins et expérimentales	82
Figure 36. Teneur plasmatique en hydroperoxydes ($\mu\text{mol/l}$) chez les rates témoins et expérimentales	84
Figure 37. Teneur plasmatique en Malondialdéhyde ($\mu\text{mol/l}$) chez les rates témoins et expérimentales	84
Figure 38. Teneur plasmatique en Protéines carbonylées ($\mu\text{mol/l}$) chez les rates témoins et expérimentales	85
Figure 39. Coupe histologique du foie des rates contrôles (x100)	87
Figure 40. Le parenchyme hépatique des rates recevant le régime enrichi en graisse et en cholestérol HFAD	87
Figure 41. Le parenchyme hépatique des rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de <i>Zizyphus lotus</i> (HFADP).	87
Figure 42. Coupe histologique du colon des rates contrôles	89
Figure 43. Coupe histologique du colon des rates recevant le régime enrichi en graisse et en cholestérol HFAD	89
Figure 44. Coupe histologique du colon des rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de <i>Zizyphus lotus</i> (HFADP).	89

Tables des matières

Avant-propos	1
Partie bibliographique	
Introduction générale	4
Partie expérimentale	
Partie in vitro : Étude phytochimique de <i>Zizyphus lotus</i>, <i>Anthyllis vulneraria</i> et évaluation des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de leurs extraits phénoliques	
Matériels et méthodes	
I. Présentation des plantes étudiées	22
I.1. <i>Anthyllis vulneraria</i> : la vulnéraire, trèfle des sables	22
I.2. <i>Zizyphus lotus</i> : jujubier sauvage	23
I.3. Origine géographique et période de récolte des plantes	23
I.4. Identification botanique	24
I.5. Préparation des échantillons	24
II. Méthodes d'analyses utilisées	24
II.1. Détermination de la teneur en eau	24
II.2. Tests phytochimiques	24
II.2.1 Différentes familles recherchées	24
II.2.1.1 Les alcaloïdes	24
II.2.1.2 Les flavonoïdes	25
II.2.1.3 Les tanins	25
II.2.1.4 Les saponosides	25
II.2.1.5 Les stérols et stéroïdes	26
II.2.1.6 L'amidon	26
II.2.1.7 Les composés réducteurs	26
III. Détermination quantitative des métabolites primaires	26
III.1. Dosage de l'azote total et les protéines brutes	26
III.2. Dosage des fibres alimentaires	26
III.3. Dosage des sucres totaux	27
III.4. Dosage des cendres	27
III.5. Dosage des lipides totaux	27
IV. Dosage des acides gras par Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	28
V. Dosages des métabolites secondaires	29
V.1. Dosage des polyphénols totaux	29
V.2. Dosage des flavonoïdes	29
V.4. Dosage des tanins hydrolysables	30
VI. Extraction de quelques métabolites secondaires	30
VI.1. Extraction des polyphénols totaux	30
VI.2. Extraction des flavonoïdes	30
VI.3. Extraction des tanins	30
VII. Tests d'activité antioxydante	31

VII.1 Effet scavenger du radical DPPH	31
VII.2. Test du blanchissement du β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique	31
VII.3. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	32
VII.4. Activité antioxydante totale (CAT)	32
VIII. Tests de toxicité, viabilité et prolifération cellulaire	32
VIII.1. Isolement des splénocytes	32
VIII.2. Comptage des splénocytes	33
VIII.3. Cyquant cell proliferation assay kit	33
IX. Effet anti-inflammatoire des extraits phénoliques de <i>Zizyphus lotus</i> et <i>Anthyllis vulneraria</i>	35
IX.1. Dosage de NO ₂	35
Résultats et interprétations	
I. Taux de la matière sèche	36
II. Tests phytochimiques	36
III. Métabolites primaires	38
IV. Teneur en matière grasse	38
V. Les rendements des extraits des plantes étudiées	40
VI. Dosages des métabolites secondaires	41
VI.1. Polyphénols et flavonoïdes	41
VI.2. Familles tanniques	41
VII. Activité antioxydante des extraits des plantes étudiées	42
VII. Effets des extraits phénoliques sur la prolifération des splénocytes de rat (cytotoxicité).	53
VIII. Activité anti-inflammatoire des extraits phénolique de <i>Zizyphus lotus</i> et <i>Anthyllis vulneraria</i> .	55
Discussion	58
Partie in vivo : Effets antioxydants et anti-inflammatoires de <i>Zizyphus lotus</i> chez le rat « wistar »	
Matériel et méthodes	
I. Choix des animaux	69
II. Préparation des régimes	69
III. Dosage des paramètres sanguins	71
III.1.1 Dosage des triglycérides plasmatique	71
III.1.2 Dosage du cholestérol plasmatique	72
IV.2 Détermination de quelques paramètres du statut oxydant/antioxydant	72
IV.2.1. Détermination du taux d'hydroperoxydes plasmatiques	72
IV.2.2. Dosage du malondialdéhyde plasmatique (MDA)	72
IV.2.3. Détermination des protéines carbonylées plasmatiques	72
IV.2.4. Dosage des enzymes antioxydantes	72

IV.2.4.1. Dosage de l'activité de la Catalase	72
IV.2.4.2. Dosage de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)	73
IV.2.4.3. Dosage de l'activité du glutathion réductase	73
IV.2.4.4. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase	73
V. Analyse statistique	73
VI. Analyse histologique	74
VI.1. Préparation des coupes histologiques	74
Résultats et interprétations	
I. Evolution de la prise du poids corporel chez les rates	76
II. Etude biochimique	77
II.1. évolution de la glycémie	77
II.2. Teneur plasmatique en cholestérol totale	78
II.3. Teneur plasmatique en triglycérides	78
III. Statut oxydant/antioxydant	80
III.1. Teneurs en glutathion peroxydase plasmatique	80
III.2. Teneur en glutathion réductase plasmatique	80
III.3. Teneur en catalase plasmatique	80
III.4. Teneur en superoxyde dismutase (SOD) plasmatique	80
III.5. Teneurs plasmatiques en hydroperoxydes	83
III.6. Teneurs plasmatiques en Malondialdéhyde (MDA)	83
III.7. Teneurs plasmatiques en Protéine carbonylées	83
IV. Analyse histologique	86
Discussion	90
Conclusion générale	110
Références bibliographiques	113
Annexes	

Avant-propos

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et instables, participant au vieillissement des protéines, à la peroxydation lipidique, et à l'altération de l'ADN. Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de la mort cellulaire, il est actuellement admis que les ERO sont de véritables seconds messagers impliqués dans l'expression des gènes, et la régulation des fonctions de prolifération. De plus, ils sont des médiateurs inflammatoires impliqués dans diverses pathologies (**Dhalla, 2000**).

Actuellement, la majorité des recherches en nutrition sont basées sur le lien entre la composition de certains aliments et la prévention de divers dysfonctionnements métaboliques qui se traduit généralement par des pathologies (**Shahidi et Miraliakbari, 2004**).

Plusieurs pays d'Afrique y compris l'Algérie mènent des Investigations visant à développer des médicaments issus de plantes de médecine traditionnelle. En réalisant des études phytochimiques, pharmaco-toxicologiques et cliniques pour la mise au point de médicaments traditionnels améliorés (M.T.A.).

En 1978, l'Organisation Mondiale de la Santé (**O.M.S.**) s'est résolument engagée à revaloriser la pharmacopée traditionnelle afin de pouvoir satisfaire aux besoins de santé des populations.

Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé (**Carillon, 2000**). À l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles représentent près de 60% des médicaments, dont nous disposons (**O.M.S, 2000**). Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nées de la synthèse chimique de molécules ou parties de molécules naturelles prises comme tête de séries (**Fouché et al., 2000**).

Les effets biologiques des polyphénols ont été évalués dans de nombreuses études et souvent associés à leurs propriétés antioxydantes intrinsèques. Il a été montré *in vitro* que les polyphénols avaient des effets protecteurs sur des modèles de stress oxydatif.

Les études menées *in vivo* n'ont détecté que de faibles concentrations plasmatiques de polyphénols, insuffisantes pour avoir un effet antioxydant direct. Cependant, de récentes études ont montré que ces micronutriments pouvaient agir indirectement sur le stress oxydant en stimulant l'expression et l'activité des systèmes de défense. Toutefois, il est désormais admis que leurs effets ne se limitent pas à leurs propriétés antioxydantes directes ou indirectes

et de récentes données ont suggéré que les polyphénols avaient la capacité d'agir sur l'expression des gènes ainsi que sur de nombreuses voies de signalisation impliquées dans des processus pathologiques comme l'inflammation.

Les études portant sur le métabolisme de ces composés ont montré que les polyphénols sont faiblement absorbés au niveau de l'estomac ou de l'intestin grêle et qu'ils sont présents en grande quantité dans la lumière du côlon où ils pourraient exercer des effets antioxydants et anti-inflammatoires.

L'objectif de cette thèse portent principalement sur la composition chimique et les activités antioxydante, anti-inflammatoire des deux plantes de la flore algérienne : *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria*.

Les différentes espèces du *Zizyphus* sont largement utilisées dans le traitement de certaines maladies comme : les troubles digestives, la faiblesse, les affections du foie, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections cutanées, la fièvre, la diarrhée et l'insomnie (**Abu-Zarga et al., 1995 ; Abdel-Zaher et al., 2005; Suksamrarn et al., 2005**). Les recherches actuelles sur les différentes activités pharmacologiques de *Zizyphus lotus* ont ressorti plusieurs effets de grande importance pour la médecine moderne. Parmi ces effets on souligne les plus importants :

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

- *Zizyphus lotus* inhibe la production de monoxyde d'azote (NO), cette activité apparaît potentiellement avec l'extrait méthanolique de l'écorce des racines qui est la source possible de l'agent anti-inflammatoire dans la réaction de l'hypersensibilité retardée induite par oxazolone .Les feuilles du *Zizyphus lotus* possèdent des effets analgésiques attribués à leur contenu en principes actifs ; les flavonoïdes et les saponines, Toutes ces activités confirment l'usage traditionnel de cette plante dans certaines maladies inflammatoires et douloureuses, (**Borgi et al.,2007 ; Borgi et al ., 2008**).

- Les feuilles, l'écorce des racines de *Zizyphus lotus* possède une importante activité antiulcérogénique attribuée à la présence des tanins et des flavonoïdes connus par leur effet gastroprotecteur (**Borgi et al ., 2007**).

Anthyllis vulneraria était connue comme traitement thérapeutique de la cicatrisation des tissus et des inflammations cutanées. Elle est employée dans les contusions, les

constipations, les foulures et les engelures. Cette plante renferme des tannins, qui ont un effet astringent et hémostatique (Menkovic et al., 2011).

La première partie de cette thèse consiste à l'étude phytochimique et l'évaluation des activités *in vitro* antioxydante et anti-inflammatoire des extraits issus de la pulpe, la racine de *Zizyphus lotus* et les fleurs, les feuilles d'*Anthyllis vulneraria*. Ainsi que des tests de toxicité ont été également réalisés

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'effet préventif de la consommation de la pulpe de *Zizyphus lotus* contre le stress oxydatif et l'inflammation chez le rat « Wistar ».

Partie Bibliographique

Introduction générale

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut devenir excessive et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre, mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution et certaines pathologies comme le diabète, le cancer, le SIDA, l'inflammation, pathologies cardiovasculaires) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre production de radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (**Figure 1**) (**Pincemail et al., 2000**).

Pour définir le stress oxydant, il faut d'abord définir ce que sont les radicaux libres. Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Celle-ci est variable selon la nature du radical. En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l'O₂.

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène (O₂⁻, OH[•], NO[•], ROO[•]), mais également les composés non radicalaires (ROOH, H₂O₂, 1O₂) (**Milane, 2004**).

Il est important d'évoquer alors le paradoxe de l'O₂ : il est indispensable au fonctionnement cellulaire mais il est aussi la source des ERO qui peuvent provoquer des dommages aux macromolécules biologiques (ADN, protéines, phospholipides membranaire) (**Droge, 2002**). Les ERO sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée en agissant comme second messager (**Thannickal et Fanburg, 2000 ; Droge, 2002**)

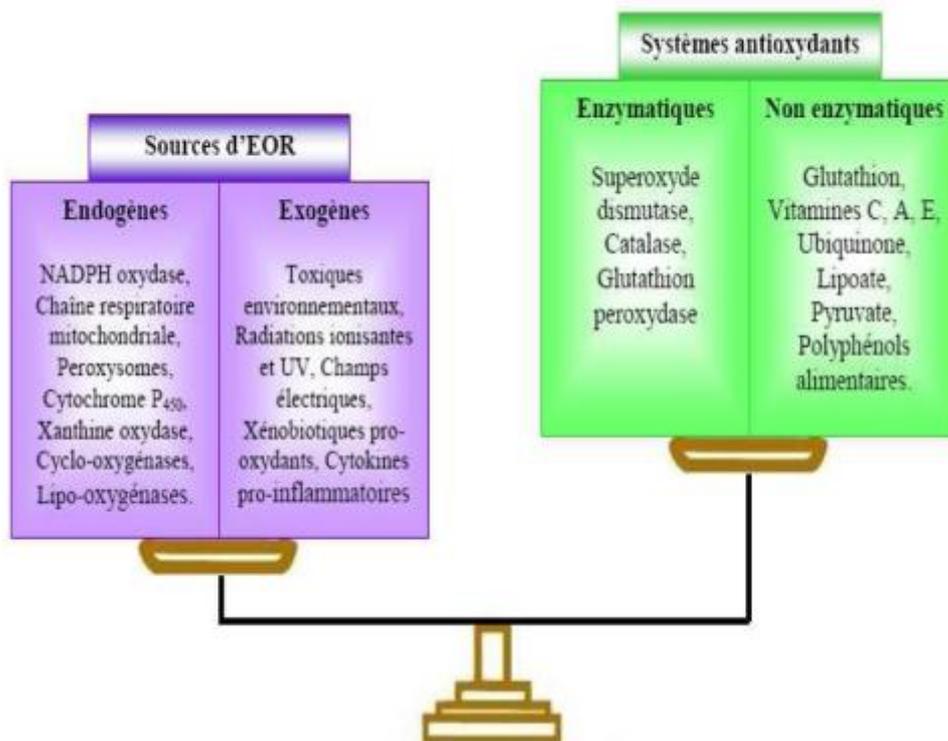


Figure1. Déséquilibre de la balance entre pro-oxydant et antioxydant

Dans les cellules de mammifères, les radicaux libres proviennent essentiellement de réaction enzymatique et découlent principalement de la NADPH oxydase membranaire ou du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire.

En effet, la production de radicaux libres est une conséquence inévitable de la respiration aérobie qui consomme de l'oxygène moléculaire (O_2). Le métabolisme énergétique des organismes aérobie dépend de la phosphorylation oxydative, processus par lequel l'énergie du transfert d'électrons formés lors du cycle de Krebs à partir du NADH, est transformée en une liaison phosphate dans la molécule d'ATP. C'est l'oxygène moléculaire qui sert d'accepteur final des électrons lors de ce transfert (d'où le nom de chaîne respiratoire) : une molécule d' O_2 est réduite par 4 électrons en 2 molécules d' H_2O par cytochrome c oxydase.

L' O_2 est un bi-radical avec deux électrons célibataires mais il ne peut pas accepter simultanément les électrons nécessaires à sa réduction en H_2O . Ainsi, la réduction incomplète de l' O_2 en H_2O peut conduire à la formation d'intermédiaires réduits, hautement réactifs. La production des radicaux libres n'est pas négligeable puisque 2% des électrons de la chaîne de transfert conduisant à leur formation en conditions physiologiques normales (**Figure 2**) (Nohl et Hegner, 1978).

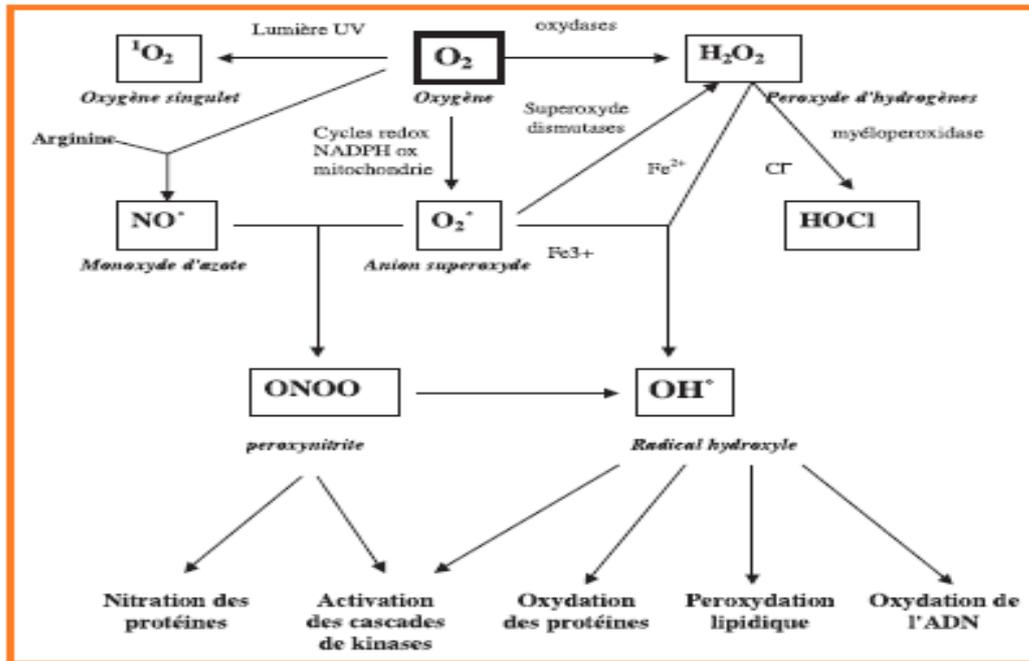
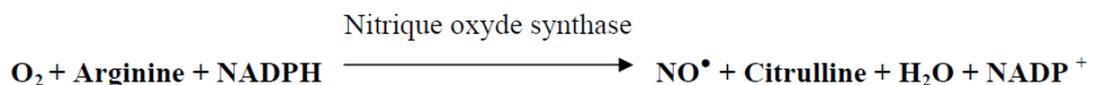


Figure 2. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l’oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

La production et l’intervention dans de nombreuses fonctions cellulaires des ERO sont réalisées dans trois compartiments :

L’O₂ est incapable de traverser les structures membranaires, c’est pourquoi son action est essentiellement localisée en deux pools non communicants, l’un mitochondrial, l’autre cytosolique.

Un autre type d’espèce réactive c’est le monoxyde d’azote (NO•) est produit chez les organismes supérieurs par l’oxydation de l’un des atomes N terminaux de la L-arginine, cette réaction est catalysée par le nitrique oxyde synthase (NOS) (Sorg, 2004) selon la réaction suivante :



Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans la neurotransmission, régulation de la pression sanguine, mécanisme de défense, relaxation des muscles lisses, régulation immune (Valko *et al.*, 2007). Mais à forte concentration, le NO• devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le O₂•⁻ pour former un puissant oxydant le

peroxynitrite (ONOO•) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO₂ et le OH• (Densiov et Afanas'ev, 2005).

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des EOR est assuré par des systèmes d'antioxydants. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (Figure3). La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus, les types cellulaires et le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et en systèmes non enzymatiques (Goudable et Favier, 1997).

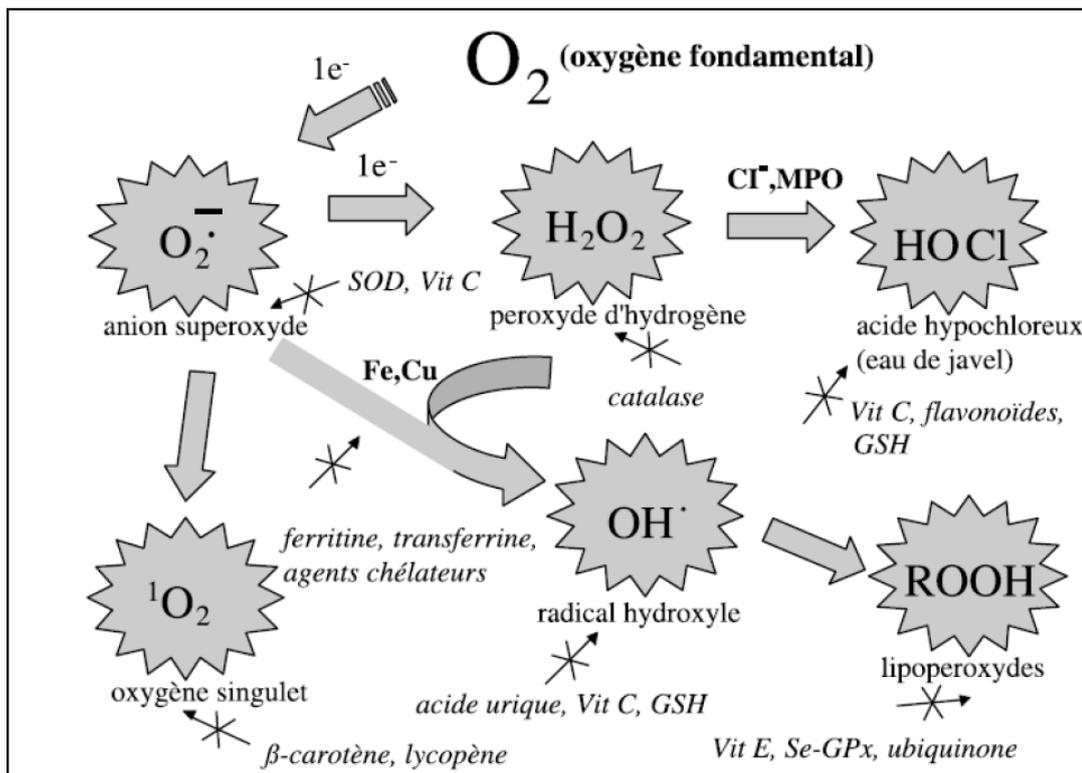


Figure3. Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (D'après Pincemail *et al.*, 2002).

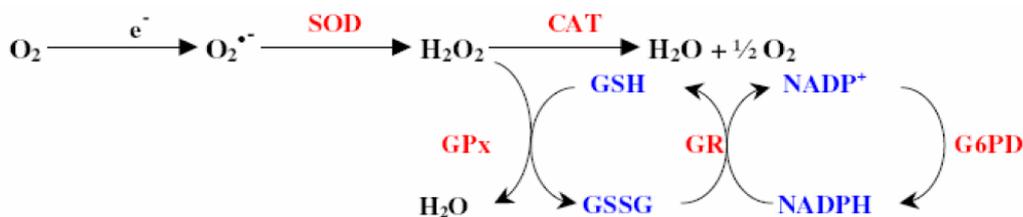
Le système enzymatique comporte la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du O₂^{•-} et du H₂O₂, conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.*, 2002).

La catalase présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

Les glutathions peroxydases et réductases : Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004).

Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant : (Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004).



Le système non enzymatique renferme de nombreuses substances endogènes notamment le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) (Favier, 2003). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants,

comme les ions $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ou $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (**Martínez-Cayuela, 1995**).

Les ERO peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies (**Parke et Parke, 1995**).

Parmi ces pathologies, les maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, les cancers, les maladies respiratoires, les diabètes, les maladies digestives et les affections cutanées constituent de plus en plus un problème mondial de santé publique. Ces pathologies chroniques peuvent s'accompagner de processus inflammatoire qui est souvent un des signes d'alerte vers les complications.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire.

Ce mécanisme est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers. Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases (ou NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (**Sahnoun, 1998**).

L'inflammation est un processus de défense de l'organisme dont le but est de neutraliser, de combattre ou d'éliminer l'agent pathogène (endogène ou exogène) et de préparer la réparation des tissus. Les signes de ce processus sont : chaleur, rougeur, douleur, gonflement (**Majno, 2004 ; Kumar et al., 2003**)

L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation (**Ruslan, 2008**).

Elle est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois elle peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalie de régulation du processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation (**Ruslan, 2008**).

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et représentent les agents exogènes. Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation :

- Infection : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons).
- Agents physiques : traumatisme, chaleur, froid, radiations.
- Agents chimiques : caustiques, toxines, venins.
- Corps étrangers : exogènes ou endogènes.

Il existe deux types d'inflammations : aigüe et chronique

L'inflammation aigüe est caractérisée par quatre phénomènes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (**Botting et Botting, 2000**). Elle dure de quelques jours à quelques semaines. L'inflammation aigüe peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus (**Figure 4**) (**Weill et al., 2003**).

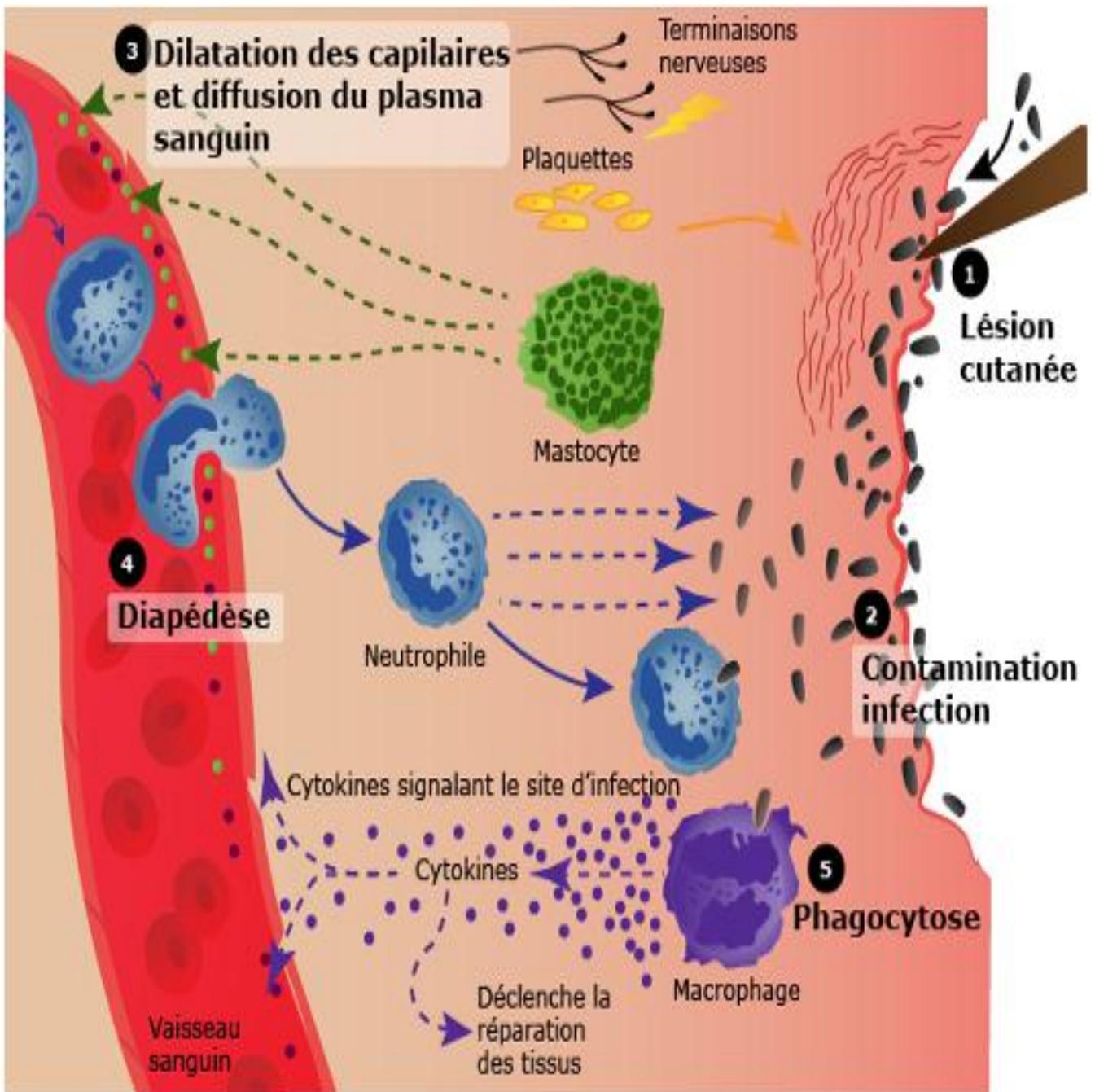


Figure 4. Les grandes étapes de la réaction inflammatoire aiguë (Patrice, 2014)

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé (**Rankin, 2004**). Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années. Elle peut même se prolonger tout au long de la vie de l'individu (**Fauve et Hevin, 1998**). À la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentatives de réparation sont également présents (**Weill et al., 2003**). Les cellules mononuclées et particulièrement les macrophages constituent l'essentiel de l'infiltrat cellulaire vers le site inflammatoire (**Fauve et Hevin, 1998 ; Weill et al., 2003**). La présence de lymphocytes dans l'infiltrat est habituelle. Tandis que la présence des polynucléaires éosinophiles est caractéristique des inflammations chroniques allergiques et parasitaires (**Dombrowicz et Capron, 2001**).

L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, des modifications de la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire.

La signalisation est réalisée grâce au chimiotactisme au niveau de la lésion entraînant le recrutement (diapedèse) de cellules particulières ayant pour rôle l'élimination des produits gênants. Ceux-ci sont principalement les polynucléaires neutrophiles et les monocytes, ces derniers mûriront en macrophages (**Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1996**).

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont formés à partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Leur maturation est régie par des cytokines ainsi que par le complément. L'organisme crée continuellement des neutrophiles, et accroît sa production en cas de besoin, pour en avoir toujours à disposition au vue de leur durée de vie courte (deux à trois jours). Les PNN agissent dans l'inflammation grâce à différents types de récepteurs de surfaces:

Ce sont des récepteurs pour les molécules d'adhésions des cellules endothéliales, et des récepteurs chimiotactiques. L'activation de ces récepteurs entraîne la migration des PNN vers le site lésé. Ils entraînent également la synthèse de molécules d'adhésions et de radicaux libres oxygénés. Le troisième type de récepteur est les récepteurs pour les opsonines : ou les récepteurs Fc et les récepteurs du complément activé (**Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1996**).

Suite à son activation, le PNN synthétise de nombreux composés qui seront stockés dans de nombreux lysosomes (granules primaires) et granules secondaires, granules qui donnent son aspect caractéristique à la cellule. Les granules primaires contiennent principalement des

hydrolases acides et lysozyme. Dans les secondaires du lysozyme et de la lactoferrine (protéines antibiotiques), d'autres composés y sont aussi présents : cathepsine G, myéloperoxydase, protéinase-3, chondroïtine-sulfate, héparine-sulfate, collagénase, phosphatase acide et alcaline, PAF (facteur activateur de plaquettes), eicosanoïdes (TXB₂, LTB₄, 5-HETE) et les radicaux libres oxygénés (**Eming et al., 2007**). Les monocytes sont des cellules mononuclées circulantes qui migrent vers le site inflammatoire et se différencient en macrophages. Ils ont pour rôle de phagocyter l'agent agresseur ou les fragments de tissus altérés (**Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1996**). Ils interviennent aussi dans l'amplification de la réaction inflammatoire en libérant des médiateurs stimulant d'autres cellules inflammatoires. Les monocytes interviennent également dans la phase de réparation tissulaire (**Eming et al., 2007**).

Les plaquettes sanguines sont indispensables à l'hémostase primaire. Elles contribuent au processus inflammatoire par la libération de nombreux médiateurs comme le fibrinogène, le plasminogène, des protéases plasmatiques ainsi que de la sérotonine (**Steinhubl, 2007**).

Les Polynucléaires basophiles sont les plus rares des polynucléaires (moins de 1 % des cellules inflammatoires). Elles présentent également un cytoplasme qui contient de très nombreuses granulations riches en médiateurs pro-inflammatoires. Les basophiles sont des cellules phagocytaires qui interviennent principalement dans les réactions allergiques (**Rankin, 2004**).

Les polynucléaires éosinophiles représentent de 1 à 6% des cellules inflammatoires. Elles possèdent aussi des propriétés phagocytaires (**Rankin, 2004**). Leur fonction principale est de s'attaquer aux parasites via le contenu de leurs granules. Elles interviennent aussi dans la modulation et la propagation de la réponse immunitaire adaptative en activant directement les lymphocytes T (**Hogan et al., 2008**).

Pour les médiateurs plasmatiques, les systèmes multi protéiques dont les composants sont produits à distance du foyer inflammatoire. Les différents composants de ces systèmes sont présents dans le sang circulant où ils demeurent à l'état de précurseurs inactifs, jusqu'à ce qu'ils soient mis en présence d'un activateur spécifique. Ces systèmes ont entre eux des relations fonctionnelles étroites (**Tableau 1**) (**Botting et Botting, 2000**).

Tableau 1. Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires. (Rankin, 2004; Male *et al.*, 2007).

Médiateurs	origine	actions
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotinine	Mastocytes et plaquettes	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur activateur des plaquettes (PAF)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales.	Assure la vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule la broncho constriction, l'agrégation des plaquettes et la libération des médiateurs qu'elles renferment, induit la production des EOR et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages
Kalicroïne	Présente dans le plasma	Transforme et active le système des Kinines
Plasmine	Présente dans le plasma	Clive le composant du complément C ₃ pour générer le C _{3a} et le C _{3b}
Leucotriènes : <ul style="list-style-type: none"> • LTC₄, LTD₄, LTE₄ • LTB₄ 	Essentiellement par les leucocytes Essentiellement par les leucocytes	Augmentent la perméabilité des micro- vaisseaux. Augmente la perméabilité vasculaire et le flux sanguin local, induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR et attire et active les cellules inflammatoires.
Prostaglandine E2	Essentiellement par les leucocytes	Provoque la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.
Bradykinine	Présente dans le plasma sous forme de kininogènes	Accroît la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et

		stimule la contraction des muscles lisses
Facteur de Hagman (XII)	Présent dans le plasma et est active par l'adhésion des plaquettes	Implique dans la cascade de coagulation
Thrombine	Présente dans le plasma	Catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine et induit la libération de la sérotonine des plaquettes.
Fibrine	Présente dans le plasma, formé à partir du fibrinogène	Intervient dans la formation du caillot sanguin
IL-8	Monocytes, macrophages, plaquettes et lymphocytes	Active le chimiotactisme des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR. Intervient dans la réparation tissulaire
C3a	Fraction C3 du complément inactif	Provoque la dégranulation des mastocytes
C5a	Fraction C5 du complément inactif	Provoque la dégranulation des mastocytes et des neutrophile, exerce un effet chimiotactique en vers les phagocytes et stimule la contraction du muscle lisse.

Les traitements utilisés dans le cadre de l'inflammation chronique sont variés et dépendent de la maladie. Ces traitements agissent sur les effets initiateurs ou amplificateurs de l'inflammation (migration des cellules inflammatoires, bronchoconstriction, espèces réactives oxygénées). En plus des traitements spécifiques utilisés dans chaque maladie chronique (asthme, athérosclérose, cancer), des anti-inflammatoires seront utilisés pour soulager la douleur et diminuer l'inflammation. Pour limiter l'inflammation, la thérapie employée en médecine moderne consiste en l'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes.

Les AINS sont nombreux et leur classification dépend de leur structure chimique. Ils sont classés en dérivés acides carboxyliques (acide salicylique, Aspirine® ou acide acétylsalicylique, ibuprofène et acide flufénamique) et en dérivés énoliques (phénylbutazone, ténoxiam) (**Russo-Marie et coll., 1998**).

Les AINS exercent leurs effets sur la cyclooxygénase (COX), contribuant ainsi à inhiber la production des prostaglandines (**Vane et Botting, 1987 ; Russo-Marie et coll., 1998**).

Les AIS ou glucocorticoïdes (Prednisolone, dexaméthazone) exercent leurs effets sur la phospholipase A₂, inhibant ainsi la libération de l'acide arachidonique et par conséquent la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes (**Vane et Botting, 1987 ; Russo Marie et coll., 1998**). Les glucocorticoïdes agissent sur l'oedème, la vasodilatation, la migration des leucocytes, la synthèse des médiateurs inflammatoires (cytokines) et diminuent la production des espèces réactives oxygénées par les cellules inflammatoires (**Russo-Marie et coll., 1998**).

L'utilisation des anti-inflammatoires (AINS et AIS) n'est pas sans inconvénients pour l'organisme (**Ng, 1992 ; Miner et coll., 2007**). Ainsi, l'usage prolongé des AINS peut entraîner des troubles au niveau du tractus gastro-intestinal, des toxicités au niveau du rein et de la peau (**Ng, 1992**). Pour limiter ou éviter les effets nocifs de ces molécules, les populations des pays riches et pauvres utilisent respectivement la médecine complémentaire, alternative et non conventionnelle et la médecine traditionnelle pour leurs besoins en santé (**OMS, 2002**). La médecine traditionnelle représente une composante de système de santé pour les populations indigentes. Du reste, selon l'OMS, 80% des populations en Afrique ont recours à la médecine traditionnelle pour assurer l'essentiel de leurs besoins en santé (**OMS, 2002**). Les plantes médicinales constituent une importante composante de la médecine traditionnelle largement utilisées depuis des milliers d'années à travers le monde ; plusieurs plantes sont utilisées seules ou en association avec d'autres plantes pour le traitement de maladies inflammatoires.

Les molécules dotées d'un effet anti-inflammatoire dans les plantes sont principalement les polyphénols, les stérols et les terpènes (**Adedapo et coll., 2008**).

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal rencontrées dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (**Fleuriet, 1982 ; Yusuf, 2006**).

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (**Figure 5**) (**Bloor, 2001**). Un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzéniques A et B reliés par un hétérocycle de type pyrane. Ces composés différents les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature de la liaison hétérosidique (**Bloor, 2001 ; Dacosta, 2003**).

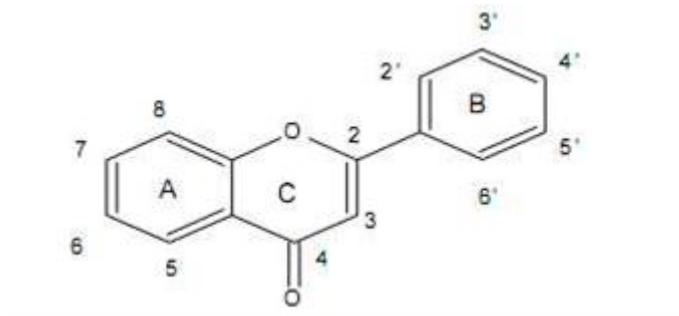


Figure 5. Squelette de base des composés phénoliques (Girotti-Chanu, 2006).

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétyl- coenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a permis la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe, d'un tissu particulière.

Selon Harborne (1998) on peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base (Figure 6).

Quatre principales classes sont largement répandues

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques).
- Les flavonoïdes.
- Les tanins et lignines.
- Plus rares, les coumarines, les stilbènes.

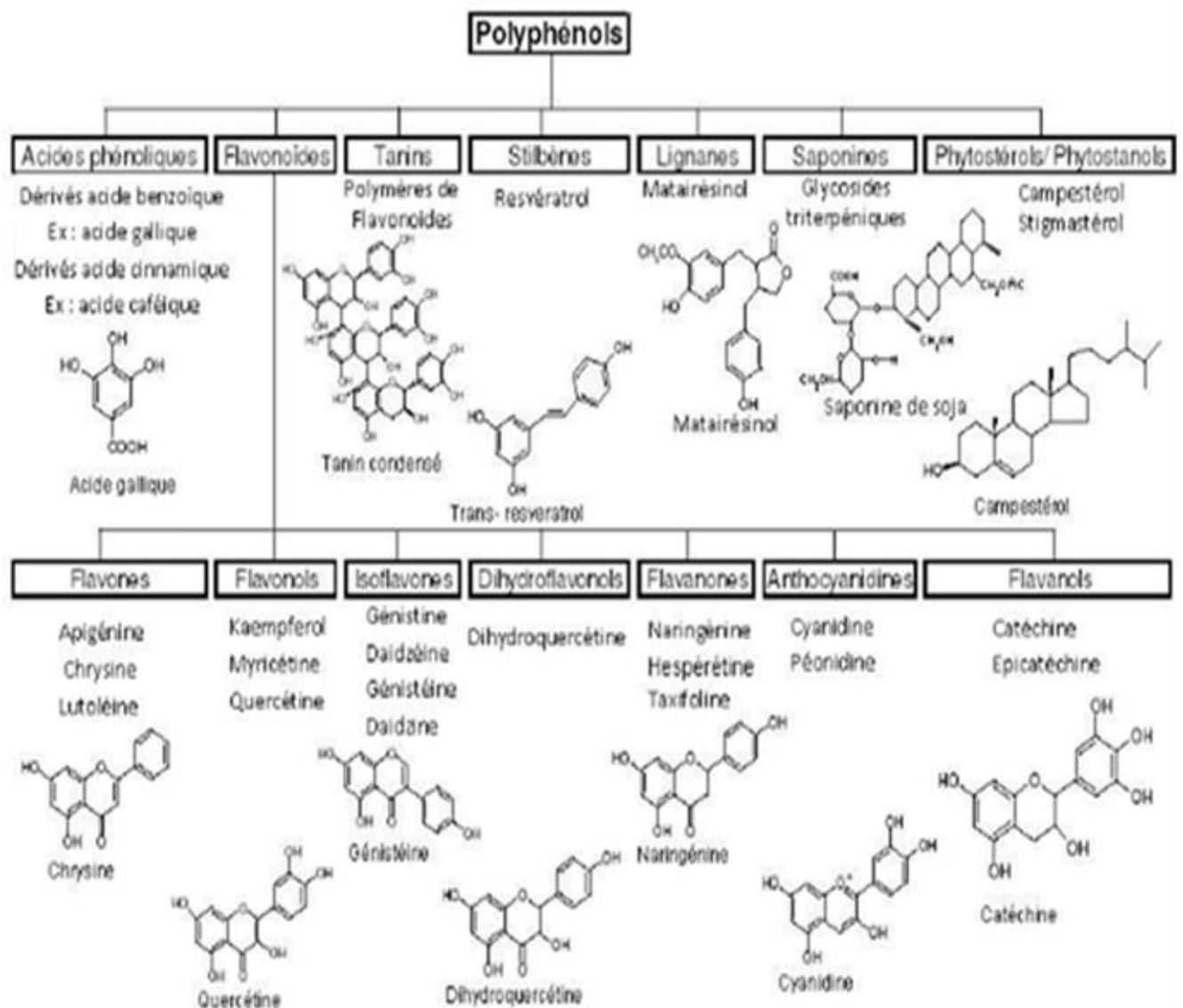


Figure 6. Les différentes classes des polyphénols

L'intérêt thérapeutique potentiel des polyphénols date de la découverte de la vitamine C par **Szent Gyorgyi (Prix Nobel 1937)**. Au cours des années quatre-vingts, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt pour les polyphénols dont les propriétés antioxydantes sont remarquables.

Ils jouent ainsi un rôle important dans la qualité organoleptique des fruits et légumes, utilisés frais ou après transformation industrielle.

Les composés phénoliques possèdent souvent une activité antimicrobienne (**Maillard, 1996**). Ainsi, il a été montré que les catéchines des feuilles du thé inhibent la croissance de micro-organismes en altérant des fonctions membranaires des pathogènes, les détruisant à plus ou moins long terme (**Fukai et coll., 1991**).

Les propriétés biologiques des polyphénols sont essentiellement établies *in vitro* et découlent de leur activité réductrice et de leur affinité pour une grande variété de protéines (enzymes, récepteurs, facteurs de transcription).

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-cancers (**Tableau 2**). Ils ont également des actions positives sur l'obésité, le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

Les activités biologiques des polyphénols ont souvent été évaluées *in vitro*, avec des protéines purifiées, des extraits cellulaires et des cellules entières en culture.

La signification de ces effets biologiques dans le domaine de la nutrition humaine est encore loin d'être établie d'autant qu'ils mettent presque toujours en jeu les formes natives ou aglycones de polyphénols et non pas les formes conjuguées circulantes. Pour progresser dans la démonstration *in vivo* des effets sur la santé des polyphénols, une meilleure connaissance de la biodisponibilité des polyphénols et une combinaison d'études cliniques pertinentes est indispensable. Le développement récent de nouveaux outils et méthodes pourrait permettre des avancées importantes dans les années à venir, le cas de la nutriginomique qui vise à mettre en évidence les gènes dont l'expression est régulée (à la hausse ou à la baisse) par les composants de l'alimentation. La difficulté réside ensuite dans l'analyse et l'interprétation de ces données biologiques complexes.

Plusieurs effets sont attribués à l'influence des acides phénoliques comme l'effet antiallergique ; sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{2+} -dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca^{2+} -dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de

faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme. **(Di Carlo et coll., 1999)**

L'étude de **Landolfi et coll. (1984)** a montré que certains polyphénols comme substance anti-inflammatoire, sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes. Les effets de la quercétine et de la myricétine sont dose-dépendants : à de fortes concentrations, ils inhibent la cycloxygénase et la lipoxygénase. Cependant, à de faibles concentrations, seule la lipoxygénase est affectée. En revanche, d'autres flavonoïdes tels que l'apigénine et la chrysin agissent principalement sur l'activité de la cycloxygénase.

Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contrer cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles **(Limasset et coll., 1993)**.

Dans des expériences réalisées sur des rats, il a été démontré que la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres et également l'inhibition de la production leucotriènes **(Di Carlo et al., 1999)**.

D'autres études ont permis d'établir une relation étroite entre les propriétés anti-ulcère de la quercétine, la naringénine, la rutine et le kaempférol, et la production de PAF (*Platelet Activating Factor*) qui est un agent ulcérogène potentiel **(Izzo, 1996)**. En effet, il s'est avéré que la réduction des dommages gastro-intestinaux est due probablement à l'inhibition du PAF par ces flavonoïdes **(Tableau 2)**.

Tableau 2. Les principales activités biologiques des composés polyphénoliques

POLYPHENOLS	ACTIVITES	AUTEURS
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydantes	Didry <i>et al.</i>, 1982 Ravn <i>et al.</i>, 1984 Hayase et Kato., 1984
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses	Mabry et Ulubelen., 1980
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes	Stavric et Matula, 1992 ; Das <i>et al.</i>, 1994 Bidet <i>et al.</i>, 1987 Bruneton, 1993 Aruoma <i>et al.</i>, 1995
Anthocyanes	Protectrices capillaro- Veineux	Bruneton ,1993
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Antitumorales Antifongiques Anti-inflammatoires	Masquelier <i>et al.</i>, 1979 Bahorun <i>et al.</i> ,1997 De Oliveira <i>et al.</i>, 1972 Brownlee <i>et al.</i>, 1992 Kreofsky <i>et al.</i>, 1992
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes	Okuda <i>et al.</i>, 1983 Okamura <i>et al.</i>, 1993

Partie expérimentale

**Partie in vitro : Étude
phytochimique de *Zizyphus
lotus*, *Anthyllis vulneraria* et
évaluation des activités
antioxydantes et anti-
inflammatoires de leurs
extraits phénoliques**

Matériels & Méthodes

I. Présentation des plantes étudiées

Les plantes médicinales ont fait l'objet de beaucoup d'études grâce aux principes actifs qui diffèrent d'une plante à une autre créant ainsi une biodiversité remarquable. Plus de cinq mille substances naturelles différentes ont été identifiées (**Farombi, 2003**).

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des produits bioactives. Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent des protéines, des lipides et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et à la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux qui s'en nourrissent.

De plus, les plantes synthétisent une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires dont la fonction est loin de faire l'unanimité. De nombreux métabolites secondaires sont des « antibiotiques » au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même les autres plantes.

Toutes les espèces de plantes contiennent des produits chimiques qui peuvent être néfastes pour certains animaux ou micro-organismes, ce qui vient étayer la croyance selon laquelle les métabolites secondaires jouent un rôle primordial dans la lutte contre les maladies et les herbivores. Les plantes ont été une riche source de médicaments parce qu'elles produisent une foule de molécules bioactives, dont la plupart jouent probablement le rôle de défense chimique contre des prédateurs ou des agents infectieux (**Cox et Balick, 1994**).

Pour cela, notre choix s'est porté sur deux plantes utilisées largement en médecine traditionnelle : *Anthyllis vulneraria* et *Zizyphus lotus*.

I.1. *Anthyllis vulneraria* : la vulnéraire, trèfle des sables

Anthyllis vulneraria est le nom scientifique de vulnéraire, elle fait partie de la famille des fabacées. Le nom Anthyllis vient des mots grecs anthos et ioulos qui signifient fleur et duvet. Cette espèce méditerranéenne est très commune dans le Tell algérien et rare ailleurs. On la retrouve également en Amérique du Sud et en Asie du



Sud-Est. Elle est présente dans les pâturages des régions montagneuses (**Halabalaki et al., 2011**). C'est une plante vivace à tige entièrement herbacée et poilue pouvant atteindre jusqu'à 50 cm de haut. Les feuilles sont poilues et soyeuses. Les fleurs sont jaunes, rougeâtres ou blanches, en têtes denses (**Quezel et Santa, 1963**).

La vulnéraire est très prisée pour ses caractéristiques dépuratives, astringentes, diurétiques, cicatrisantes et anti-inflammatoires. Elle est également efficace pour soigner les plaies, la constipation et la digestion (**Menkovic et al., 2011**).

I.2. *Zizyphus lotus* : jujubier sauvage

Le *Zizyphus lotus* (**jujubier**) est un arbuste fruitier, épineux appartenant à la famille des Rhamnacées (**Rsaissi et Bouchache., 2002**). Communément appelé en Afrique du Nord "Sedra" (**Borgi et al., 2007**). Il forme des touffes de quelques mètres de diamètres pouvant atteindre 2m de haut.



Ses feuilles sont courtement pétiolées, glabres, caduques alternées et ovales à marges entières. Les fleurs sont jaunes, pentamères et groupées en inflorescence cymeuses. Les fruits sont des drupes à noyaux soudés, l'endocarpe mucilagineux appelé "Nbeg" (**Rsaissi et Bouchache., 2002**).

Les différentes espèces du *Zizyphus* sont largement utilisées dans le traitement de certaines maladies comme : les maladies inflammatoires, les troubles digestives, la faiblesse, les affections du foie, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections cutanées, la fièvre, la diarrhée et l'insomnie (**Abu-Zarga et al., 1995, Abdel-Zaher et al., 2005; Suksamrarn et al., 2005**).

I.3. Origine géographique et période de récolte des plantes

Zizyphus lotus, *Anthyllis vulneraria* provient de la wilaya de Tlemcen (Zarifète) située à l'ouest Algérien entre 35°05' et 35°25' de latitude nord et entre 0°15' et 2°15' de longitude ouest.

Les périodes de la récolte des deux plantes sont données dans le tableau 3

Tableau 3. Période de la récolte des plantes étudiées

plante	Période de la récolte
<i>Anthyllis vulneraria</i>	Mai – Juin 2012
<i>Zizyphus lotus</i>	Acheté chez herboriste

I.4. Identification botanique

Les deux plantes ont été identifiées par le professeur **BENABADJI N.** du laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels ; Université de Tlemcen (Algérie).

I.5. Préparation des échantillons

Le séchage du matériel végétal a été réalisé dans un espace couvert (à l'abri du soleil) ; les échantillons broyés ont été mis dans des bocaux, en verre hermétiquement fermés pour des analyses ultérieures.

Les différents organes des deux plantes sont donnés dans le tableau 4.

Tableau 4. Les parties utilisées de plantes

plante	Partie utilisée
<i>Anthyllis vulneraria</i>	Fleur, feuille
<i>Zizyphus lotus</i>	Racine, pulpe

II. Méthodes d'analyses utilisées

II.1. Détermination de la teneur en eau

***Principe:**

On procède à une dessiccation de l'échantillon à analyser dans une étuve à la température de 100°C à 105°C et sous la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'une masse pratiquement constante. Pour éviter toute reprise d'humidité, il convient d'opérer dans des vases de tare, placées dans un dessiccateur (**Audigie et al, 1980**).

II.2. Tests phytochimiques

L'un des buts essentiels d'une étude phytochimique est la détection des classes des composés existant dans les différents organes de la plante.

Trois solvants de polarités différentes (eau, éther d'éthylque, éthanol) ont été utilisés au cours de ces tests qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation.

II.2.1 Différentes familles recherchées

II.2.1.1 Les alcaloïdes

Formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent un atome d'azote qui les rend pharmaceutiquement très actif. Il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels (**Iserin, 2001**).

Ils existent à l'état de sel et constituent avec les hétérosides, la majorité des principes actifs des plantes médicinales (**Brunton, 1999**).

Leur caractérisation est faite en présence d'acide chlorhydrique, en additionnant quelques gouttes de réactif de Wagner, afin d'obtenir un précipité brun indiquant leur présence (**Memelink et al., 2001**).

II.2.1.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une classe de métabolites secondaires des plantes, présents sous forme de pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les feuilles et les fruits (**Brunton, 1999**).

Ils donnent généralement avec le magnésium, en présence d'acide chlorhydrique, une coloration rose ou rouge (**Cavé, 1993**).

II.2.1.3 Les tanins

Les tanins sont définis comme des composants polyphénoliques dont le poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Dalton (**Selvakumar et al, 2007**).

Ils peuvent être divisés selon **Scalbert, 1991** en deux groupes :

Les tanins hydrolysables : appelés tanins pyrogalliques, ce sont des polyesters de glucides et d'acides-phénol. On distingue les tanins galliques et les tanins ellagiques.

Ils sont caractérisés par les sels ferriques, le précipité obtenu est bleu noir (**Trease et Evans, 1987**). Les tanins galliques donnent une coloration rose avec l'iodate de potassium (l'acide gallique libre est coloré en orange par ce réactif).

Les tanins condensés : leur structure est voisine de celle des flavonoïdes, ils ne possèdent pas de sucre dans la molécule. Ils sont formés de deux ou plusieurs molécules de flavan-3-ols, dont l'union se fait par des liaisons carbone – carbone.

Caractérisés par les sels ferriques, le précipité coloré obtenu est brun – verdâtre (**Trease et Evans, 1987**).

En présence de la vanilline chlorhydrique, les tanins condensés sont colorés en rouge (**Paris et Hurabielle, 1981**).

II.2.1.4 Les saponosides

Les saponosides existent sous deux formes, les stéroïdes et triterpénoïdes. La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (œstrogène, cortisone). De nombreuses plantes contiennent les saponosides. Elles ont un effet sur l'activité hormonale (**Iserin, 2001**).

En pratique, les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse, déterminé sur un décoté obtenu par ébullition prolongée. Après agitation, la hauteur de mousse est mesurée (**Bruneton, 1999**).

II.2.1.5 Les stérols et stéroïdes

Ce sont des composés terpéniques se présentant sous forme d'alcool libre (sitostérol), ou sous forme d'ester associés par le glucose (glucoside stérol) (**Linden et Lovient, 1994 ; Kamm et Dionisi, 2001**). Leur caractérisation est basée sur la réaction de Liebermann – Burchardt.

II.2.1.6 L'amidon

Principale forme de réserve glucidique des végétaux, il existe sous forme d'une structure correspondante à un homopolymère de D- glucose. Il est caractérisé au moyen du réactif à l'eau iodée par apparition d'une couleur bleu (**Guignard, 1979**).

II.2.1.7 Les composés réducteurs

Les glucides, appelés hydrates de carbone ou saccharides, sont des composés organiques carbonylés (aldéhydrique ou cétoniques). Le caractère réducteur des aldoses ou des cétooses vis-à-vis de la liqueur de Fehling donne un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

III. Détermination quantitative des métabolites primaires

III.1. Dosage de l'azote total et les protéines brutes

Il a été réalisé par la méthode de **Kjeldahl (1883)**, elle comprend trois étapes: la minéralisation, la distillation et la titration.

•Principe

La méthode consiste à détruire la matière organique par l'acide sulfurique concentré et chaud, qui fait passer quantitativement l'azote à l'état de sulfate d'ammonium.

L'ammoniac est ensuite déplacé par de la soude et recueilli dans un excès d'acide sulfurique de concentration connue. Un titrage en retour par de la soude de concentration connue permet de déduire la quantité d'ammoniac formée, donc la teneur en azote de l'échantillon

III.2. Dosage des fibres alimentaires

Il a été réalisé par la méthode de **Henneberg et Stohmann, 1860** appelée aussi la méthode **Weende** en utilisant un extracteur des fibres brutes **FIWE-VELP SCIENTIFICA**.

•Principe

Elle consiste à traiter l'échantillon à analyser successivement avec de l'acide sulfurique et de la potasse. L'hydrolyse acide/ basique (à chaud) permet de solubiliser la quasi-totalité du contenu cellulaire à l'exception des fibres alimentaires et des sels minéraux. Le résidu obtenu est séché, incinéré puis pesé.

III.3. Dosage des sucres totaux

L'appréciation de la quantité en oses présents dans les polysaccharides repose sur le dosage des sucres totaux par la méthode de **Dubois et al., (1956)** appelée aussi méthode **phénol/acide sulfurique**.

•Principe

Le dosage des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessite la rupture de toutes les liaisons glycosidiques par hydrolyse acide (l'acide sulfurique).

L'analyse repose sur des techniques colorimétriques. Le principe des dosages colorimétriques se base sur la condensation par estérification d'un chromogène (Phénol, Orcinol, Anthrone) avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques. En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en des dérivés du furfural, 5- hydroxy-méthyl-furfural et de l'acide 5-formylfuroïque.

Les chromophores ainsi formés de couleurs jaunes- orange absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité des sucres présents (**Ruiz, 2005**).

La teneur des sucres est exprimée en µg/ ml (converti en gramme / litre) de α D⁺ Glucose à partir d'une courbe d'étalonnage

$$y = 10,456x - 0,0102 \quad R^2 = 0,997$$

III.4. Dosage des cendres

•Principe

Il consiste en une calcination au bec Benzène de l'échantillon jusqu'à apparition d'une fumée noire, puis en son incinération dans un four à moufle, dans des creusets en porcelaine, à une température de 750°C jusqu'à ce que les résidus deviennent blancs après refroidissement. (**Audigie et al., 1980**).

III.5. Dosage des lipides totaux

Afin d'éliminer le reste d'humidité, l'échantillon à analyser a subi un séchage à l'étuve à 40 °C/ 14 heures.

•Principe

L'extraction de l'huile de *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria* est réalisée dans un extracteur de type soxhlet à l'aide d'un solvant organique (le n- hexane) (**Lecoq, 1965**).

Après évaporation du solvant, le taux de matière grasse brute est déterminé gravimétriquement selon la méthode indirecte.

IV. Dosage des acides gras par Chromatographie en phase gazeuse (CPG): (Bligh et Dyer, 1995)

L'analyse s'effectue sur un aliquote de 100 mg de la poudre de chaque partie de deux plantes en deux étapes comme suit :

- **Saponification-Méthylation des acides gras**

Après avoir ajouté 200 μ L de méthanol, la saponification est réalisée avec 1 mL de NaOH méthanolique (50 mM), suivie d'une incubation à 80°C pendant 15 minutes. La saponification par NaOH méthanolique va apporter les hydrogènes nécessaires à la libération des acides gras du glycérol. Un choc thermique est réalisé en plongeant les tubes dans un bac à glace, la méthylation est alors faite par ajout de 2mL de BF₃ méthanolique (BF₃ jouant le rôle de catalyseur) puis incubation à 80°C durant 15 minutes. Après un deuxième choc thermique, nous ajoutons 2 mL de NaCl saturé à 35% et 1 mL d'Hexane pour extraire les acides gras en prélevant la phase supérieure de la réaction. Les tubes sont ensuite bouchés sous azote avant leur injection en CPG.

- **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

- **Principe**

Comme la Chromatographie Liquide Haute Pression et la Chromatographie sur Couche Mince, la CPG repose sur la rétention différentielle de molécules contenues dans une phase mobile par une phase stationnaire. Ici contrairement à la CCM ou l'HPLC, la phase mobile est l'hélium qui est un vecteur qui « propulse » les molécules dans une colonne de 30 m de long et de 0,32 mm de diamètre dans laquelle est greffé 0,25 μ m de phase stationnaire.

Les échantillons traversent la colonne sous forme gazeuse, ils doivent être vaporisés :

On injecte le contenu de la seringue (8 μ l) puis on augmente rapidement la température du four.

De ce fait, le solvant se vaporise très vite et « part » rapidement sans entraîner l'échantillon.

* Intérêt du standard interne :

Ce standard, contient un Acide gras absent de l'échantillon (un Acide gras impaire du monde animal), ici le standard est le C19 :0, cet acide gras va se comporter de la même façon que les acides gras présents, donc en comparant les aires de pics du chromatogramme et connaissant la masse de standard injectée, les quantités d'acides gras présents peuvent être calculées.

V. Dosages des métabolites secondaires

L'extraction de polyphénols consiste à macérer à froid l'échantillon (la poudre dégraissée) à analyser dans une solution d'acétone aqueuse pendant 24 heures.

L'acétone aqueuse, et le méthanol aqueux, avec des proportions entre 50% et 70% (v/v), sont les solvants les plus utilisés pour l'extraction des polyphénols (Yu et Dahlgren, 2005).

V.1. Dosage des polyphénols totaux

La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique du réactif Folin-ciocalteu (un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles acides contenant du molybdène et tungstène) par les polyphénols en milieu alcalin (Catalano, 1999).

Elle se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée due à la formation d'un complexe molybdène tungstène mesuré au spectrophotomètre.

Le dosage des polyphénols est effectué par la méthode de Singleton et Rosi (1965) reportée par Dogyan *et al.*, (2005).

La teneur en polyphénols totaux est déterminée à partir d'une équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage et exprimée en mg équivalent de pyrocatechol par de matière sèche.

$$\text{Absorbance} = 0.0828 \times C, R^2 = 0.9993$$

Où C est la concentration en mg/L

V.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Zhishen *et al.*, (1999) avec le trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose absorbe dans le visible à 510 nm. Le flavonoïde standard utilisé est la catéchine.

$$\text{Absorbance} = 1.340 \times C + 0.117, R^2 = 0.9950$$

Où C désigne la concentration en mg/L

V.3. Dosage des tanins condensés (test de la vanilline avec H₂SO₄)

Ce test est basé sur la condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide (Swain et Hillis, 1959 ; Oueslati *et al.*, 2012)

$$\text{Proanthocyanidines (\%)} = (5.2 \times 10^{-2} \times A_{500} \times V \times DF) / P$$

A₅₀₀: absorbance mesurée à 500nm.

V : volume d'extrait en ml.

DF : facteur de dilution.

P : la masse de la matière végétale (g).

V.4. Dosage des tanins hydrolysables (au chlorure ferrique)

La méthode de **Mole et Waterman (1987)** est basée sur une réaction avec le chlorure ferrique. Le mélange de l'extrait tannique avec le réactif chlorure ferrique provoque la coloration rouge violette du complexe, d'où la formation des ions (Fe^{3+}) (**Bate-Smith, 1973**).

$$\text{T}\% = (300 \times A_{660} \times V) / (2169 \times P)$$

A₆₆₀: absorbance mesurée à 660nm.

V : volume d'extrait en ml.

DF : facteur de dilution.

P : la masse de la matière végétale (g).

VI. Extraction de quelques métabolites secondaires

VI.1. Extraction des polyphénols totaux

L'extraction de polyphénols consiste à macérer à froid l'échantillon (la poudre dégraissée) à analyser dans une solution d'acétone aqueuse pendant 24 heures. Après filtration, la solution est évaporée à sec par un évaporateur rotatif sous pression réduite 60°C.

Remarque : pour la pulpe de *Zizyphus lotus* nous avons d'abord éliminé les sucres (macération dans l'eau distillée pendant 24 h) (**Yu et Dahlgren, 2005**).

VI.2. Extraction des flavonoïdes

10g de poudre végétale est mise à macérer dans un mélange hydro-alcoolique (méthanol/eau ; 70/30, v/v), pendant 24 heures. Après filtration, extrait aqueux obtenu après évaporation du méthanol a subi des extractions liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée (l'opération est répétée deux fois). Après élimination de l'acétate d'éthyle, on obtient la fraction d'acétate d'éthyle.

La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est reprise du n- butanol. (L'opération est répétée deux fois). La phase n-butanol est séchée au rotavapor (**Fathiazad et al., 2011**).

VI.3 Extraction des tanins

10g de poudre végétale sont ajoutés à 200ml du mélange acétone – eau (35/15, v/v). Laisser macérer pendant 3 jours à la température ambiante. Après filtration et élimination de l'acétone, la phase aqueuse est reprise dans du dichlorométhane (2 x 50 ml). Après la phase aqueuse est extraite par l'acétate d'éthyle (4 x 50 ml). Cette dernière qui contient les tanins est concentrée à sec en utilisant un évaporateur sous vide (**Zhang et al., 2008**).

VII. Tests d'activité antioxydante

VII.1 Effet scavenger du radical DPPH

Afin d'étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons utilisé la méthode du DPPH (diphényl picryl hydrazyl) qui est radical relativement stable. Selon le protocole décrit par **Mighri *et al.* (2010) and Braca *et al.* (2002)**. Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl picryl hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**). Le DPPH absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 nm à 520 nm.

$$\% \text{ DPPH} = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$$

A_0 : absorbance du contrôle.

A_t : absorbance du test effectué.

IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50%), aussi appelée EC₅₀ (Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement en représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations des extraits testées.

L'acide ascorbique, l'acide gallique, l'acide tannique et le BHA sont utilisés comme contrôles positifs.

VII.2. Test du blanchissement du β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique

L'activité antioxydante des extraits est mesurée selon la méthode de **Khartal *et al.* (2007)**. Dans ce test du blanchissement du β -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueux en résultant le blanchissement du β -carotène (**Unten *et al.*, 1997**).

La présence des antioxydants comme les polyphénols réduit l'ampleur de la destruction du β -carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système. L'absorbance est mesurée à 470 nm.

L'acide gallique, le BHA sont utilisés comme contrôles positifs

L'activité antioxydante (%) des extraits est évaluée en termes de blanchissement du β -carotène en employant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(A_{(120)} - C_{(120)}) / (C_{(0)} - C_{(120)})] \times 100$$

$A_{(120)}$: représente l'absorbance en présence de l'extrait à 120 min.

$C_{(120)}$: représente l'absorbance du contrôle à 120min.

$C_{(0)}$: représente l'absorbance du contrôle à 0 min.

La valeur EC_{50} est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50% d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

VII.3. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Pan *et al.*, 2008**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{+3} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{+2} . Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle d'un composé. L'absorbance du milieu est déterminée à 700 nm.

L'acide ascorbique et BHA sont utilisés comme contrôles positifs.

VII.4. Activité antioxydante totale (CAT)

La capacité antioxydante totale (CAT) des extraits est évaluée par la méthode de phosphomolybdène de **Prieto *et al.* (1999)**. Cette technique est basée sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} au molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait pour former un complexe vert de phosphate/Mo (V) à pH acide. L'absorbance du milieu est déterminée à 695 nm.

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche (mg EAA/g MS).

VIII. Tests de toxicité, viabilité et prolifération cellulaire

Les tests de toxicité et de prolifération cellulaire sont évalués sur des splénocytes de rat avec un comptage directe et le cyquant cell proliferation assay kit.

VIII.1. Isolement des splénocytes (Triboulot *et al.*, 2001)

Des rats adultes âgés de 10 à 12 semaines, pesant 250 à 350 g sont utilisés pour le prélèvement des rates. L'isolement des splénocytes se fait par écrasement de la rate au-dessus d'une grille stérile dans 4 ml de RPMI 1640. Après Centrifugation, le culot est

solubilisé dans 15 ml d'eau physiologique. Le mélange est incubé dans une boîte pétrie pendant 1h à 37°.

Cette étape permet aux macrophages d'adhérer à la surface de la boîte pétrie. Le surnageant est par la suite récupéré et centrifugé à 4000 tr/min pendant 5min. Les splénocytes isolés sont prêts à l'emploi (**Figure 7**). Les splénocytes lavés sont par la suite remis en suspension dans 400µl de milieu de culture RPMI 1640.

Afin de tester la viabilité des cellules isolées, 50 µl de cette suspension cellulaire sont prélevés dans un tube sec et sont mélangés à 50 µl d'une solution de bleu de trypan 0,4 % (colorant permettant de distinguer les cellules vivantes) et 50 µl de milieu RPMI 1640. La numération cellulaire est effectuée sur une chambre quadrillée « Cellule de Malassez ».

VIII.2. Comptage des splénocytes

Le comptage des splénocytes se fait à l'aide de la cellule de Malassez. Le principe est basé sur le décompte au microscope optique des cellules après coloration au bleu de Trypan, contenues dans un volume de suspension cellulaire déterminé et à dilution connue.

VIII.3. Cyquant cell proliferation assay kit

Nous décrivons ici le développement et la caractérisation de l'essai de prolifération cellulaire Cyquant, un essai très sensible, à base de fluorescence pour déterminer les nombres de cellules cultivées. Cet essai qui produit une grande amélioration de fluorescence en attache aux acides nucléiques cellulaires qui peuvent être mesurés utilisant le standard (fluorescent) des longueurs d'ondes d'émission et d'excitation.

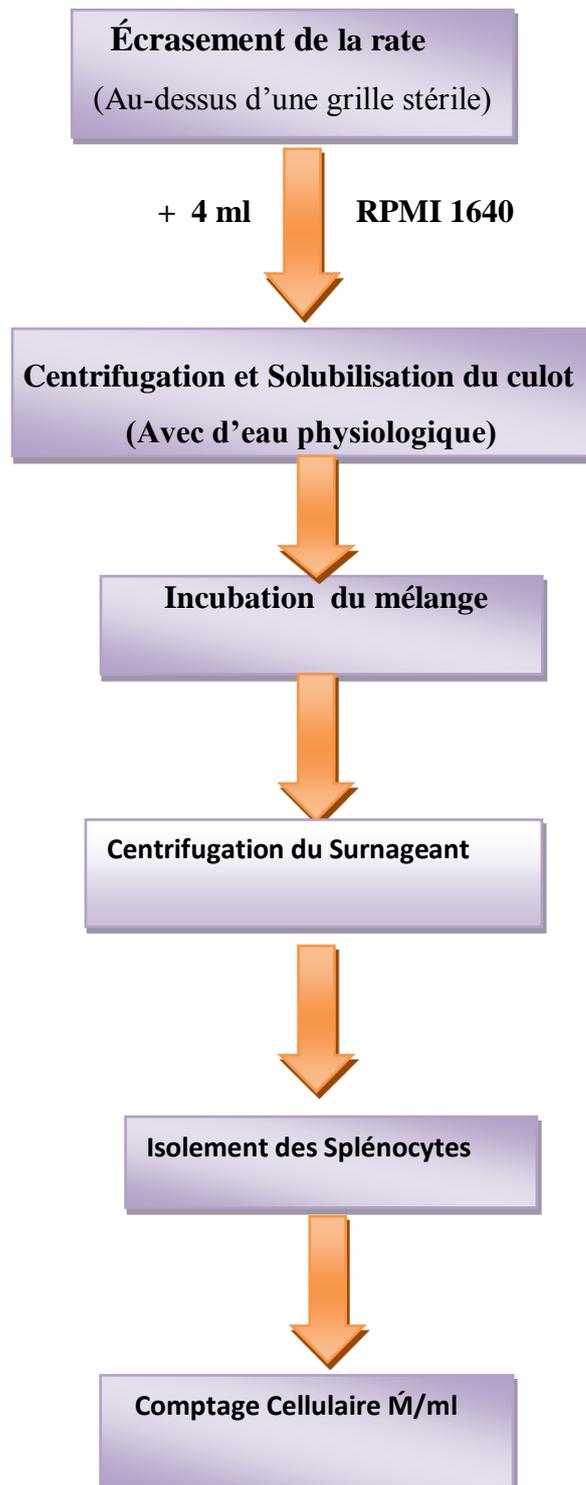


Figure 7. Méthode d'isolement et purification des splénocytes

IX. Effet anti-inflammatoire des extraits phénoliques de *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria*

L'effet anti-inflammatoire est évalué sur des cellules RAW 2647, ce sont des monocytes de la souris. Les cellules RAW 2647 (0.075×10^6 des cellules/500 μ L) ont été suspendues dans RPMI et ensemencées dans des plaques 24 puits, puis incubées pendant 48h, avec des concentrations croissantes des extraits phénoliques de *Zizyphus lotus* et de *l'Anthyllis vulneraria* (0.25, 0.5 et 1mg/ml). Les cellules sont stimulées par LPS.

IX.1. Dosage de NO₂ (Green *et al.*, 1982)

Le monoxyde d'azote (NO) est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que vasodilatation, régulation de la tension artérielle, neurotransmission et réactions inflammatoires et immunitaires. Il joue également un rôle important au cours de processus pathologiques durant lesquels sa concentration augmente dans l'inflammation.

Il s'agit d'une réaction de diazotation en deux étapes : les nitrites forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec une amine (N-naphtyléthylène diamine) pour donner un colorant azoïque qui absorbe à 540 nm. L'échantillon déprotéinisé est incubé à 37 °C pendant 10 min avec l'acide sulfanilique (25 mM) dissous dans HCl (1,3 mM) et avec la N-naphtyléthylène diamine (1,8 mM).

Résultats & Interprétations

I. Taux de la matière sèche

Tableau 5. Taux de la matière sèche

	Humidité	Matière sèche
<i>Z. lotus</i> (Racine)	9.11%	90.89%
<i>Z. lotus</i> (Pulpe)	8.90%	91.1%
<i>A. vulneraria</i> (Fleur)	49.44%	50.56%
<i>A. vulneraria</i> (Feuille)	51.12%	48.88%

L'appréciation de la teneur en matière sèche repose sur la détermination du taux d'humidité contenue dans l'échantillon à analyser. L'analyse du taux d'humidité au niveau de la pulpe et de la racine de *zizyphus lotus* a montré une faible proportion estimée à 8.90% et 9.11% respectivement. À partir de cette valeur, nous avons pu déterminer le pourcentage en matière sèche (MS) qui s'est révélé important de 91.10 % et 90.89%.

L'analyse a été réalisée sur des échantillons achetés chez l'herboriste ce qui explique les faibles teneurs en humidité.

L'analyse du taux d'humidité au niveau de la fleur et feuille d'*Anthyllis vulneraria* a montré une proportion de 49.44% et 51.12% respectivement. Le pourcentage en matière sèche (MS) s'est révélé important estimé à 50.56 % et 48.88%.

II. Tests phytochimiques

Les méthodes de détection consistent en une précipitation ou une coloration par des réactifs spécifiques.

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés par des réactions de caractérisation :

+ : est enregistré si le réactif présente une légère opacité (présence en faible quantité).

++ : est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation (présence en quantité moyenne).

+++ : est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd (présence en forte quantité).

- : absence de turbidité et de floculation.

Tableau 6. Résultats des tests phytochimiques des plantes étudiées.

	Flavonoïdes	Tanins	Stérol et stéroïdes	Alcaloïdes	Saponosides	Amidon	Composés réducteurs
Z. lotus (Racine)	++	+++	++	+	+++	-	+++
Z. lotus (Pulpe)	+	++	+	+	+	-	+++
A. vulneraria (Fleur)	+++	++	-	+	+++	-	++
A vulneraria (Feuille)	++	++	+++	+	+++	-	+

L'analyse (**Tableau 6**) a révélé que les flavonoïdes, une classe de famille chimique fortement caractérisée dans les fleurs que dans les feuilles de l'*Anthyllis vulneraria* et dans la racine que dans la pulpe de *Zizyphus lotus*.

Les saponosides sont une classe de famille chimique fortement caractérisée dans les fleurs, les feuilles de l'*Anthyllis vulneraria* et dans la racine de *Zizyphus lotus* et en faible quantité dans la pulpe.

Les alcaloïdes sont présents en quantité moyenne dans toutes les parties étudiées.

L'amidon a été totalement absent dans les parties étudiées alors qu'est notée une forte présence des composés réducteurs dans la racine et la pulpe de *Zizyphus lotus*.

Les stérols et les stéroïdes sont des classes de familles chimiques présentes en quantité moyenne dans la racine *Zizyphus lotus* alors que les feuilles d'*Anthyllis vulneraria* sont riches.

La racine de *Zizyphus lotus* est riche en tanins que la pulpe, les fleurs et les feuilles de l'*Anthyllis vulneraria*

Vu la quantité importante des polyphénols notamment les flavonoïdes et les tanins, nous avons jugé judicieux de réaliser les extractions sélectives de ces différents composés.

III. Métabolites primaires

Tableau 7. Les teneurs en métabolites primaires exprimées en pourcentage de matière sèche

	Protéines	Sucres	Fibres	Cendres
<i>Z. lotus</i> (Racine)	3.18%	8.71%	47.90%	2.69%
<i>Z. lotus</i> (Pulpe)	2.10%	26,00%	28.00%	3.44%
<i>A. vulneraria</i> (Fleur)	10.34%	3.50%	24.45%	7.13%
<i>A. vulneraria</i> (Feuille)	7.17%	1.72%	2.88%	11.69%

L'évaluation des teneurs en métabolites primaires : protéines, sucres, fibres et les minéraux de la racine, la pulpe de *Zizyphus lotus*, les feuilles, les fleurs d'*Anthyllis vulneraria* a montré que la pulpe de *Zizyphus lotus* est la partie la plus riche en sucres (26.00%) suivie par la racine (8.71%). On remarque que la racine de *Zizyphus lotus* est riche en fibres (47.90%) suivie par la pulpe de *Zizyphus lotus* (28.00%), les fleurs d'*Anthyllis vulneraria* (24.45%) et les feuilles (2.88%) d'*Anthyllis vulneraria*. Concernant les minéraux, les feuilles (11.69%) et les fleurs (7.13%) d'*Anthyllis vulneraria* sont plus riches que la pulpe (3.44%) et la racine (2.69%) de *Zizyphus lotus* (**Tableau 7**).

IV. Teneur en matière grasse

Tableau 8. Teneur en lipides totaux

	Lipides totaux
<i>Z. lotus</i> (Racine)	1.6%
<i>Z. lotus</i> (Pulpe)	0.9%
<i>A. vulneraria</i> (Fleur)	1.50%
<i>A. vulneraria</i> (Feuille)	4%

Les résultats obtenus montrent que les deux plantes ont des teneurs faibles en lipides. Les feuilles refferment le taux le plus élevé 4%.

- **Détermination de la composition en acides gras**

Les acides gras, des quatre huiles étudiées, sont principalement des acides gras insaturés (AGI) présentant au niveau de la pulpe (60.95%), la racine (46.16%) de *Zizyphus lotus* et feuille (60.47%), fleur (54.2%) d'*Anthyllis vulneraria*, par contre des teneurs moyennes en acides gras saturés (AGS) dans les différents échantillons. (**Tableaux 9 et 10**).

Les AGI comportent des acides gras monoinsaturés (AGMI) avec un pourcentage de 15.58 % et 43.84% pour la racine et la pulpe de *Zizyphus lotus* respectivement. 3.38% et 9.57% pour la fleur et la feuille d'*Anthyllis vulneraria* respectivement. Et des acides gras polyinsaturés (AGPI) avec des pourcentages 13.27% et 23.88% pour la racine et la pulpe *Zizyphus lotus* respectivement. 11.73% et 26.56% pour la feuille et la fleur d'*Anthyllis vulneraria* respectivement (**Tableaux 9 et 10**).

Il est à noter que les deux huiles de la pulpe et la racine de *Zizyphus lotus* contiennent de l'acide érucique 2.81%, 5.67% respectivement. Cet acide gras est absent dans les feuilles et fleur d'*Anthyllis vulneraria*. (**Tableaux 9 et 10**).

Tableau 9. Composition en acides gras (g/100 g de lipides totaux) des différentes parties de *Zizyphus lotus*

Acide gras		Pulpe	Racine
Acide myristique	C14:0	2,79	2,24
A. palmitique	C16:0	27,82	35,96
A. stéarique	C18:0	3,96	11,13
A. arachidique	C 20:0	0,97	1,51
A. béhénique	C22:0	1,93	0,32
A. lignocérique	C 24:0	1,57	2,66
AGS		39.03	53.82
A. Palmitoléique	C16:1	5,93	2,98
A. Oléique	C18:1	28,95	15,87
A. Gondoïque	C20:1	1,23	0,390
A. érucique	C22:1N-9	2,81	5,68
A. nervonique	C 24:1N-9	0,53	
AGMI		39.45	24.924
A. Linoléique	C18:2	9,30	16,06
A.α- linoléinique	C18:3N-3	7,82	3,81
A. eicosadiénoïque	C20:2	3,45	1,37
A. docosatétrénoïque	C22:4N-6	0,46	
A.docosahexaénoïque (DHA)	C22:6N-3	0,49	
AGPI		21.50	21.24
AGI		60.96	46.17
AGMI/AGS		1.01	0.46
AGMI/Lipide total		43.84	15.58
AGPI/Lipide total		23.88	13.28

Tableau 10. Composition en acides gras (g/100 g de lipides totaux) des différentes parties d'*Anthyllis vulneraria*.

Acides gras		Feuille	Fleur
A. myristique	C14:0	2,29	1,29
A. palmitique	C16:0	23,68	26,84
A. stéarique	C18:0	5,13	6,43
A. arachidique	C20:0	1,61	2,83
A. béhénique	C22:0	2,76	4,44
A. lignocérique	C24:0	4,05	3,96
AGS		39.52	45.79
A. Palmitoléique	C16:1	10,17	5,95
A. Oléique	C18:1	3,35	8,41
AGMI		13.53	14.36
A. Linoléique	C18:2	10,83	15,86
A. α - linoléinique	C18:3N-3	36,12	23,98
AGPI		46.95	39.84
AGI		60.47	54.20
AGMI/AGS		0.34	0.3135
AGMI/Lipide total		3.39	9.57
AGPI/Lipide total		11.73	26.56

V. Les rendements des extraits des plantes étudiées

Le tableau montre les rendements en pourcentage des extraits des plantes étudiées.

Tableau 11. Les rendements des extraits des plantes étudiées

	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Tanins
<i>Z. lotus</i> (Racine)	13.90%	2.90%	5.50%
<i>Z. lotus</i> (Pulpe)	31.00%	4.80%	2.32%
<i>A. vulneraria</i> (Fleur)	14.70%	2.65%	1.84%
<i>A. vulneraria</i> (Feuille)	16.60%	2.25%	1.20%

Les rendements (**Tableau11**) ont été déterminés par rapport à 100 g de la matière végétale sèche. Nous constatons que l'extrait phénolique de la pulpe de *Zizyphus lotus* enregistre un fort rendement de l'ordre de 31% suivi par l'extrait des racines de *Zizyphus lotus* à raison de 13.9 %. D'autres rendements plus au moins considérables ont été observés pour les extraits des feuilles et des fleurs d'*Anthyllis vulneraria* 16.60% et 14.70% respectivement.

En ce qui concerne les autres extraits flavonoïdes (phase acétate et phase n butanol) et les tanins, les valeurs varient entre 5.5% et 1.20%.

VI. Dosages des métabolites secondaires

VI.1. Polyphénols et flavonoïdes

Les analyses quantitatives des phénols totaux et des flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage. Le tableau 12 résume les résultats obtenus des teneurs en phénols totaux et flavonoïdes. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents de chaque étalon par g de poids sec de la matière végétale.

Tableau 12. Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des plantes étudiées

	Polyphénols totaux (mg PE/ g DW)	flavonoïdes (mg CE / g DW)
<i>Z. lotus</i> (Racine)	20.090	0.020
<i>Z. lotus</i> (pulpe)	12.006	0.031
<i>A. vulneraria</i> (fleur)	326.660	0.140
<i>A. vulneraria</i> (feuille)	185.000	0.110

PE : équivalent pyrocathécol, CA : équivalent catéchine, DW : poids sec de la matière végétale.

Les résultats indiquent que l'*Anthyllis Vulneraria* renferme les teneurs les plus élevées en phénols totaux et les flavonoïdes à savoir: les fleurs 326.66 mg PE /g DW, feuilles 185 mg PE /g DW pour les polyphénols et de 0.14 mg CE g/ DW dans les fleurs, 0.11 mg CE g / DW dans les feuilles pour les flavonoïdes.

VI.2. Familles tanniques

Tableau13. Teneurs en tanins des plantes étudiées.

	Tanins condensé	Tanins hydrolysable
<i>Z. lotus</i> (Racine)	1.56%	2.34%
<i>Z. lotus</i> (pulpe)	1.74%	0.54%
<i>A. vulneraria</i> (fleur)	0.90%	1.28%
<i>A. vulneraria</i> (feuille)	1.07%	0.69%

Le tableau ci- dessus montre que la racine de *Zizyphus lotus* est riche en tanins hydrolysables qu'en tanins condensés, ce résultat a été confirmé par la présence d'une

réaction positive et une coloration bleue noire lors de l'examen phytochimique. Par contre la teneur de la pulpe en tanins condensés est supérieure à celle en tanins hydrolysables.

Cependant, les feuilles d'*Anthyllis vulneraria* est riche en tanins condensés qu'en tanins hydrolysables, ce résultat a été confirmé par la présence d'une réaction positive et une coloration verte brune lors de l'examen phytochimique. En revanche, les fleurs sont riches en tanins hydrolysables.

VII. Activité antioxydante des extraits des plantes étudiées

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des plantes a été réalisée par quatre techniques : le piégeage du radical libre DPPH, le blanchissement du β -carotène, la réduction de fer et la capacité antioxydante totale.

•Le piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des extraits des deux plantes *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria* évaluée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, dans le but de déterminer la concentration d'inhibition du radical DPPH la plus faible.

Par des dilutions en cascade des différents composés à tester, ainsi que des substances de référence, l'acide ascorbique, acide gallique, acide tannique et le BHA, une gamme de concentrations allant de 0.2 - 16 mg/ml pour les extraits d'*Anthyllis vulneraria* et 0.1 -1 mg/ml pour les extraits de *Zizyphus lotus* a été obtenue. Pour chaque concentration, sont mesurées les densités optiques à 517 nm (**Figure 8, 9**).

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH restant et la valeur de l'IC₅₀.

L'IC₅₀ est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. Plus la valeur de IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante de l'extrait testé est grande (**Pokorny et al., 2001**).

La capacité anti-radicalaire ne peut être mesurée directement, mais par l'évaluation de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de la réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier. Le mécanisme principal d'action

des composés phénoliques (Φ -OH) est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH alors transformé en une molécule stable DPPH (Popovici *et al.*, 2010).

Les pourcentages de réduction en fonctions des concentrations sont représentés sur les figures 8 et 9. Les résultats représentés sur les figures 10-13, montrent les concentrations d'inhibition à 50% : IC_{50} , qui sont relativement faibles, ce qui reflète la présence des composés qui peuvent réduire le radical DPPH.

La fraction tannique et la fraction butanolique des flavonoïdes de la racine de *Zizyphus lotus* ont montré un pouvoir de piégeage du DPPH important par rapport à celui de la fraction d'acétate d'éthyle des flavonoïdes et l'extrait phénolique. Donc une IC_{50} est relativement faible (225 ± 0.002 mg/ml et 0.211 ± 0.017 mg/ml) respectivement.

La fraction des tanins et la fraction butanolique des flavonoïdes de la racine de *Zizyphus lotus* ont montré un pouvoir de piégeage du DPPH important par rapport à celui de la fraction d'acétate d'éthyle des flavonoïdes et l'extrait phénolique. Donc des IC_{50} qui sont relativement faible (0.225 ± 0.002 mg/ml et 0.211 ± 0.017 mg/ml respectivement).

L'extrait phénolique de la pulpe de *Zizyphus lotus* a une valeur d' IC_{50} inférieur à celles des autres fractions de la pulpe de *Zizyphus lotus*, c'est-à-dire une activité plus importante. Cette dernière peut être due à l'effet de synergie des substances présentes dans l'extrait.

L'extrait tannique de la feuille d'*Anthyllis vulneraria* possède une valeur d' IC_{50} inférieur à celles des autres fractions issues de la feuille. La fraction tannique et n-butanolique de la fleur d'*Anthyllis Vulneraria* ont un pouvoir réducteur élevé par rapport aux autres extraits de la fleur.

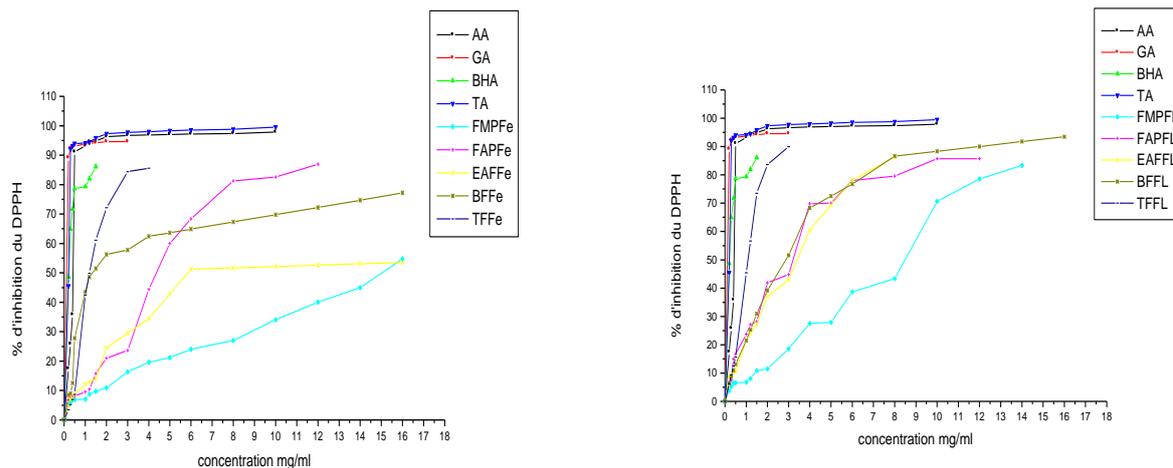


Figure 8. Pourcentage de réduction en fonction de la concentration des extraits phénoliques d'*Anthyllis vulneraria*. FMPFe : fraction méthanolique des polyphénols des feuilles ; FAPFe : fraction aqueuse des polyphénols des feuilles ; EAFFe : flavonoïdes phase acétate d'éthyle des feuilles ; BFFe : flavonoïdes phase butanolique des feuilles ; TFFe : tanins des feuilles ; FMPFL : fraction méthanolique des polyphénols des fleurs ; FAPFL : fraction aqueuse des polyphénols des fleurs ; EAFFL : flavonoïdes phase acétate d'éthyle des fleurs ; BFFL : flavonoïdes phase butanolique des fleurs ; TFFL : tanins des fleurs ; AA : acide ascorbique ; GA : acide gallique ; TA : acide tannique ; BHA : butylhydroxyanisole.

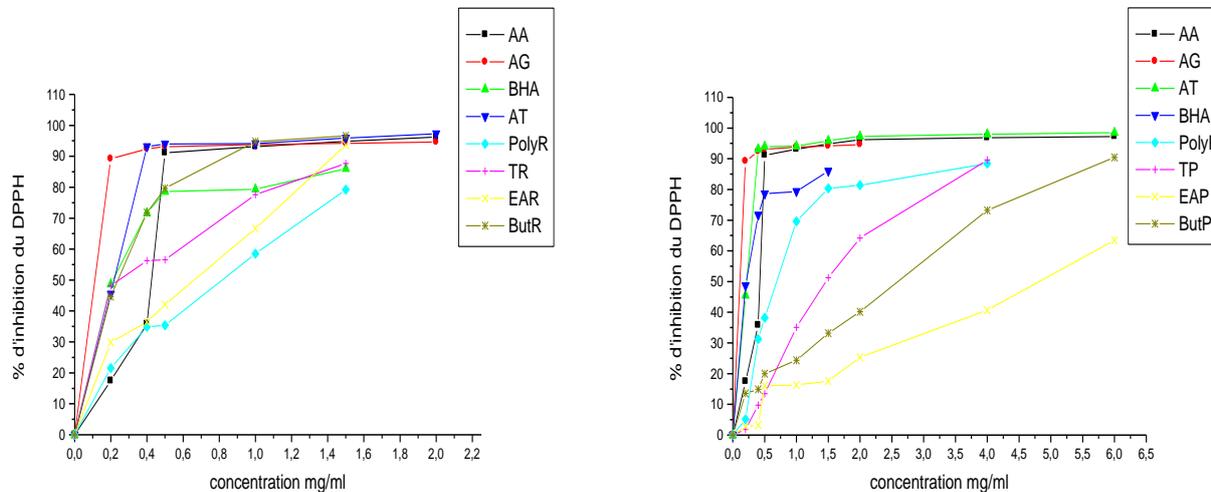


Figure 9. Pourcentage de réduction en fonction de la concentration des extraits phénoliques de *Zizyphus lotus*. PolyR : extrait phénolique des racines ; EAR : flavonoïdes phase acétate éthyle des racines ; ButR : flavonoïdes phase butanolique des racines ; TR : tanins des racines ; PolyP : extrait phénolique de la pulpe ; EAP : flavonoïdes phase acétate éthyle de la pulpe ; ButP : flavonoïdes phase butanolique ; TP : tanins de la pulpe ; AA : acide ascorbique ; GA : acide gallique ; TA : acide tannique ; BHA : butylhydroxyanisole.

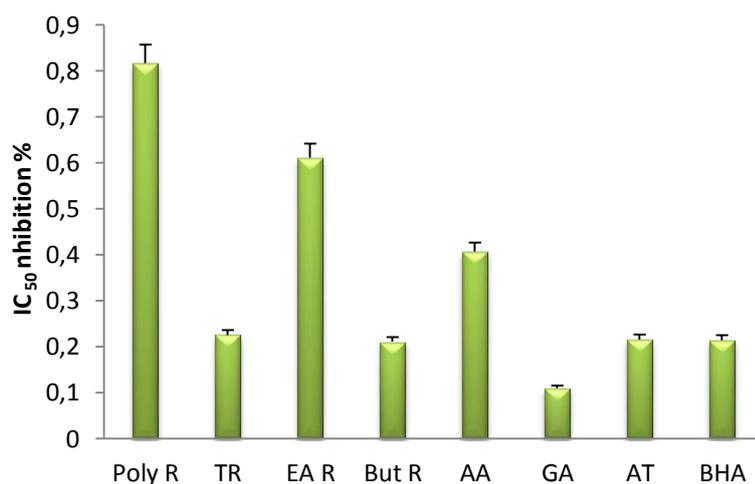


Figure 10. 50% d'inhibition du radical libre DDPH des différentes fractions de la racine de *Zizyphus lotus*. PolyR : extrait phénolique des racines ; EAR : flavonoïdes phase acétate éthyle des racines ; ButR : flavonoïdes phase butanolique des racines ; TR : tanins des racines ; AA : acide ascorbique ; GA : acide gallique ; TA : acide tannique ; BHA : butylhydroxyanisole.

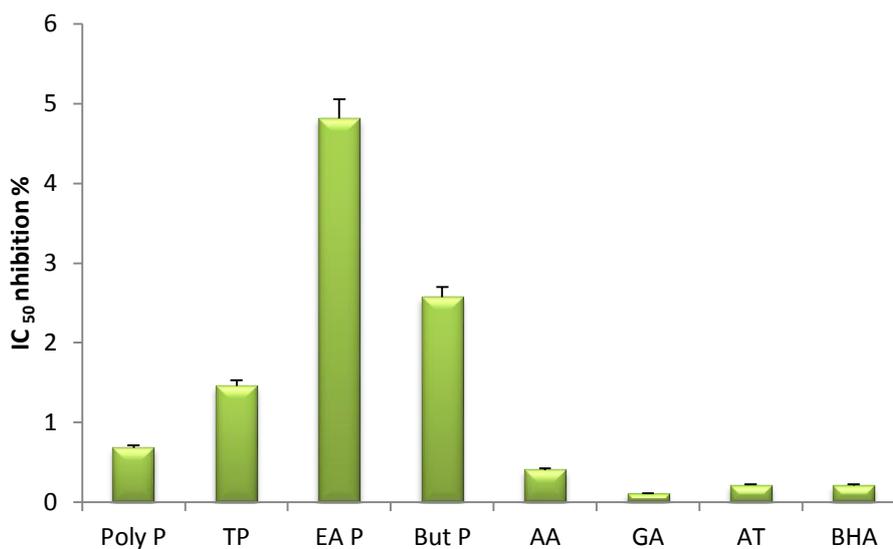


Figure 11. 50% d'inhibition du radical libre DDPH des différentes fractions de la pulpe de *Zizyphus lotus*. Poly P : extrait phénolique de la pulpe ; EAP : flavonoïdes phase acétate éthyle de la pulpe ; ButP : flavonoïdes phase butanolique ; TP : tanins de la pulpe ; AA : acide ascorbique ; GA : acide gallique ; TA : acide tannique ; BHA : butylhydroxyanisole.

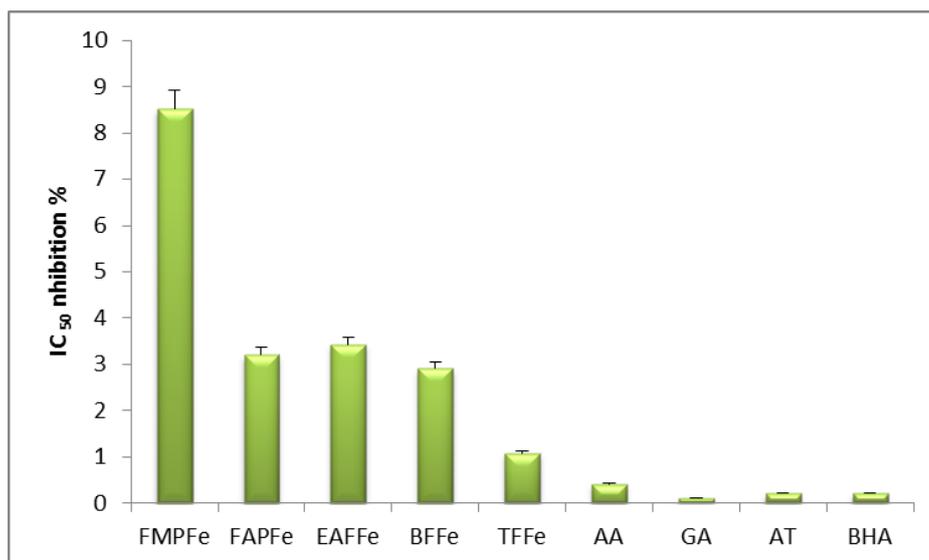


Figure 12. 50% d'inhibition du radical libre DDPH des différentes fractions de la feuille d'*Anthyllis vulneraria* ; FMPFe : fraction méthanolique des polyphénols des feuilles ; FAPFe : fraction aqueuse des polyphénols des feuilles ; EAFFe : flavonoïdes phase acétate d'éthyle des feuilles ; BFFe: flavonoïdes phase butanolique des feuilles ; TFFe: tanins des feuilles ; AA : acide ascorbique ; GA : acide gallique ; TA : acide tannique ; BHA : butylhydroxyanisole.

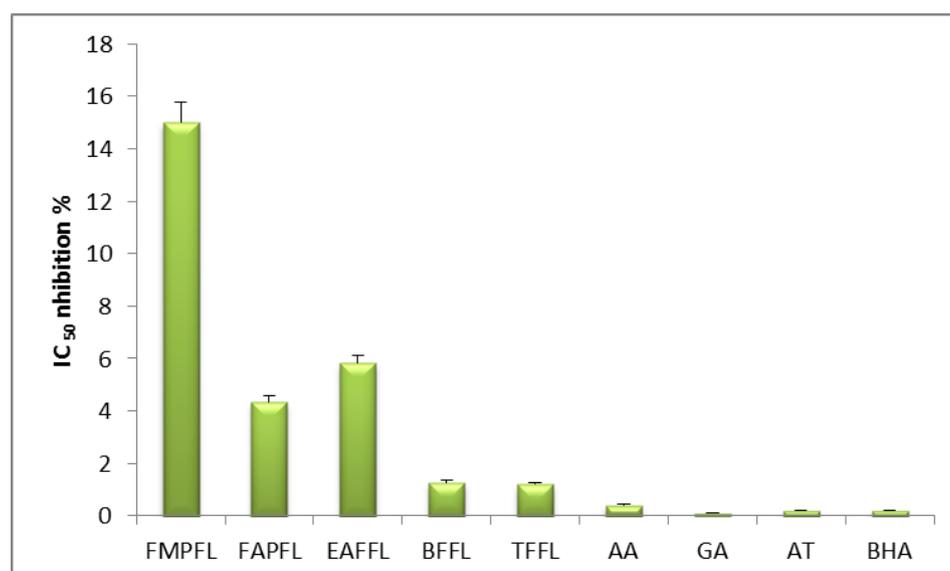


Figure 13. 50% d'inhibition du radical libre DDPH des différentes fractions de la fleur d'*Anthyllis vulneraria*. FMPFL: fraction méthanolique des polyphénols des fleurs ; FAPFL : fraction aqueuse des polyphénols des fleurs ; EAFFL : flavonoïdes phase acétate d'éthyle des fleurs ; BFFL: flavonoïdes phase butanolique des fleurs ; TFFL: tanins des fleurs ; AA : acide ascorbique ; GA : acide gallique ; TA : acide tannique ; BHA : butylhydroxyanisole.

- **Le blanchissement du β -carotène**

Nous avons étudié l'activité antioxydante des extraits des deux plantes *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria*, par le système β -carotène/acide linoléique, afin d'évaluer la concentration de l'extrait qui présente le plus d'activité.

Par des dilutions en cascade des différents composés à tester, ainsi que des substances de référence : l'acide gallique et le BHA, nous obtenons une gamme de concentrations allant 0.1 – 1 mg/ml pour tous les extraits. Pour chaque concentration, nous mesurons les densités optiques à 490 nm.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système β -carotène/acide linoléique est proportionnel à la concentration. Tous les extraits des deux plantes inhibent le blanchissement du β -carotène à des différentes valeurs de concentrations par le piégeage des radicaux libres (**Figures14- 17**).

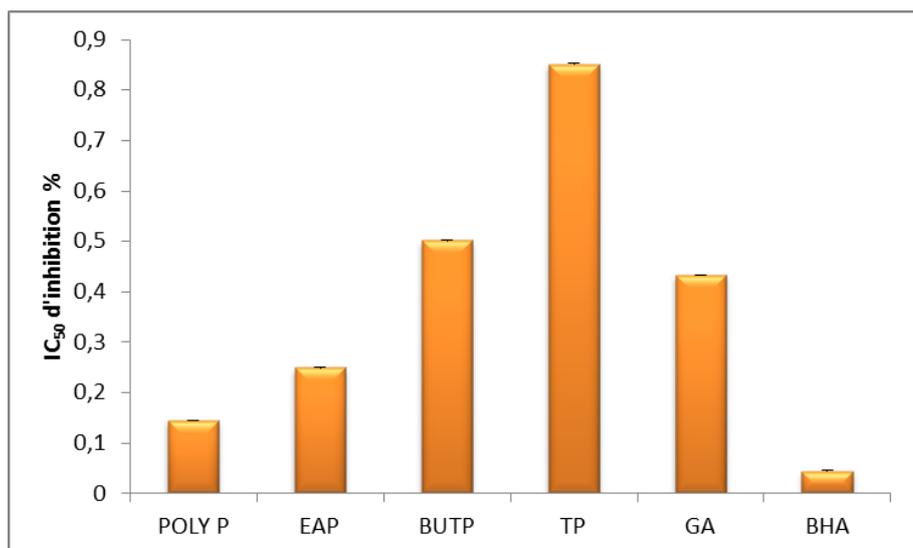


Figure 14. 50% d'inhibition de blanchissement du β -carotène des différentes fractions de la pulpe de *Zizyphus lotus*. Poly P : extrait phénolique de la pulpe ; EAP : flavonoïdes phase acétate éthyle de la pulpe ; ButP : flavonoïdes phase butanolique ; TP : tanins de la pulpe ; GA : acide gallique ; BHA : butylhydroxyanisole.

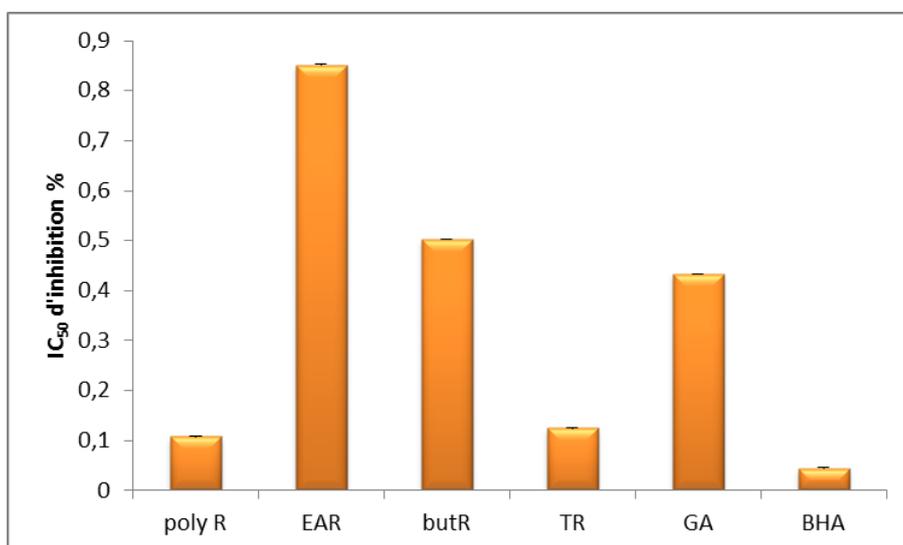


Figure 15. 50% d'inhibition de blanchissement du β -carotène des différentes fractions de la racine de *Zizyphus lotus*. PolyR : extrait phénolique des racines ; EAR : flavonoïdes phase acétate éthyle des racines ; ButR : flavonoïdes phase butanolique des racines ; TR : tanins des racines ; GA : acide gallique ; BHA : butylhydroxyanisole.

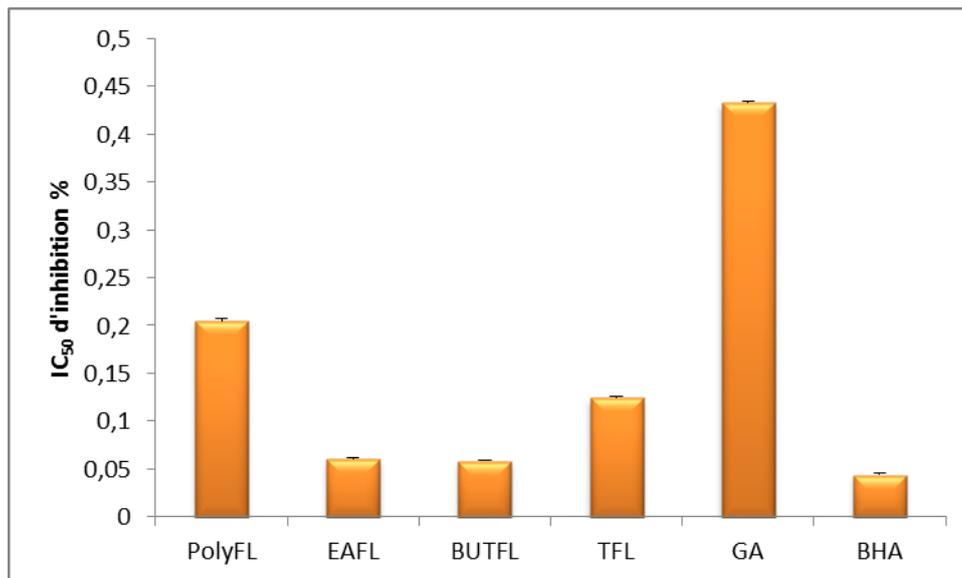


Figure 16. 50% d'inhibition de blanchissement du β -carotène des différentes fractions de la fleur d'*Anthyllis vulneraria*. PolyFL : extrait phénolique des fleurs ; EAFL : flavonoïdes phase acétate éthyle des fleurs ; BUTFL : flavonoïdes phase butanolique des fleurs ; TFL : tanins des fleurs ; GA : acide gallique ; BHA : butylhydroxyanisole.

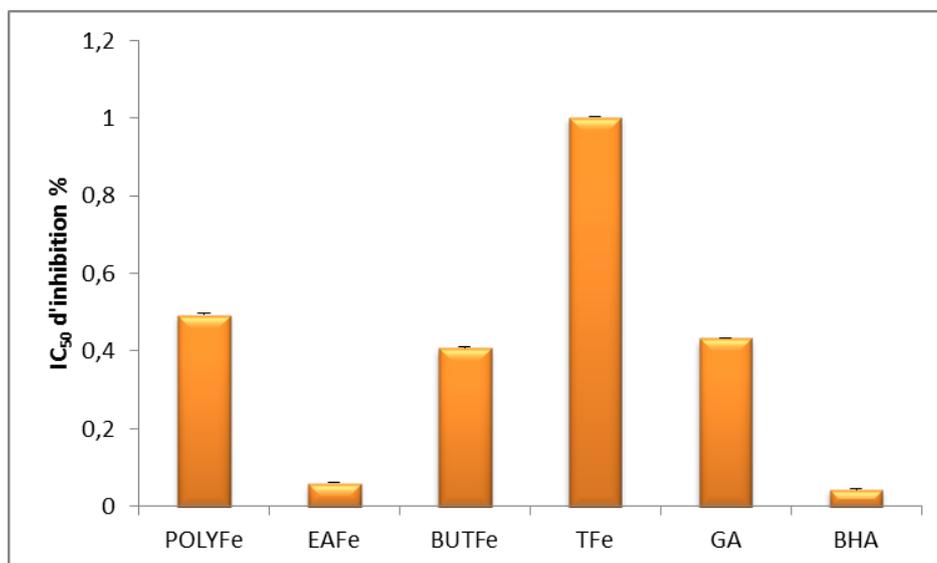


Figure 17. 50% d'inhibition de blanchissement du β -carotène des différentes fractions de la feuille d'*Anthyllis vulneraria*. PolyFe: extrait phénolique des feuilles ; EAFe: flavonoïdes phase acétate éthyle des feuilles ; BUTFe : flavonoïdes phase butanolique des feuilles ; TFe : tanins des feuilles ; GA : acide gallique ; BHA : butylhydroxyanisole.

- **Réduction de fer (FRAP)**

Nous avons étudié l'activité antioxydante des extraits de deux plantes, par la méthode de réduction de fer, afin de tester et de déterminer la concentration d'extrait le plus actif de chaque partie étudiée.

Par des dilutions en cascade des différents composés à tester, ainsi que des substances de référence, l'acide ascorbique et le BHA, nous avons obtenons une gamme de concentrations allant de 0.1- 1 mg/ml. Pour chaque concentration, nous mesurons les densités optiques à 700 nm.

Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats, représentés dans les figures 18-19, nous ont permis remarquer que la réduction du fer est proportionnelle avec les concentrations utilisées. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Ozturk et al., 2007 ; Su et al., 2008, Liu et al., 2009**).

A des faibles concentrations, la réduction du fer de tous les extraits issus de *Zizyphus lotus* et *d'Anthyllis vulneraria* est comparable, certaines fois meilleure à celle de l'acide ascorbique.

- **Capacité antioxydante totale (CAT)**

La figure 20 montre que les extraits présentent des activités antioxydantes différentes. L'extrait phénolique de la pulpe possède la meilleure capacité antioxydante totale comparé aux autres extraits de *Zizyphus lotus*.

La fraction acétate d'éthyle de la feuille exerce un pouvoir antioxydant le plus élevé comparé aux autres fractions *d'Anthyllis vulneraria*.

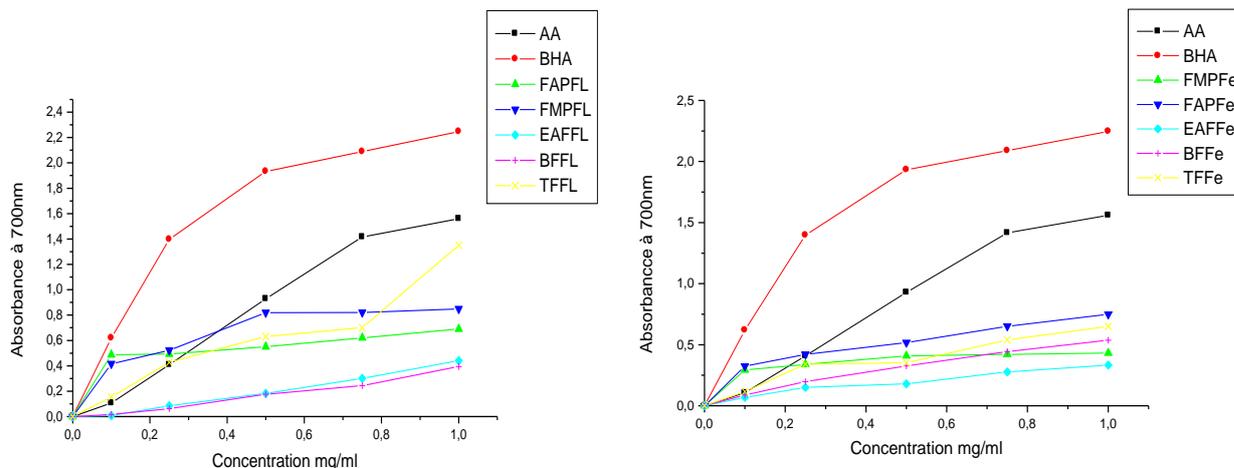


Figure 18. Réduction du fer des extraits des fleurs et des feuilles d'*Anthyllis vulneraria*. FMPFe : fraction méthanolique des polyphénols des feuilles ; FAPFe : fraction aqueuse des polyphénols des feuilles ; EAFFe : flavonoïdes phase acétate d'éthyle des feuilles ; BFFe: flavonoïdes phase butanolique des feuilles ; TFFe: tanins des feuilles ; FMPFL: fraction méthanolique des polyphénols des fleurs ; FAPFL : fraction aqueuse des polyphénols des fleurs ; EAFFL : flavonoïdes phase acétate d'éthyle des fleurs ; BFFL: flavonoïdes phase butanolique des fleurs ; TFF: tanins des fleurs ; AA : acide ascorbique ; BHA : butylhydroxyanisole.

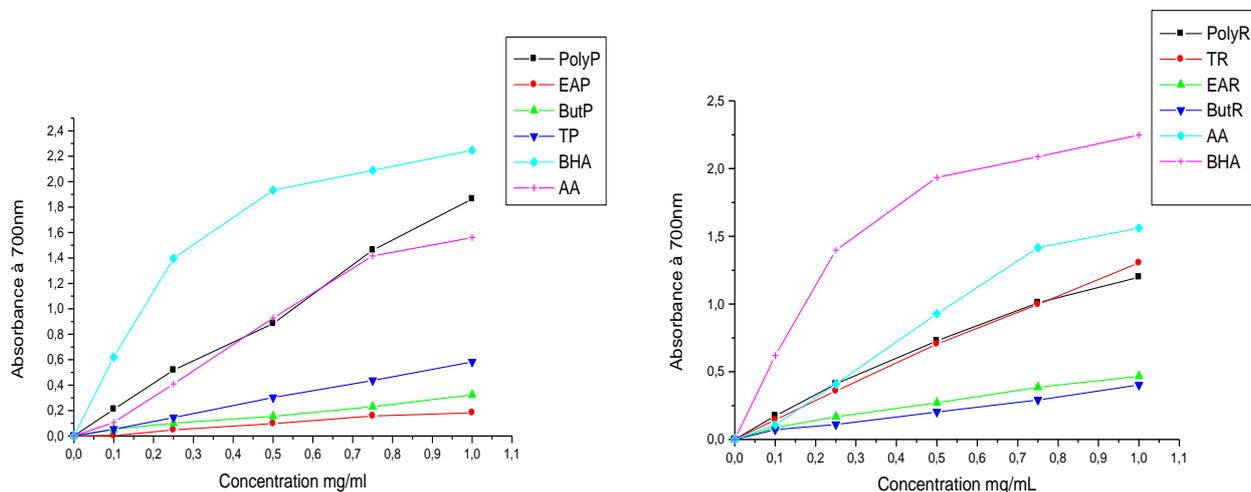


Figure 19. Réduction du fer des extraits de la racine et de la pulpe de *Zizyphus lotus*. PolyR : extrait phénolique des racines ; EAR : flavonoïdes phase acétate éthyle des racines ; ButR : flavonoïdes phase butanolique des racines ; TR : tanins des racines ; Poly P : extrait phénolique de la pulpe ; EAP : flavonoïdes phase acétate éthyle de la pulpe ; ButP : flavonoïdes phase butanolique ; TP : tanins de la pulpe ; AA : acide ascorbique ; BHA : butylhydroxyanisole.

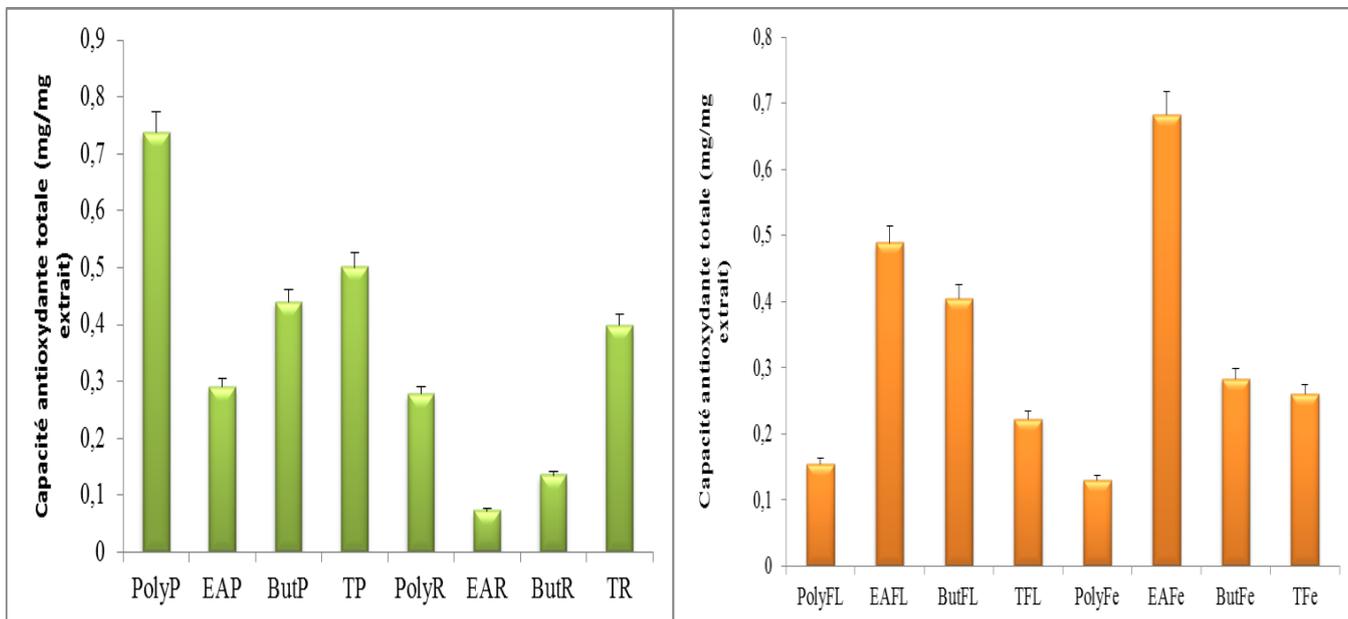


Figure 20. Comparaison de la capacité antioxydante totale des extraits des plantes étudiées. PolyR : extrait phénolique des racines ; EAR : flavonoïdes phase acétate éthyle des racines ; ButR : flavonoïdes phase butanolique des racines ; TR : tanins des racines ; Poly P : extrait phénolique de la pulpe ; EAP : flavonoïdes phase acétate éthyle de la pulpe ; ButP : flavonoïdes phase butanolique ; TP : tanins de la pulpe ; PolyFL : extrait phénolique des fleurs ; EAFL : flavonoïdes phase acétate éthyle des fleurs ; ButFL : flavonoïdes phase butanolique des fleurs ; TFL : tanins des fleurs ; PolyFe: extrait phénolique des feuilles ; EAFe: flavonoïdes phase acétate éthyle des feuilles ; ButFe : flavonoïdes phase butanolique des feuilles ; TFe : tanins des feuilles.

VII. Effets des extraits phénoliques sur la prolifération des splénocytes de rats (cytotoxicité).

Les résultats montrent que la prolifération des splénocytes en présence d'extraits phénoliques est significativement variable puisque les indices de proliférations (bleu trypan, cyquant) sont différents selon les incubations (**Figures 21 et 22**).

En présence de l'extrait phénolique de la pulpe de *Zizyphus lotus* à des concentrations de 31.25-250 µg/ml, la prolifération splénocytaire est stimulée puisque les indices de prolifération sont significativement augmentés comparés aux contrôles, par contre la prolifération cellulaire est réduite à partir de la concentration 10 mg/ml.

En présence de l'extrait phénolique de la racine de *Zizyphus lotus* à la concentration de 10 mg/ml la prolifération cellulaire est réduite.

En présence de l'extrait phénolique des feuilles d'*Anthyllis vulneraria* à des concentrations de 31.25-1000 µg/ml, la prolifération splénocytaire est stimulée puisque les indices de proliférations sont significativement augmentés comparés aux contrôles, par contre la prolifération cellulaire est réduite à partir de la concentration 25 mg/ml.

En présence de l'extrait phénolique des fleurs d'*Anthyllis vulneraria* 31.25-1000 µg/ml, la prolifération splénocytaire est stimulée puisque les indices de proliférations sont significativement augmentés comparés aux contrôles, par contre la prolifération cellulaire est réduite à partir de la concentration 25µg/ml.

On peut conclure que les extraits phénoliques de deux plantes ne sont pas toxiques à des concentrations comprises entre 31.25 µg/ml et 10 mg/ml.

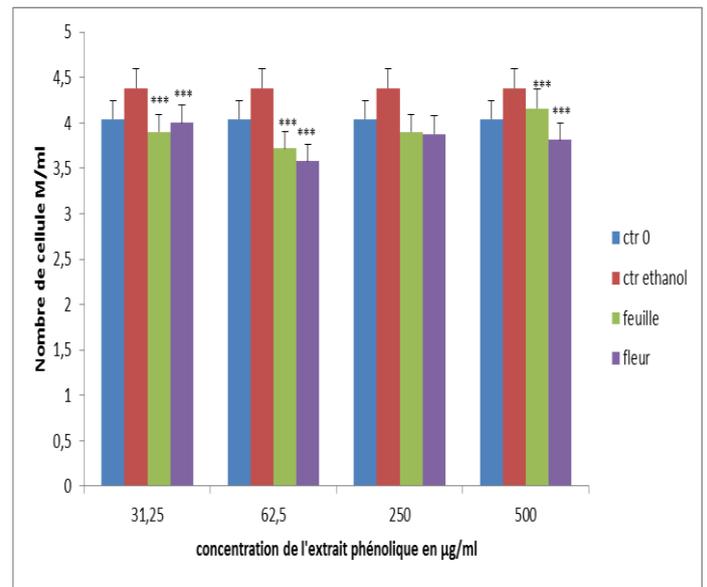
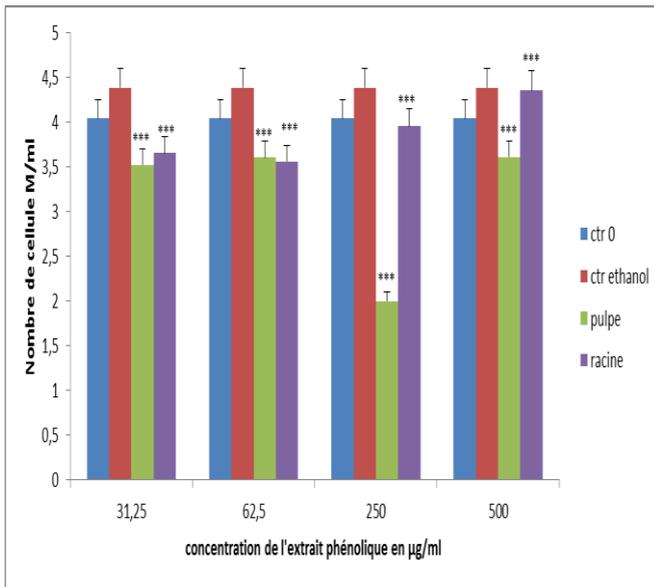


Figure21. Effet des extraits phénoliques de la racine et de la pulpe de *Zizyphus lotus* et de la fleur et de la feuille d'*Anthyllis vulneraria* sur la prolifération des splénocytes. Les cellules ont été incubées en présence des extraits phénoliques des deux plantes (31.25 - 500 µg/ml) pendant 72h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ±ET des incubations réalisées en triple. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de déterminer les différences significatives. * indique différence significative par rapport aux contrôles : ***P<0.001.

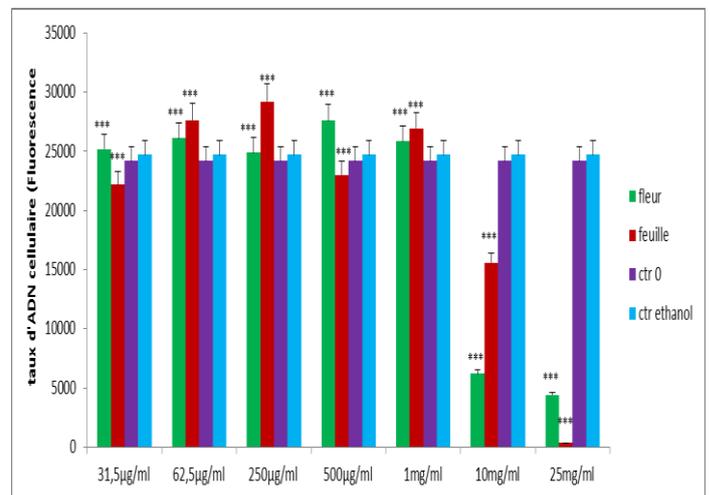
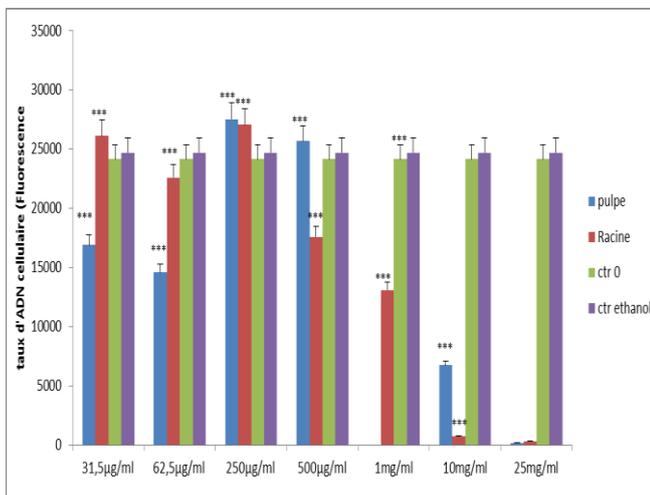


Figure22. Le taux d'ADN cellulaire mesuré par Cyquant NF Cell Proliferation Assay Kit dans des splénocytes traités par les extraits phénoliques des deux plantes étudiées. Les cellules ont été incubées en présence des extraits phénoliques des deux plantes (31.25 µg/ml- 25 mg/ml) pendant 72h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes± ET des incubations réalisées en triple. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de déterminer les différences significatives. * indique différence significative par rapport aux contrôles : ***P<0.001.

VIII. Activité anti-inflammatoire des extraits phénoliques de *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria*.

Les éléments moléculaires impliqués dans l'inflammation sont très nombreux, notre étude s'est basée sur l'évaluation du taux de nitrite libéré par les cellules (RAW2647).

La libération de NO₂ en présence ou absence de LPS et en présence des extraits phénoliques dans les cultures des monocytes (RAW 2647) est significativement différente (**Figures 23 – 26**).

En présence d'extraits phénoliques de la pulpe, la racine de *Zizyphus lotus* et des fleurs d'*Anthyllis vulneraria* dans les cultures de RAW2647 à faible concentration (0.5 mg/ml), la libération de NO₂ est significativement réduite comparée aux proliférations basales.

En présence d'extrait phénolique des feuilles d'*Anthyllis vulneraria* dans les cultures de RAW2647 à faibles concentrations (0.5- 1 mg/ml), la libération de NO₂ est significativement réduite comparée aux proliférations basales.

On note qu'à une concentration de 0.5 mg/ml l'extrait phénolique de la racine à un pouvoir d'inhiber la libération de NO₂ plus élevée que la pulpe de *Zizyphus lotus* et la fleur que la feuille d'*Anthyllis vulneraria*. Cependant, à cette concentration l'extrait phénolique de *Zizyphus lotus*, possède le pouvoir de réduire la libération de NO₂ supérieur non seulement à celui de la pulpe de *Zizyphus lotus* mais aussi à celui de l'acide ascorbique, antioxydant de référence.

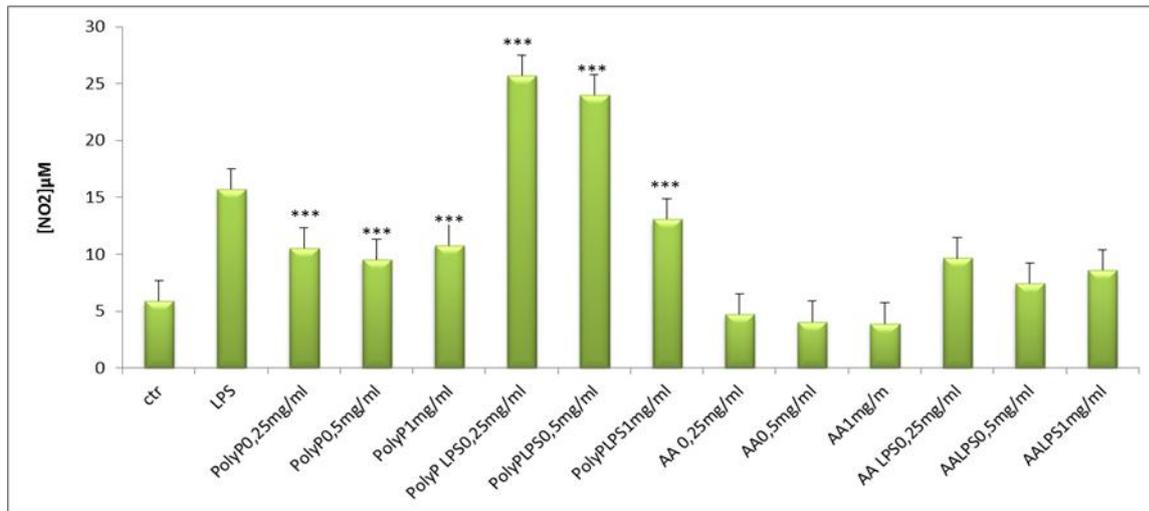


Figure 23. Taux de NO₂ libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits phénoliques de la pulpe *Zizyphus lotus*. Les cellules ont été incubées en présence de LPS (100 ng/ml) et les extraits phénoliques de 0.25-1 mg/ml pendant 72h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ±ET des incubations réalisées en triple. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de déterminer les différences significatives. * indique différence significative par rapport aux contrôles et LPS : ***P<0.001

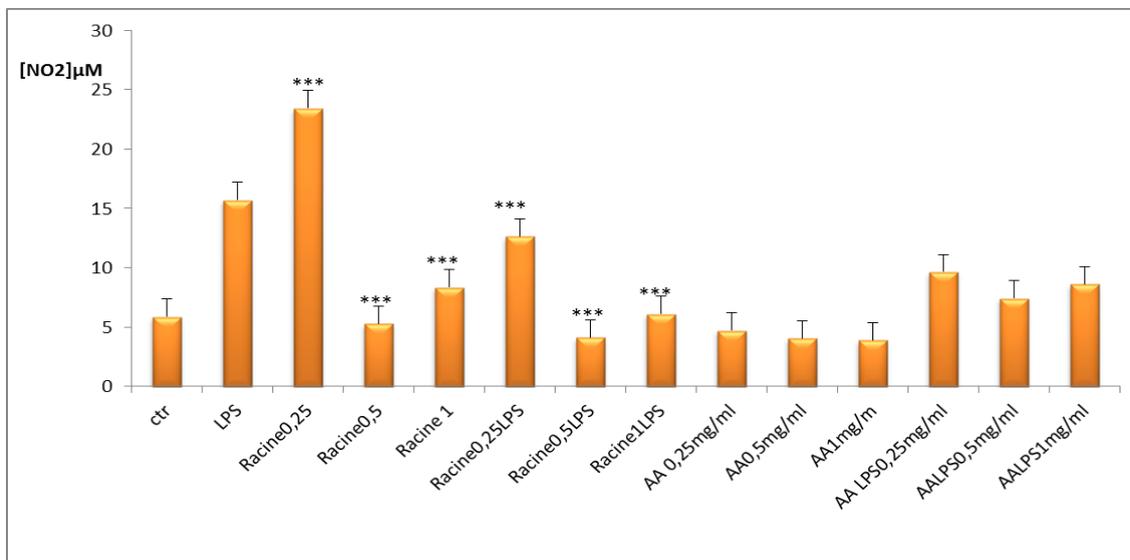


Figure 24. Taux de NO₂ libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits phénoliques de la racine *Zizyphus lotus*. Les cellules ont été incubées en présence de LPS (100 ng/ml) et les extraits phénoliques de 0.25-1 mg/ml pendant 72h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ±ET des incubations réalisées en triple. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de déterminer les différences significatives. * indique différence significative par rapport aux contrôles et LPS : ***P<0.001

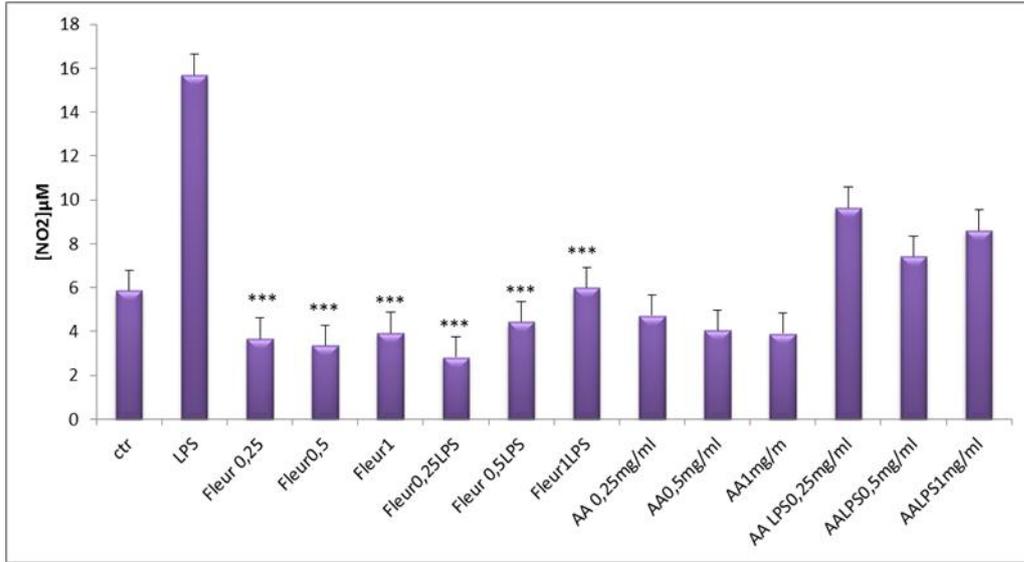


Figure 25. Taux de NO₂ libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits phénoliques de la fleur d'*Anthyllis vulneraria*. Les cellules ont été incubées en présence de LPS (100 ng/ml) et les extraits phénoliques de 0.25-1 mg/ml pendant 72h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triple. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de déterminer les différences significatives. * indique différence significative par rapport aux contrôles et LPS : ***P<0.001

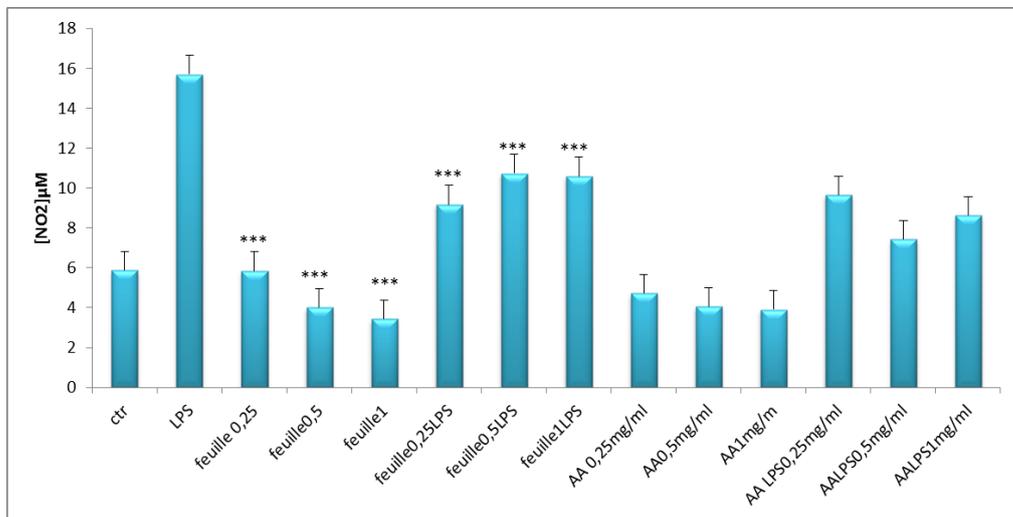


Figure 26. Taux de NO₂ libéré par les monocytes lignée RAW2647 traité par les extraits phénoliques de la feuille d'*Anthyllis vulneraria*. Les cellules ont été incubées en présence de LPS (100 ng/ml) et les extraits phénoliques de 0.25-1 mg/ml pendant 72h. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± ET des incubations réalisées en triple. Les multiples comparaisons sont réalisées par le test ANOVA. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de déterminer les différences significatives. * indique différence significative par rapport aux contrôles et LPS : ***P<0.001

Discussion

L'utilisation des plantes médicinales est aujourd'hui la forme de traitement la plus répandue à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche de nouvelles substances à activité biologique constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques.

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des substances bioactives. Les plantes synthétisent de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leur existence. Ceux-ci englobent les protéines, les lipides et les hydrates de carbone qui servent à la subsistance et à la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux qui s'en nourrissent.

De plus, les plantes synthétisent une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires dont la fonction est loin de faire l'unanimité. De nombreux métabolites secondaires sont des « antibiotiques » au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même les autres plantes.

En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques dont la présente étude qui est consacrée à la recherche d'éventuels effets Antioxydant et anti-inflammatoire à partir de deux plantes *Zizyphus lotus* et *Anthyllis vulneraria*.

Les différentes espèces du *Zizyphus* sont largement utilisées dans le traitement de certaines maladies comme : les troubles digestives, la faiblesse, les affections du foie, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections cutanées, la fièvre, la diarrhée, l'insomnie et l'inflammation (**Abu-Zarga et al ., 1995 ; Abdel-Zaher et al ., 2005 ; Suksamrarn et al ., 2005**). Alors que l'*Anthyllis vulneraria* (trèfles des sables) est très prisée pour ses caractéristiques dépuratives, astringentes, diurétiques, cicatrisantes et anti-inflammatoires. Elle est également efficace pour soigner les plaies, la constipation et la digestion (**Menkovic et al., 2011**).

Dans cette partie, nous avons étudié la composition chimique des deux plantes et évalué l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits phénoliques par des méthodes colorimétriques et nous avons utilisé comme modèle expérimental : culture de deux types de cellules : les splénocytes et les RAW 2647.

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les familles de composés chimiques existantes dans les parties de deux plantes étudiées.

Les résultats obtenus indiquent que les flavonoïdes sont des familles majoritaires dans les fleurs que les feuilles d'*Anthyllis vulneraria* et dans la racine que la pulpe de *Zizyphus lotus*. La racine de *Zizyphus lotus* est fortement riche en tannins. De même les saponosides sont fortement caractérisée dans les fleurs, les feuilles d'*Anthyllis vulneraria* et dans la racine et elles sont faible dans la pulpe de *Zizyphus lotus* ; l'absence de l'amidon est observée dans les quatre parties étudiées. Cependant, une forte présence des composés réducteurs a été observée dans les deux parties de *Zizyphus lotus*. Les alcaloïdes sont présents en faible quantité dans les parties étudiées. Les stérols et les stéroïdes sont présents en quantités variables dans les différentes parties étudiées.

Borgie et Chouchane (2006), Catoire (1994) viennent confirmer nos résultats à savoir que *Zizyphus lotus* contient des molécules biologiquement actives tels que les flavonoïdes, tannins, les triterpènes, les anthraquinones, les alcaloïdes et les saponosides. Les résultats obtenus pour l'*Anthyllis vulneraria* concordent avec ceux de (**Jadwiga et al., 2001 Hänsel et al., 1992**).

L'évaluation des teneurs en métabolites primaires de la pulpe de *Zizyphus lotus* servira pour la préparation de régime destiné aux rats. L'analyse du taux d'humidité au niveau de la fleur et la feuille d'*Anthyllis vulneraria* a montré une proportion 49.44% et 51.12% respectivement. Pour la pulpe et la racine de *Zizyphus lotus* le taux d'humidité est estimé respectivement 8.90% et 9.11%. Ceci s'explique que le dosage a été réalisé sur des échantillons stockés.

La détermination de la teneur en matière minérale nous éclaire sur la qualité nutritionnelle de l'échantillon à analyser. En effet, la teneur en cendres des aliments doit avoir un seuil limitant pour la consommation humaine et animale.

Les résultats obtenus pour la teneur en cendres est important dans les feuilles (11.69%) que dans les fleurs (7.13%) d'*Anthyllis vulneraria* et dans la pulpe (3.44%) que dans la racine (2.69%) de *Zizyphus lotus*.

Selon **Boudraa et al. (2010)**, le fruit de *Zizyphus lotus* contenait des minéraux à 3.20 % de fruit sec. Cette matière minérale est composé de calcium (490.84 mg/100g), magnésium (397.91 mg/100g), potassium (134.99 mg/100g), sodium (11.45 mg/100g) et phosphore (10.62 mg/100g).

Les fibres alimentaires sont des polymères glucidiques d'origine végétale, associées ou non dans la plante à la lignine ou à d'autres constituants non glucidiques (polyphénols, cires, saponosides, phytostérols) (AFSSA, 2002).

L'apport en fibres provient majoritairement des végétaux qui constituent notre alimentation : fruits, légumes, diverses graines et céréales (Bruneton, 1999).

Les fibres alimentaires ont plusieurs effets bénéfiques sur la santé, notamment :

- Augmentation du bol fécal.
- diminution de la cholestérolémie et du taux de LDL plasmatique.
- diminution de la glycémie et de l'insulinémie post- prandiale.

Les résultats obtenus montrent que la racine contient de fortes teneurs en fibre (47.90%) que la pulpe (28.00%) de *Zizyphus lotus*, cette forte teneur peut être expliquée par la présence des fibres insolubles. Pour l'*Anthyllis vulneraria*, on remarque que la fleur est riche (24.45%) que la feuille (2.88%).

Concernant le taux de sucre, les résultats montrent que la pulpe de *Zizyphus lotus* est la plus riche en sucre (26.00%), ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Catoire *et al.* (1999) dont les taux sont estimés entre 20-30%.

En ce qui concerne les teneurs en protéines brutes, les résultats montrent que les parties étudiées de deux plantes renferment de faibles teneurs en protéines, d'où l'importance de connaître leur pourcentage afin de déterminer l'apport qu'il faudrait supplémenter pour obtenir une ration équilibrée.

Les deux plantes étudiées ne sont pas riches en huiles, on note 0.9% pour la pulpe de *Zizyphus lotus* et 1.6% pour la racine de *Zizyphus lotus*. Pour l'*Anthyllis vulneraria*, la feuille est plus riche (4.0%) que les fleurs (1.5%).

Les acides gras des quatre huiles étudiées, sont principalement des acides gras insaturés (AGI) présentant dans : la racine : 46.17% ; la pulpe : 60.95% pour *Zizyphus lotus* et la feuille : 60.47% ; la fleur : 54.2% pour l'*Anthyllis vulneraria*. Par contre, des teneurs en acides gras saturés (AGS) légèrement faibles sont estimés à : la racine : 53.83% ; la pulpe : 39.03% pour *Zizyphus lotus* et la fleur : 45.80% ; feuille : 39.52% pour l'*Anthyllis vulneraria*.

L'acide palmitique majoritaire est particulier. En effet, si la majorité des études a montré un effet hypercholestérolémiant de cet acide gras (Hunter, 2001), d'autres ont démontré une relative neutralité (Khosla *et al.*, 1996 ; Hayes *et al.*, 1992). En émettent

l'hypothèse d'un seuil, ils postulent qu'au-delà de 400 mg de cholestérol alimentaire ingéré par jour, l'acide palmitique augmenterait le taux de LDL-cholestérol (de manière peut-être supérieure à l'acide myristique), tandis qu'il serait plutôt neutre en deçà (**Khosla et al., 1996 ; Hayes et al., 1992**). Concernant la position de l'acide palmitique sur le squelette glycérique des triacylglycérols, il augmenterait plus le LDL-cholestérol sanguin en étant placé en position interne (**Kubow, 1996**), ce qui est le cas dans la matière grasse laitière (**Poisson et Narce, 2003**) ou le lait maternel (**Dotson et al., 1992**).

En effet, **Fellat – Zerrouk et al. (1987) et Maurin et al. (1989)** ont noté que le taux de l'acide palmitique augmente quand on passe de la plaine vers les hauts plateaux.

Les AGI comportent des acides gras monoinsaturés (AGMI) avec des teneurs variables : la pulpe : 39.45% ; la racine 24.92% pour *Zizyphus lotus*, la fleur : 14.36% ; la feuille : 13.53% pour l'*Anthyllis vulneraria*. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont détectés avec des taux compris entre 21.50% et 46.94% (la feuille : 46.95% ; la fleur : 39.84% pour l'*Anthyllis vulneraria* et la pulpe : 21.50% ; la racine : 21.24% pour *Zizyphus lotus*).

Les AGMI possèdent une grande importance suite à leur implication nutritionnelle et leur effet positif sur la stabilité oxydatives des huiles. L'acide oléique est le principal AGMI dans les huiles de pulpe et racine, présentant un taux 28.95 % et 15.87% respectivement. L'acide oléique (OA) est l'acide gras majoritaire de nombreuses huiles végétales, en particulier des huiles d'olive et de colza. selon **Hunter et al., (2000)**, l'acide oléique possède un effet neutre ou légèrement positif vis-à-vis le cholestérol total et le LDL-cholestérol.

Les AGMI sont moins susceptibles à l'oxydation par les radicaux libres que les AGPI, parce qu'elles ne possèdent qu'une seule double liaison dans leur structure chimique (**Gutierrez et al., 1999**). L'acide linoléique, représentant des AGPI W6 qui est détecté à une concentration de : la fleur : 15.86% ; la feuille : 10.83% pour l'*Anthyllis vulneraria* et de la racine : 16.07% ; la pulpe : 9.29% pour *Zizyphus lotus*. On note la présence d'acide α linoléique représentant AGPI (W3) avec des teneurs faibles 7.82% et 3.81% pour la pulpe et la racine de *Zizyphus lotus* respectivement et des teneurs élevés dans la feuille (36.12%) et la fleur (23.98%) d'*Anthyllis vulneraria*.

Toutefois, il est à noter que les deux huiles (pulpe, racine) de *Zizyphus lotus* contiennent de l'acide érucique 2.81%, 5.68% respectivement et que cet acide gras est absent dans la

feuille et la fleur d'*Anthyllis vulneraria*. C'est un acide gras toxique pour l'homme à dose importante supérieure à 2% de la fraction lipidique.

La détermination des acides gras des quatre huiles nous permet de les classer et les comparer avec une large gamme d'huiles végétales (tableau 14). On peut dire que l'huile de la pulpe et de la racine ressemble à l'huile d'arachide (*Arachis hypogea*) (Christopoulou *et al.*, 2004), d'avoine (*Avena sativa*) (Zhou *et al.*, 1998), de sarrasin (*Polygonum fagopyrum*) (Jahaniaval *et al.*, 2000), de pistache (*Pistacia atlantica*) (Yousfi *et al.*, 2002) et d'argan (*Argania spinosa*) (Belarbi *et al.*, 2009 ; Sour *et al.*, 2011). Ce groupe est caractérisé par un profil en acides gras contenant d'AGMI, et la présence de l'acide linoléique. Cependant, l'huile de la feuille et de la fleur ressemblent à l'huile de lin puisqu'elles sont riches en acide α linoléique (Rallidis *et al.*, 2003).

Tableau 14. La composition moyenne en acides gras des principales huiles végétales comestibles.

	Acide palmitique	Acide stéarique	Acide oléique	Acide linoléique	Acide linoléique	Acide érucique	Références
Jujube (pulpe)	27.82	3.95	28.94	9.29	7.81	2.81	Etudiée
Jujube (racine)	35.95	11.13	15.87	16.06	3.81	5.67	Etudiée
Vulnéraire (fleur)	26.83	6.43	8.40	15.86	23.98	-	Etudiée
Vulnéraire (feuille)	23.67	5.13	3.35	10.83	36.11	-	Etudiée
Argan	22.5	6.00	52.60	18.10	0.20	-	Belarbi, 2009 ; Sour, 2011
Gland de chêne vert	16.52	4.37	60.74	17.85	traces	-	Belarbi, 2003
oléastre	9.55	2.69	74.38	8.70	0.85	-	Belarbi, 2011
olive	13.50	5.50	65.00	14.10	-	-	Linden et Lovient, 1994
arachide	10.00	3.00	60.00	22.00	3.00	-	Linden et Lovient, 1994
tournesol	8.00	5.00	20.00	65.00	1.00	-	Linden et Lovient, 1994
colza	3.00	-	15.00	15.00	9.00	-	Linden et Lovient, 1994
palme	4500.00	4.00	40.00	10.00	-	-	Linden et Lovient, 1994
noix	7.50	4.50	-	17.50	56.00	-	Linden et Lovient, 1994
soja	11.00	3.00	25.00	55.00	7.50	-	Linden et Lovient, 1994

Sur le plan nutritionnel et diététique, on remarque que les quatre huiles sont essentiellement composées d'acides gras insaturés d'isomérisation géométrique Cis et par conséquent ne présentent aucun problème de digestion ou d'assimilation par l'organisme humain (Rahmani, 2005).

Toutes les espèces végétales contiennent des composés qui peuvent être néfastes pour certains animaux ou micro-organismes, ce qui vient étayer la croyance selon laquelle les métabolites secondaires jouent un rôle primordial dans la lutte contre les maladies et les herbivores. Elles constituent une riche source de médicaments parce qu'elles produisent une foule de molécules bioactives, dont la plupart jouent probablement le rôle de défense chimique contre des prédateurs ou des agents infectieux (Cox et Balick, 1994).

Il est important de noter que les plantes médicinales peuvent être bénéfiques comme elles peuvent être néfastes, car les plantes contiennent une grande variété de composés secondaires. Il est clair que certains de ces composés, au moins à l'état pur et à certaines doses, ont des propriétés médicinales ou peuvent être toxiques. Toutefois, il ne s'ensuit pas nécessairement que les mêmes composés sont aussi toxiques ou bénéfiques lorsqu'ils se trouvent dans la plante que lorsqu'ils en sont extraits, car il peut y avoir des effets synergiques des composés chimiques dans la plante.

Les résultats obtenus montrent que parmi les différents extraits des plantes étudiées, l'extrait phénolique de pulpe de *Zizyphus lotus* représente le rendement le plus élevé (31% par rapport au poids total), suivi par l'extrait phénolique des feuilles d'*Anthyllis vulneraria* (16.60. %), fleurs d'*Anthyllis Vulneraria* (14.70%) puis racine de *Zizyphus lotus* (13.9%). Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est qu'une grandeur relative et semble être lié aux propriétés génétiques des plantes, à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage et la date de récolte, à la variété et surtout le degré de maturité, ce qui a été confirmé par les travaux de **AbiAzar (2007)**.

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des parties de plantes, un dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués. Les résultats indiquent que l'*Anthyllis Vulneraria* renferme des teneurs les plus élevées en phénols totaux à savoir: les fleurs 326.66 mg PE/g DW, feuilles 185 mg PE/g DW suivi de *Zizyphus lotus* (12.006 - 20.090 mg PE/g DW pour la pulpe et la racine respectivement). Pour les flavonoïdes, l'*Anthyllis Vulneraria* (0.11 – 0.14 mg CA/g DW) est plus riche que *Zizyphus lotus* (0.020 – 0.031 mg CA/g DW). En revanche, pour les tannins condensés, les plus grandes teneurs sont détectées pour *Zizyphus lotus* (1.560% - 1.759%). La plus forte teneur en tannins hydrolysables est observée dans le cas de la racine

Zizyphus lotus (2.34%) suivie par la fleur de l'*Anthyllis Vulneraria* (1.28%). La variabilité des teneurs en polyphénols chez ces espèces végétales est due probablement à la composition en fractions phénoliques (Hayouni *et al.*, 2007), aux facteurs génotypiques (El-Waziry, 2007), les conditions biotiques (organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (Ksouri *et al.*, 2008), à la nature du sol et le type du microclimat (Atmani *et al.*, 2009).

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés antioxydantes des deux plantes choisies. Jusqu'à présent, il n'y a pas une méthode simple et universelle par laquelle l'activité antioxydante est évaluée qualitativement et quantitativement (Prior *et al.*, 2005). Pour cette raison, nous avons utilisé quatre techniques complémentaires.

En effet, l'extrait phénolique de la pulpe de *Zizyphus lotus* révèle une capacité antioxydante totale (CAT= 0.7382 ± 0.021 mg/mg extrait) et une forte activité à inhiber l'oxydation du β -carotène (IC₅₀= $0,144 \pm 0.001$ mg/ml).

Dans notre étude, nous avons constaté que les extraits des différentes parties (racine, pulpe) de *Zizyphus lotus* exercent une activité antioxydante différente. Par conséquent, il est possible que l'activité antioxydante de *Zizyphus lotus* puisse être attribuée aux vitamines antioxydantes et les composés phénoliques présents dans *Zizyphus lotus* (Benammar *et al.*, 2010). Il est également possible que l'activité antioxydante de la pulpe soit due, en partie, à la présence de polyphénols comme ça été suggéré par Lamien-Meda *et al.* (2008). Ces chercheurs ont en outre évalué la capacité antioxydante des extraits de *Zizyphus mauritania* et ils ont finalement conclu que ce sont les polyphénols des fruits qui étaient responsables de leur propriétés antioxydantes.

Selon les résultats de l'étude de Rached *et al.* (2010), il a montré que l'extrait méthanolique des racines de *Zizyphus lotus* a une forte activité antioxydante ($9,14 \pm 0,72$ μ g/ml) comparé au BHA utilisé comme contrôle positif ($4,15 \pm 0.25$ μ g/ml).

Concernant le pouvoir antioxydant des extraits des fleurs et des feuilles d'*Anthyllis vulneraria*, on constate que les tanins des fleurs ont un pouvoir antioxydant puissant dans le piégeage du radical DPPH (IC₅₀%= 1.06 ± 0.016 mg/ml) par rapport aux extraits phénoliques des feuilles (IC₅₀%= 15 ± 0.024 mg/ml) (Ghalem *et al.*, 2012). Selon les résultats de l'étude de Godevac *et al.* (2008), l'extrait méthanolique des fleurs d'*Anthyllis vulneraria* de la Serbie, présente une faible activité ($66,45 \pm 3,49$ μ g/ml) comparer au Trolox utilisé comme contrôle positif ($0,51 \pm 0.01$ μ g/ml).

Alors que pour la phase acétate des flavonoïdes des feuilles, on note une forte capacité antioxydante totale (CAT=0.683±0.060 mg/mg extrait) et une forte activité à inhiber l'oxydation du β-carotène (IC₅₀% = 0.060±0.000mg/ml) est notée.

Pour la réduction du fer, tous les extraits (fleurs et feuilles) d'*Anthyllis vulneraria* ont une forte activité de réduire le fer à faible concentration et elles sont supérieures à celles d'acide ascorbique. La forte activité antioxydante d'*Anthyllis vulneraria* peut être due aux fortes teneurs en composés polyphénoliques (flavonoïdes, des tanins, phénols ...). Les activités antioxydantes des extraits de plantes sont principalement attribuées à des composés présents dans l'extrait. Cela peut être dû à la présence d'autres constituants ou familles de composés en petites quantités ou à une synergie entre eux et à la structure chimique surtout la position de OH, selon **Gordon (1990)**, le pourcentage d'inhibition, augmente avec la substitution des mono phénols avec le groupement hydroxyle en position ortho. La substitution du groupe hydroxyle est plus efficace qu'avec le groupement méthoxy.

En effet, Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose ou les maladies inflammatoires (**Edmond., 2003**).

L'inflammation est un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme. Cependant, elle se trouve impliquée dans un très grand nombre de pathologies humaines. D'autre part, le stress oxydant est également à l'origine de plusieurs maladies humaines allant de l'inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardiovasculaires et l'arthrite rhumatoïde. De ce fait, la recherche de substances d'origine végétale douées d'activités anti-inflammatoires et/ou antioxydantes s'avère très utile pour l'amélioration de la santé humaine tout en évitant les effets indésirables des molécules de synthèse.

Dans notre étude, nous avons essayé d'évaluer des tests de cytotoxicité des polyphénols sur la prolifération splénocytaire de rat et ses effets sur la production de NO₂ par les RAW2647 stimulés par un agent mitogène (LPS) ; cette partie *in vitro* concerne

particulièrement l'effet anti-inflammatoire des extraits phénoliques des racines, des pulpes de *Zizyphus lotus* et des feuilles, des fleurs d'*Anthyllis vulneraria*.

Les composés polyphénoliques sont connus pour leurs effets antioxydant, antimicrobien, antiviral et anticancéreux (Narayana *et al.*, 2001 ; Havsteen, 2002). Bien qu'elles soient efficaces.

En ce qui concerne la toxicité des extraits phénoliques de plantes étudiées, les résultats obtenus montrent qu'en présence des extraits phénoliques de la pulpe, la racine de *Zizyphus Lotus* et la fleur, la feuille d'*Anthyllis vulneraria* à des concentrations de 31.25-1 mg/ml, la prolifération splénocytaire est stimulée puisque les indices de proliférations sont significativement augmentés. Par contre, la prolifération cellulaire est nettement réduite à partir de la concentration 10 mg/ml pour les différents extraits de plantes étudiées.

Ces résultats montrent que les extraits phénoliques utilisés ne présentent aucune toxicité à des concentrations de 31.25-1000 µg /ml cependant une concentration supérieure de 10 mg/ml les indices de prolifération sont diminués significativement, celle-ci peut être une dose toxique.

Il importe de noter qu'une étude faite par Abdel-Zaher *et al.* (2005) a souligné une LD₅₀ (3820 mg/kg) d'extrait butanolique des feuilles de *Zizyphus spina-christ*.

Nos résultats sont en accord avec Borgi *et al.* (2008) qui ont testé la cytotoxicité des extraits aqueux et méthanolique des feuilles de *Zizyphus lotus* sur les RAW 2647 et ils ont montré que ces extraits n'étaient pas toxiques avec des concentrations élevées.

En effet, le test de la toxicité des extraits phénoliques des plantes étudiées servira à déterminer la dose adéquate pour évaluer le pouvoir anti-inflammatoire de ces extraits. Pour cela, on a dosé le NO₂ libéré par les monocytes (RAW2647) en présence ou absence d'un agent mitogène (LPS) et en présence des extraits phénoliques de la pulpe, la racine de *Zizyphus lotus* et la feuille et la fleur d'*Anthyllis vulneraria*.

La quantification du NO est délicate du fait de sa demi-vie très courte (quelques secondes) consécutive à son caractère labile, et de sa présence en faible quantité dans les milieux biologiques (Davies *et al.*, 1995). Pour ces raisons, la formation du NO est classiquement évaluée de manière indirecte dans les milieux biologiques, par la détermination des concentrations de nitrites (NO₂⁻) et de nitrates (NO₃⁻), qui constituent les produits de

dégradation oxydative du NO. En effet, le NO réagit rapidement avec des molécules telles que l'oxygène ou l'anion superoxyde pour donner des nitrites et des nitrates (**Grand et al., 2001**).

Le monoxyde d'azote (NO) est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que vasodilatation, régulation de la tension artérielle, neurotransmission et réactions inflammatoires et immunitaires. Il joue également un rôle important au cours de processus pathologiques durant lesquels sa concentration augmente dans l'inflammation (**Valko et al., 2007**). Mais à forte concentration, le NO devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le O₂ pour former un puissant oxydant le peroxyde d'azote (ONOO[·]) qui peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le NO₂ et le OH[·] (**Densiov et Afanas • fev, 2005**).

Les résultats obtenus montrent qu'en présence d'extraits phénoliques de la pulpe et la racine de *Zizyphus lotus* dans les cultures de RAW 2647 à faibles concentrations (0.25- 0.5 mg/ml), la libération de NO₂ est significativement réduite comparée aux proliférations basales. On peut déduire que l'extrait phénolique a un pouvoir anti-inflammatoire.

Borgi et al. (2007) ont montré que l'extrait des écorces de la racine administré par voie intrapéritonéale, montre un effet anti-inflammatoire et analgésique dans l'œdème de la patte induite par la carragénine chez le rat. **Benammar et al. (2010)** affirme que des extraits aqueux de différentes parties du *Zizyphus lotus* exercent un potentiel thérapeutique certain, puisqu'ils possèdent des propriétés antioxydantes et immunosuppressive. Une autre étude a montré qu'un mélange de plantes de la médecine chinoise contenant de *Zizyphus jujube* exerce un effet immunomodulateur (**Chan et al., 2006**). **Adhvaryu et al. (2007)** ont également observé que les extraits de *Zizyphus lotus* exercent des effets immunomodulateurs chez les rongeurs. En effet, il s'est avéré que les extraits de *Zizyphus lotus* possèdent des propriétés anti-inflammatoires (**Baytop ,1984**). Les résultats ont démontré que *Zizyphus lotus* a un effet inhibiteur de la production de NO (**Borgi, 2008**).

La vulnéraire présente des vertus dépuratives, astringentes, diurétiques, cicatrisantes et anti-inflammatoires. Elle est également efficace pour soigner les plaies et la digestion (**Menkovic et al., 2011**). Les résultats montrent qu'en présence d'extrait phénolique des fleurs d'*Anthyllis vulneraria* à faibles concentrations (0.25- 0.5 mg/ml), la libération de NO₂ est significativement réduite, et en présence d'extrait phénolique des feuilles d'*Anthyllis vulneraria* à faibles concentrations (0.25- 1 mg/ml), la libération de NO₂ est significativement réduite comparée aux proliférations basales.

Une explication possible de la réduction de la concentration de NO₂ est liée à sa richesse en polyphénols et son pouvoir antioxydant. De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**Da Silva *et al.*, 1994 ; Galati *et al.*, 1994 ; Middleton, 1996**).

Les polyphénols sont des antioxydants les plus abondants dans le régime humain et sont des constituants répandus de fruits et de boissons, comme le thé, le café (**Landete, 2012**). Ils représentent plusieurs classes, comme les acides phénoliques, les proanthocyanidines et des flavonoïdes (**Beecher, 2003**). Les études épidémiologiques, cliniques et animales confirment le rôle des polyphénols dans la prévention de diverses maladies chroniques, y compris les maladies cardiovasculaires, les maladies inflammatoires et métaboliques, maladies neurodégénératives et certains cancers (**Middleton *et al.*, 2000; Mitjavila et Moreno, 2012**).

Nous pouvons affirmer que les polyphénols des différents extraits sont responsables des propriétés antioxydante et anti-inflammatoire.

**Partie in vivo : Effets
antioxydants et anti-
inflammatoires de
Zizyphus lotus chez le
rat « Wistar ».**

Matériels & Méthodes

I. Choix des animaux

Dans ce travail, nous avons utilisé des rats blancs (*Rattus norvegicus*) variété *Wistar* de sexe femelle âgée entre quatre et six semaines ayant un poids de 110 ± 21 g.

Les rates (de l'institut Pasteur, Alger) sont maintenues dans les conditions favorables d'élevage; température (25 à 30°C), taux d'humidité entre 60 et 70% et une photopériode de 12 heures le jour et 12 heures la nuit.

Ces rats sont ensuite répartis en 3 lots homogènes en âge et en poids (N=5). (**Figure 27**)

II. Préparation des régimes

Ces 15 rates reçoivent pendant trois mois d'expérimentation des régimes dont les principales unités prises en compte pour la détermination des régimes alimentaires sont l'énergie, les protéines, les éléments minéraux, les vitamines et les fibres.

Régime témoin : lot des rats témoins consommant ce régime à base de 20% de caséine+0.3% de méthionine+5% de cellulose pendant 3 mois.

Régime hypergras : lot des rats hypergras consommant un régime à base 20% de caséine+17% de graisse animale+ 1% de cholestérol+ 0.3% de méthionine+5% de cellulose pendant 3 mois.

Régime hypergras+ pulpe : ces animaux consomment ce régime à base de 19% de caséine +17% de graisse animale+ 1% de cholestérol+ 0.3% de méthionine+50% de la pulpe de *Zizyphus lotus* pendant 3 mois. (**Tableau 15**).

Le poids corporel des rates est mesuré quotidiennement ainsi que la glycémie hebdomadaire à partir de la veine caudale à l'aide d'un glucomètre tout au long de l'expérimentation.

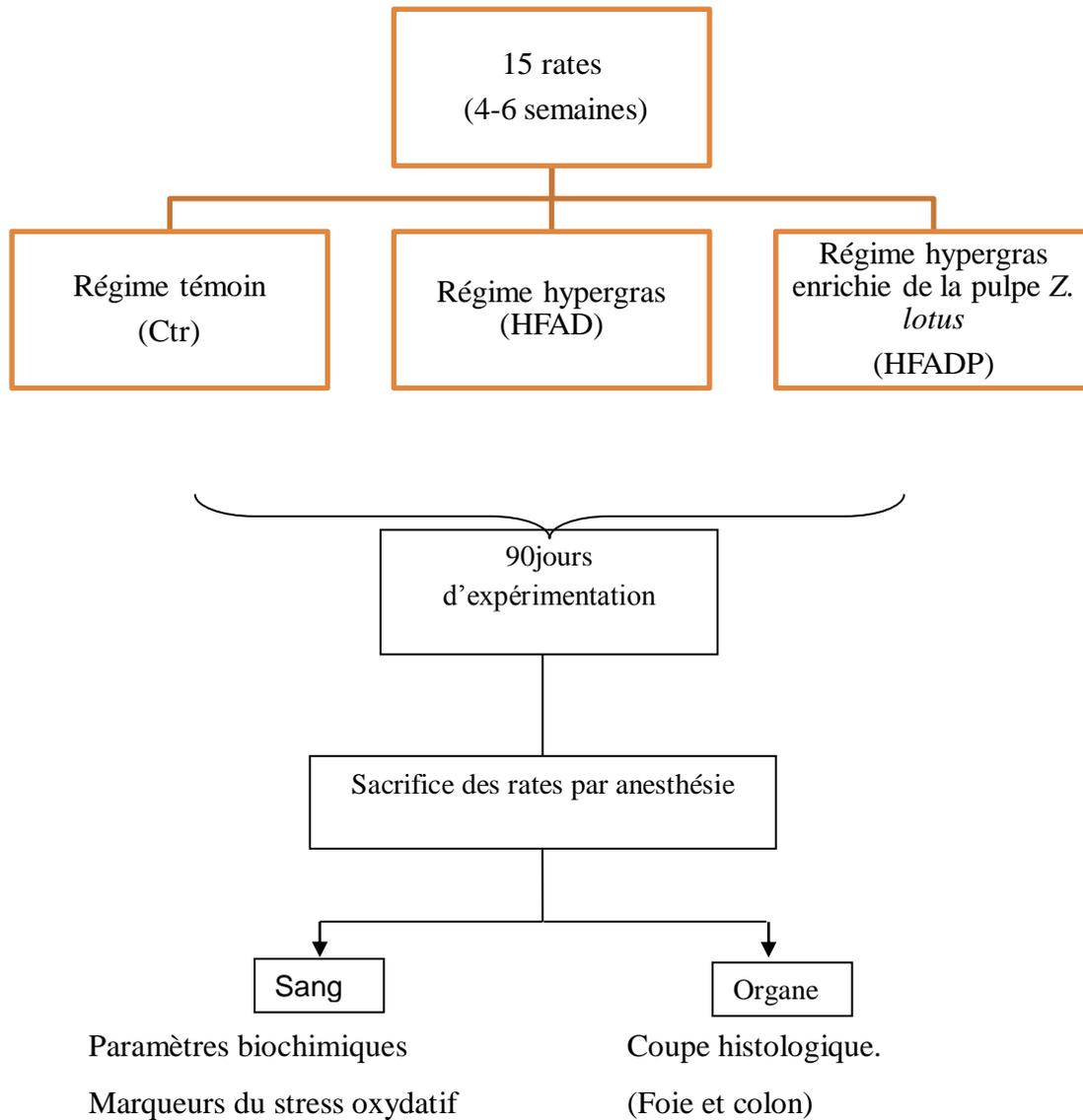


Figure 27. Protocole expérimental

Tableau 15. Composition des régimes témoins et expérimentaux en pourcentage pondéraux

Ingrédients % du total	Régime témoin % pondéral	Régime hypergras % pondéral	Régime hypergras + pulpe % pondéral
Caséine	20	20	19
Amidon	15	11.3	10
Saccharose	50.2	37	2
Cellulose	5	5	3.45
Huile de tournesol	5	3	2.25
Graisse animale	-	17	17
Sel minéraux	3.5	4.2	2
Vitamines	1	1.2	0.36
Cholestérol	-	1	1
Pulpe de <i>Z.lotus</i>	-	-	46
Méthionine	0.3	0.3	0.3

III. Dosage des paramètres sanguins

Tous les rats de chaque lot en fin de l'expérimentation sont anesthésiés au pentobarbital sodique à 6,5% (0,1 ml par 100g de poids corporel), après 12h de jeûne, et le sang est prélevé après incision abdominale par ponction dans l'aorte. Une quantité de sang prélevée est récupérée dans des tubes à EDTA, hépariné et à des tubes secs.

Les échantillons prélevés sur tubes EDTA et hépariné sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 15 min. Le plasma est prélevé pour le dosage des paramètres biochimiques et du statut oxydant/antioxydant.

III.1. Dosages des paramètres biochimiques

III.1.1. Dosage des triglycérides plasmatique

Il s'agit d'une méthode colorimétrique enzymatique (Kit PROCHIMA). Les triglycérides plasmatiques sont déterminés après hydrolyse enzymatique en présence d'une lipase.

L'indicateur est la quinoneimine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, de 4-aminoantipyrine et de 4-chlorophénol sous l'action catalytique de la peroxydase. La

concentration est déterminée à une longueur d'onde de 500 nm et est exprimée en g/l. La concentration en quinoneimine obtenue est proportionnelle à la quantité de triglycérides présente dans le plasma.

III.1.2. Dosage du cholestérol plasmatique

Le cholestérol du plasma est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique (**Kit PROCHIMA**). Les esters de cholestérol sont hydrolysés par le cholestérol ester hydrolase en cholestérol libre et acides gras. Le cholestérol libre, produit et celui préexistant, est oxydé par une enzyme cholestérol oxydase en $\Delta 4$ cholesterone et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier en présence de peroxydase oxyde le chromogène en un composé coloré en rouge. La concentration quinoneimine colorée mesurée à 500 nm est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol obtenu dans le plasma et est exprimée en g/L.

IV.2. Détermination de quelques paramètres du statut oxydant/antioxydant

IV.2.1. Détermination du taux d'hydroperoxydes plasmatiques

Les hydroperoxydes plasmatiques sont mesurés par l'oxydation d'ions ferriques utilisant le xylénol orange en conjugaison avec le ROOH réducteur spécifique de la triphenylphosphine (TPP), selon la méthode de **Nourooz-Zadeh et al. (1996)**. Cette méthode est basée sur une peroxydation rapide transformant le Fe^{2+} en Fe^{3+} en milieu acide. Les ions Fe^{3+} en présence du xylénol orange [(O-cresolsulfonphtalein-3',3''-bis (methyliminodiacetic acid sodium)], forment un complexe Fe^{3+} -xylénol orange.

IV.2.2. Dosage du malondialdéhyde plasmatique (MDA)

La méthode de **Nourooz-Zadeh et al. (1996)**, est considérée comme étant une méthode simple, rapide et sensible permettant l'évaluation de la peroxydation des lipides des tissus animaux.

IV.2.3. Détermination des protéines carbonylées plasmatiques

Les protéines carbonylées du plasma (marqueurs de l'oxydation protéique) sont mesurées par la réaction au 2,4- dinitrophénylhydrazine selon la méthode de **Levine et al. (1990)**.

IV.2.4. Dosage des enzymes antioxydantes

IV.2.4.1. Dosage de l'activité de la Catalase

Cette activité enzymatique est mesurée par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (**Aebi, 1974**). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H_2O_2 en fonction du temps.

IV.2.4.2. Dosage de l'activité du superoxyde dismutase (SOD) (kit SIGMA)

Le superoxyde dismutase (SOD) c'est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène moléculaire, est l'une des enzymes antioxydantes les plus importantes. Afin de déterminer l'activité SOD, plusieurs méthodes directes et indirectes ont été développées. Parmi ces méthodes, une méthode indirecte utilisant nitroblue tétrazolium (NBT) est couramment utilisée en raison de sa commodité et sa facilité d'utilisation.

IV.2.4.3. Dosage de l'activité du glutathion réductase (kit SIGMA)

Le dosage est basé sur la réaction du groupement thiol du glutathion avec l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque après action de la glutathion réductase en présence de NADPH. Cette technique spectrophotométrique permet d'une part, le dosage du glutathion total et d'autre part, celui du glutathion oxydé (disulfure), après blocage du glutathion réduit par la 2-vinylpyridine.

IV.2.4.4. Dosage de l'activité du glutathion peroxydase (kit SIGMA)

Toutes les techniques décrites reposent sur le même principe : en présence de glutathion réduit (GSH), la glutathion peroxydase réduit un hydroperoxyde (ROOH), tandis que GSH est oxydé en glutathion disulfure (GSSG). Les premières méthodes mesuraient à des temps fixes le glutathion non consommé. Actuellement, les techniques les plus utilisées sont des techniques indirectes : la vitesse d'oxydation du GSH est mesurée en suivant la décroissance du NADPH consommé pour la réduction du GSSG par la glutathion réductase en excès (GR). Ce dosage en continu permet de maintenir constante la concentration du GSH dans le mélange réactionnel.

V. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart type. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro-Wilk), la comparaison des moyennes entre les cinq groupes de rats (CTR, HFAD, HFADP) est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer les moyennes deux à deux. Cette analyse est réalisée grâce à un logiciel STATISTICA, version 4.1 (STATSOFT, TULSA, OK). Les différences sont considérées significatives à $P < 0,05$.

VI. Analyse histologique

L'histologie est l'étude de l'anatomie microscopique des tissus et des cellules. Nos coupes ont été réalisées sur deux organes (foie et colon) au centre régional vétérinaire à Mostaganem sous la direction de **Dr T. BENMAHDI**.

VI.1. Préparation des coupes histologiques

Les coupes s'effectuent en trois étapes principales:

•Fixation

Consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenues dans les lysosomes cellulaires. Les fixateurs les plus utilisés sont le liquide de Bouin et le formol à 10% ; cette étape dure 5 à 15 jours, elle dépend de l'épaisseur du prélèvement.

•Inclusion

Cette étape permet d'imprégner les tissus par un matériel inerte qui durcit pour obtenir des blocs homogènes renfermant des organes ou des fragments d'organes.

❖ Déshydratation

Un lavage rapide à l'eau du robinet éliminera l'excès de fixateur. Les tissus humides ne peuvent pas être directement infiltrés par la paraffine. En premier lieu, l'eau devra être retirée des tissus par la déshydratation. Cela est habituellement réalisé par passage dans une série de bains d'alcool (éthanol ou butanol) aux gardiens ascendants : 70°C – 95°C -100°C généralement deux suffisent pour bien gérer le stock d'alcool.

❖ Clarification

Celle-ci consiste à extraire le déshydratant et le remplacer par une substance miscible avec la paraffine ce qui rend les organes plus transparents. Elle repose sur deux passages au chloroforme. Deux passages sont nécessaires : Le premier bain se compose de 50% chloroforme et 50% Alcool et le second est réalisé par du chloroforme pur.

❖ L'imprégnation

Elle consiste à imprégner le tissu à chaud par une paraffine dont le point de fusion est de l'ordre de 54 – 56°C.

❖ L'enrobage

Elle consiste à mettre les organes dans un bloc de paraffine refroidie.

•Préparation de la coupe

Une fois le bloc de tissu paraffine congelé, il nécessite d'être réduit en coupes microscopiques qui devront être collées sur lames. Cela est réalisé grâce à un microtome. Une

épaisseur de 5 μm des coupes permet aux rayons lumineux de microscope de traverser les prélèvements et d'éviter les superpositions tissulaires.

- **Coloration à l'hématoxyline et éosine**

Le fait de colorer les coupes permet de mettre en évidence les structures tissulaires et cellulaires. La coloration standard la plus utilisée est la coloration Hématoxyline –Eosine (H.E). Le but de la coloration bio-chromique est d'associer un colorant nucléaire et un colorant cytoplasmique.

Résultats & Interprétations

I. Evolution de la prise du poids corporel chez les rates

Au début de l'expérimentation, les rates utilisées dans cette étude sont de poids homogènes (110 ± 21 g) et reçoivent pendant trois mois les différents régimes : contrôle (Ctr), hypergras (HFAD), hypergras enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFAD P) (**Figure 27**).

Au début de l'expérience et dès le lancement du régime, les rates nourries au régime hypergras (HFAD) présentent un gain du poids hautement significatif ($p < 0,0001$) par rapport aux contrôles (Ctr) et par rapport aux rates nourries au régime hypergras enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFAD P) (**Figure 28**).

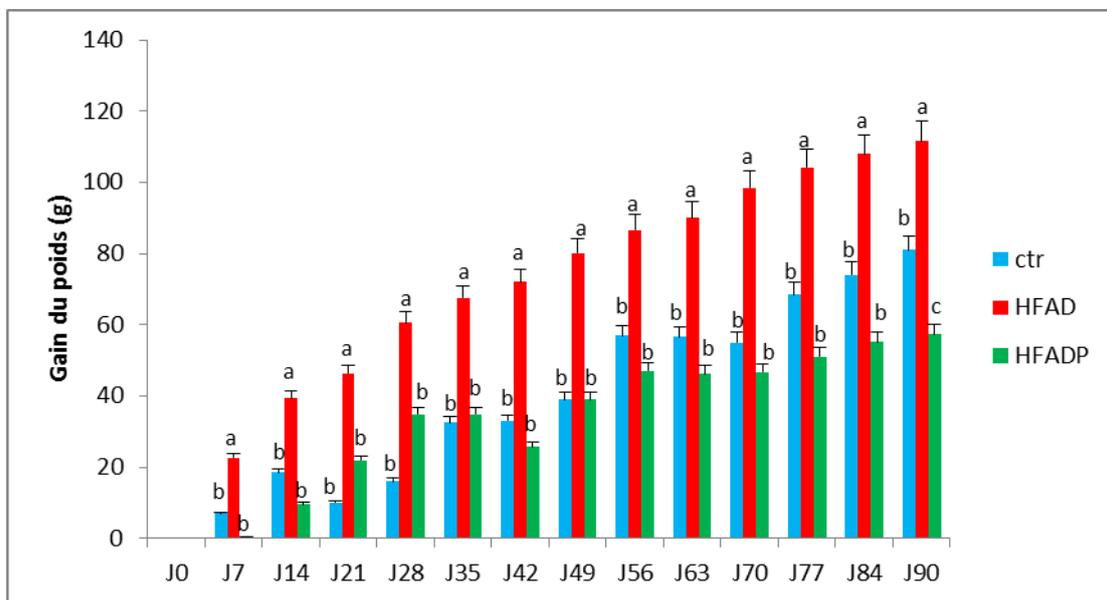


Figure 28. Gain du poids corporel (g) chez les rates témoins et expérimentales.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, $n=5$. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P < 0.05$).

II. Etude biochimique

II.1. évolution de la glycémie

La figure 29 représente l'évolution de la glycémie chez les 3 lots pendant une durée de trois mois. Les valeurs moyennes de la glycémie sont exprimées en (g/l), une différence significative entre les trois groupes étudiés est notée.

Nos résultats montrent une diminution hautement significative chez les rates nourries d'un régime hypergras enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFAD P) comparés aux rates nourries d'un régime hypergras (HFAD) et aux rates nourries d'un régime standard (Ctr).

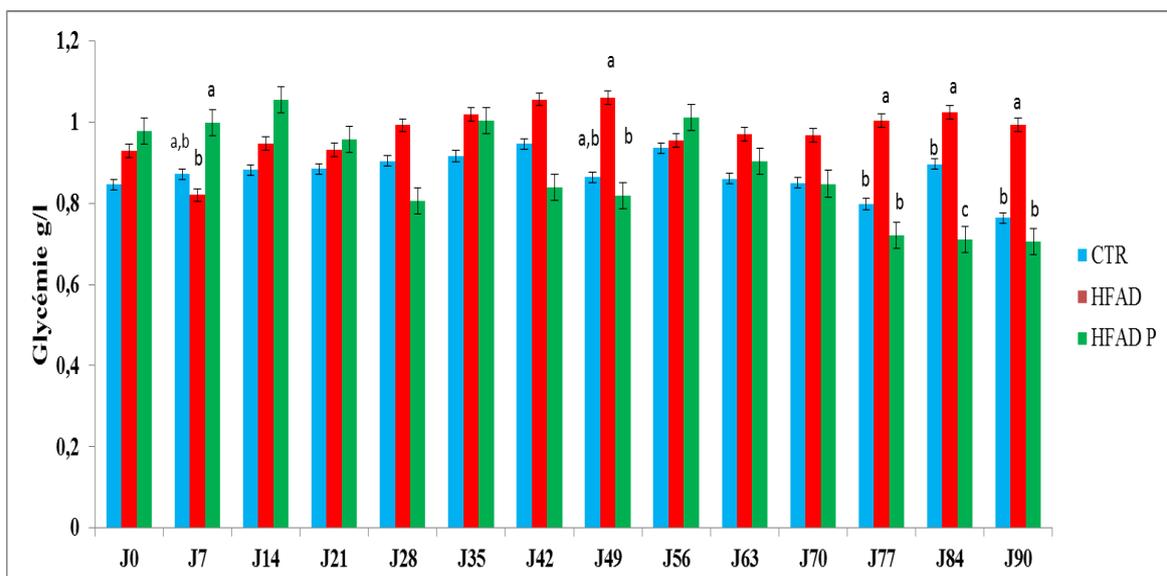


Figure 29. Évolution de la glycémie (g/L) chez les rates témoins et expérimentales.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, n=5. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P < 0.05$).

II.2. Teneur plasmatique en cholestérol totale

Nos résultats montrent une augmentation significative chez les rates recevant le régime hypergras (HFAD) et le régime hypergras enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* comparés aux témoins (Ctr) cependant aucune différence n'est notée entre les deux régimes hypergras (HFAD, HFADP) (**Figure 30**).

II.3. Teneur plasmatique en triglycérides

Une diminution significative en teneur plasmatique en triglycérides est constatée chez les rates nourries aux régimes enrichis de la pulpe de *Zizyphus lotus* (HFAD P) comparé aux autres régimes (HFAD, Ctr) (**Figure 31**).

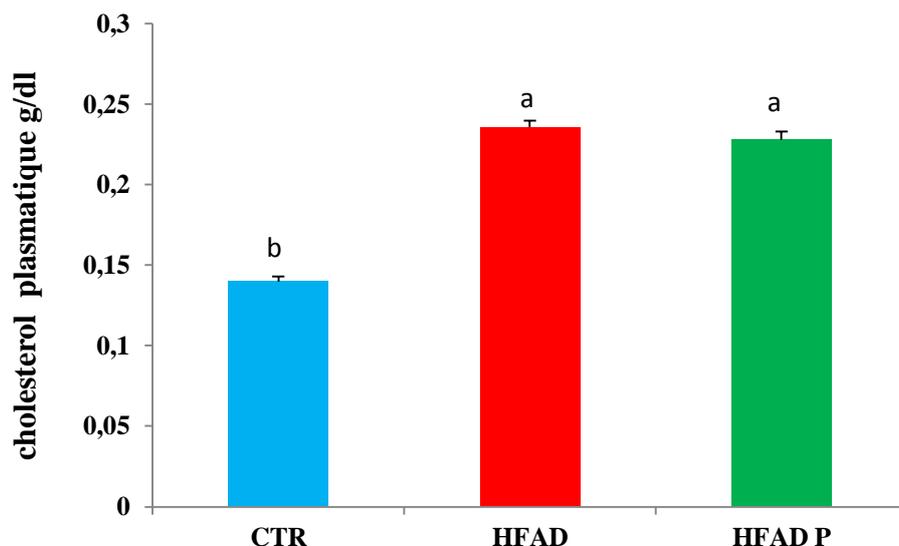


Figure 30. Teneur plasmatique en cholestérol totale (g/dl) chez les rates témoins et expérimentales. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, n=5. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P < 0.05$).

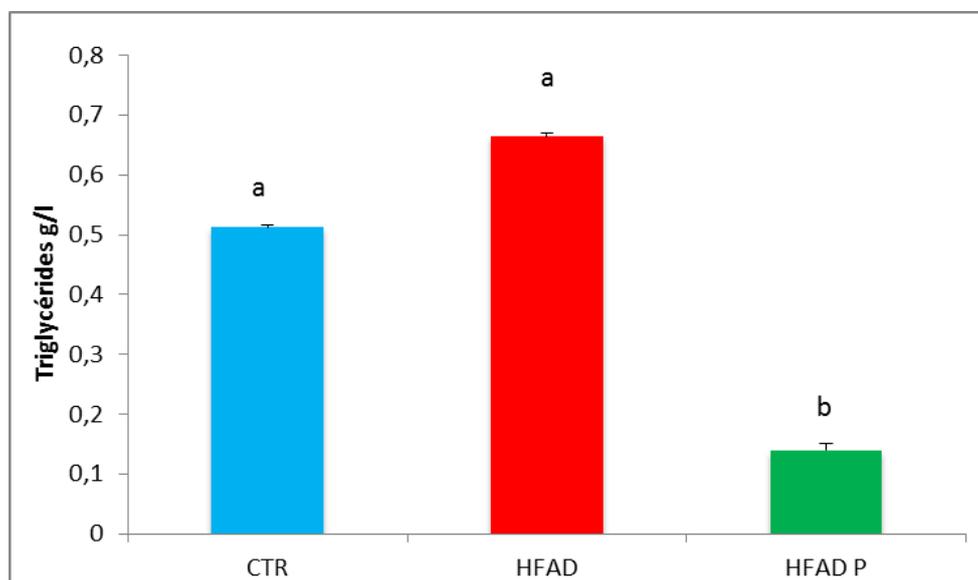


Figure 31. Teneur plasmatique en triglycérides (g/L) chez les rates témoins et expérimentales. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, n=5. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P < 0.05$).

III. Statut oxydant/antioxydant

III.1. Teneurs en glutathion peroxydase plasmatique

L'activité de la glutathion peroxydase augmente significative ($p < 0.001$) chez les rates recevant le régime enrichi de la pulpe de *Zizyphus lotus* (HFADP) comparé aux régimes témoins (Ctr) et hypergras (HFAD) (**Figure 32**).

III.2. Teneur en glutathion réductase plasmatique

Le régime enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFADP) augmente significativement l'activité de la glutathion réductase comparé aux régimes témoins (Ctr) et hypergras (HFAD) (**Figure 33**).

III.3. Teneur en catalase plasmatique

Les teneurs plasmatiques en catalase sont significativement différentes chez les différents groupes. On note une diminution de l'activité de catalase chez les rates recevant le régime hypergras enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFADP) par rapport aux rates recevant le régime hypergras (HFAD) et aux témoins (Ctr) (**Figure 34**).

III.4. Teneur en superoxyde dismutase (SOD) plasmatique

Pour les différents groupes, les valeurs obtenues concernant les teneurs en SOD ne présentent aucune variation significative (**Figure 35**).

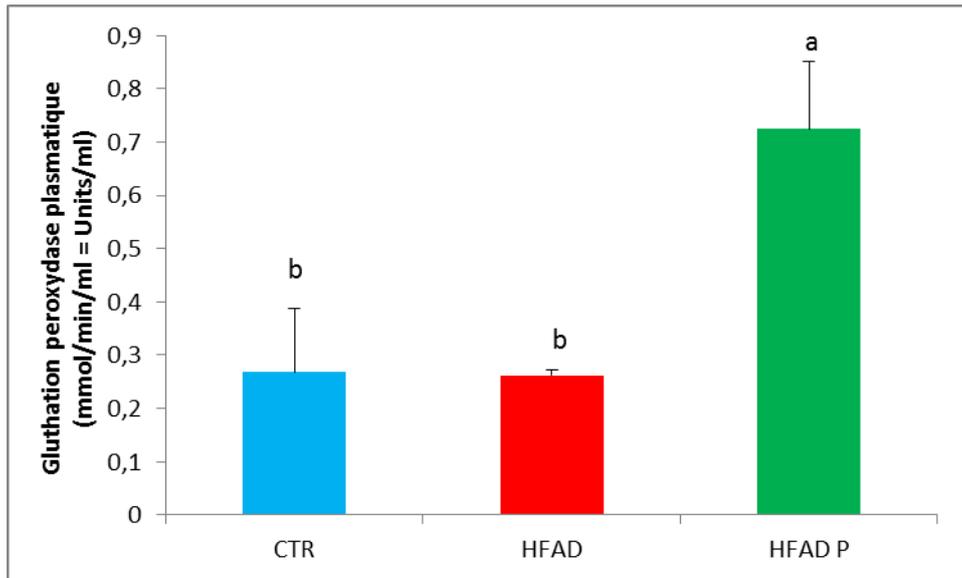


Figure 32. Teneur plasmatique en glutathion peroxydase (mmol/min/ml) chez les rates témoins et expérimentales. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, n=5. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P < 0.05$).

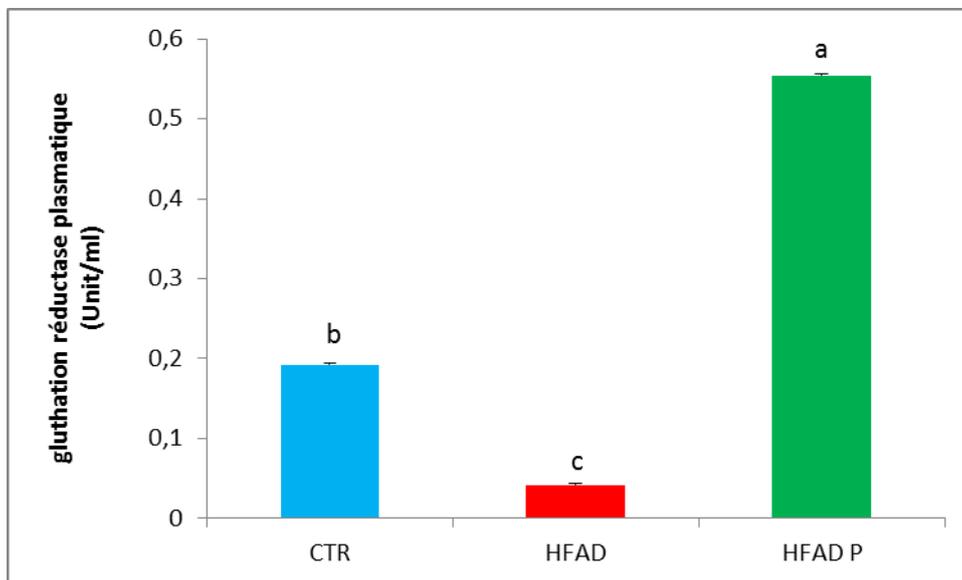


Figure 33. Teneur plasmatique en glutathion réductase (Unit/ml) chez les rates témoins et expérimentales. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, n=5. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P < 0.05$).

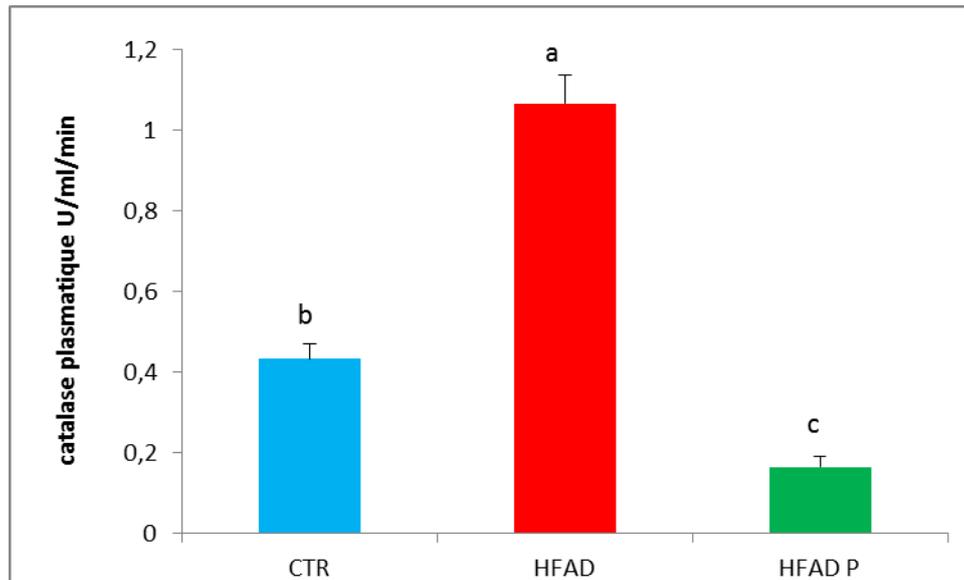


Figure 34. Teneur plasmatique en catalase (U/ml/min) chez les rates témoins et expérimentales. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, n=5. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P < 0.05$).

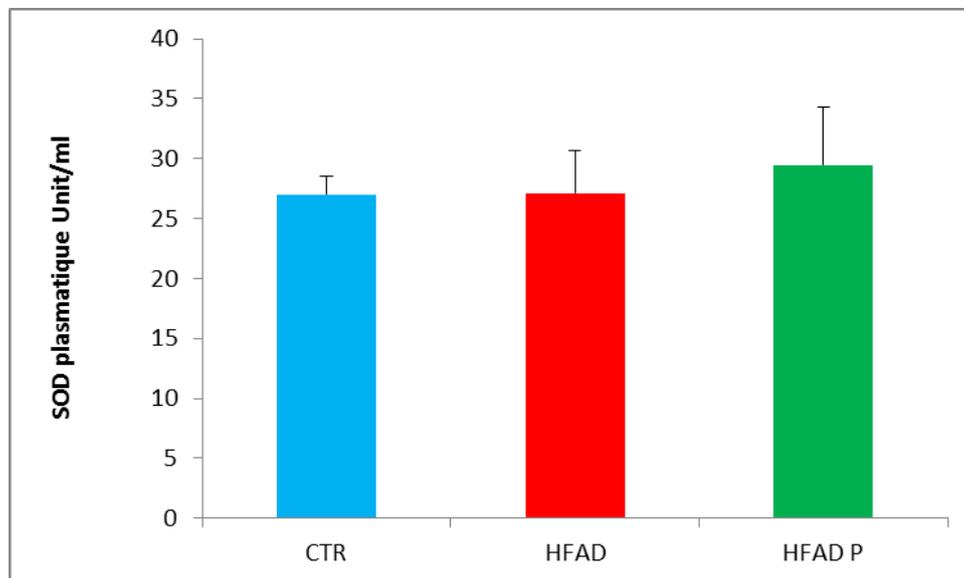


Figure 35. Teneur plasmatique en SOD (U/ml) chez les rates témoins et expérimentales. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, n=5. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P < 0.05$).

III.5. Teneurs plasmatiques en hydroperoxydes

Les teneurs plasmatiques en hydroperoxydes sont significativement différentes chez les rates expérimentales.

Chez les rates recevant le régime enrichi en graisse animale et en cholestérol (HFAD) et les rates recevant le régime enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFADP), les teneurs plasmatiques en hydroperoxydes sont significativement augmentées par rapport à leurs témoins (Ctr) (**Figure 36**).

III.6. Teneurs plasmatiques en Malondialdéhyde (MDA)

Chez les rates recevant le régime enrichi en graisse animale et en cholestérol (HFAD) et les rates recevant le régime enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFADP), les teneurs plasmatiques en Malondialdéhyde sont significativement augmentées par rapport à leurs témoins (Ctr) (**Figure 37**).

III.7. Teneurs plasmatiques en Protéine carbonylées

Les protéines carbonylées plasmatiques montrent aucune différence significative, malgré une diminution chez les rates recevant le régime enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFADP) comparés aux rates recevant le régime enrichi en graisse animale et en cholestérol (HFAD) (**Figure 38**).

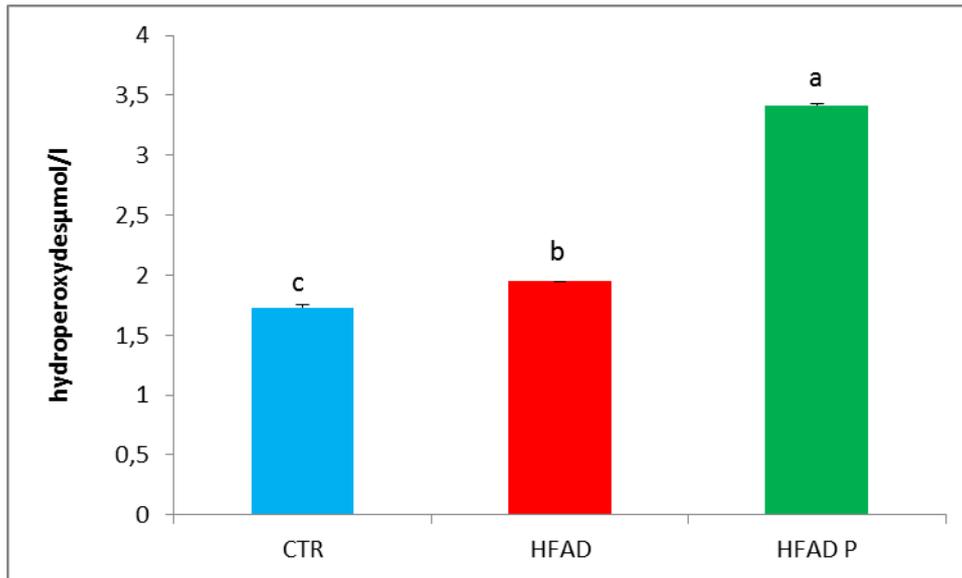


Figure 36. Teneur plasmatique en hydroperoxydes ($\mu\text{mol/l}$) chez les rates témoins et expérimentales. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, $n=5$. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P<0.05$).

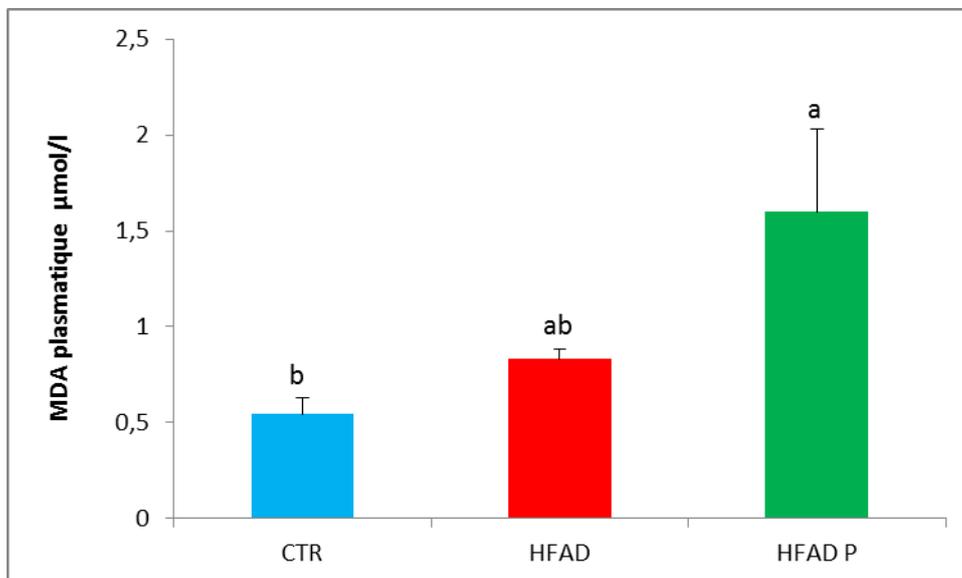


Figure 37. Teneur plasmatique en Malondialdéhyde ($\mu\text{mol/l}$) chez les rates témoins et expérimentales. . Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, $n=5$. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P<0.05$).

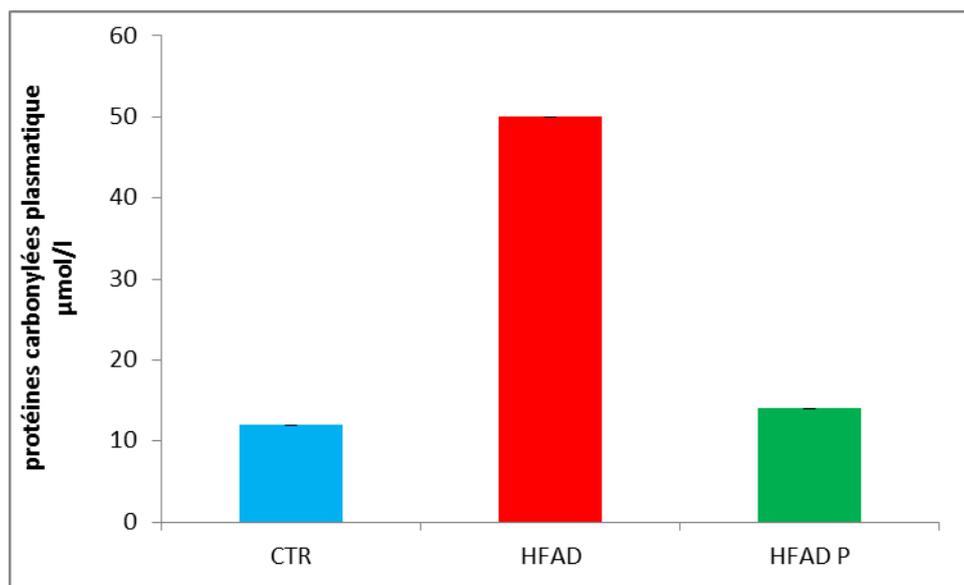


Figure 38. Teneur plasmatique en Protéines carbonylées ($\mu\text{mol/l}$) chez les rates témoins et expérimentales. . Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM, $n=5$. Ctr : rates nourrie d'un régime standard, HFAD : rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale et du cholestérol, HFAD P : rates nourries d'un régime enrichie en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*. Après vérification de la distribution normale des variables (test Shapiro- Wilk), la comparaison des moyennes entre les trois groupes de rates est effectuée par le test ANOVA à un facteur. Cette analyse est complétée par le test de Tukey afin de classer et comparer les moyennes deux à deux. Les moyennes indiquées par des lettres différentes (a, b, c,...) sont significativement différentes ($P<0.05$).

IV. Analyse histologique

L'étude microscopique des tissus, permettant de comprendre leur fonctionnement, et de connaître leur structure, afin d'y découvrir éventuellement certaines anomalies. L'interprétation des coupes histologique elle été réalisé au niveau de CHU de Tlemcen sous la direction **Dr KARA**.

Le tableau en dessous représente le poids relatif (g/100g) des organes des rates témoins et expérimentales

Tableau 16. Poids relatif (g/100g) des organes des rates témoins et expérimentales

	Foie	Colon	Reins	Tissus adipeux
Ctr	4.82±1.34	0.68±0.63	0.78±0.08	2.78±0.64
HFAD	4.30±2.65	0.52±0.45	0.81±0.34	6.34±3.50
HFADP	4.97±2.11	0.62±0.08	0.59±0.10	6.19±2.65

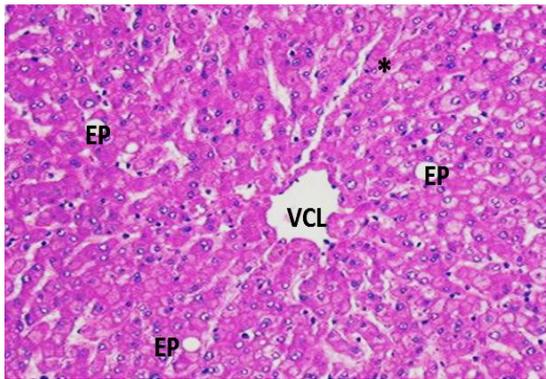
Notre étude a ciblé deux organes à savoir le foie et le colon.

•Foie

Après l'étude histologique les résultats obtenus comparé au contrôle (ctr) (**Figure 39**) sont résumé dans le tableau 17.

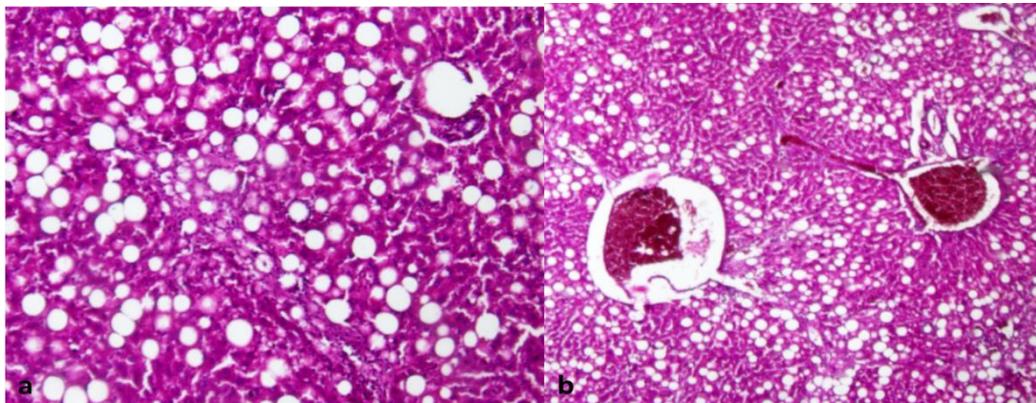
Tableau 17. Interprétation de l'étude histologique du foie des rates de différents lots.

Groupe	Histologie du foie
CTR	Parenchyme hépatique sain
HFAD	Stéatose macro-vésiculaire importante avec une fibrose et une inflammation chronique, congestion vasculaire (Figure40).
HFADP	Stéatose mixte intéressant tous le parenchyme hépatique, fibrose.de très rare lymphocyte aux niveaux des capillaires sinusoides (Figure41).



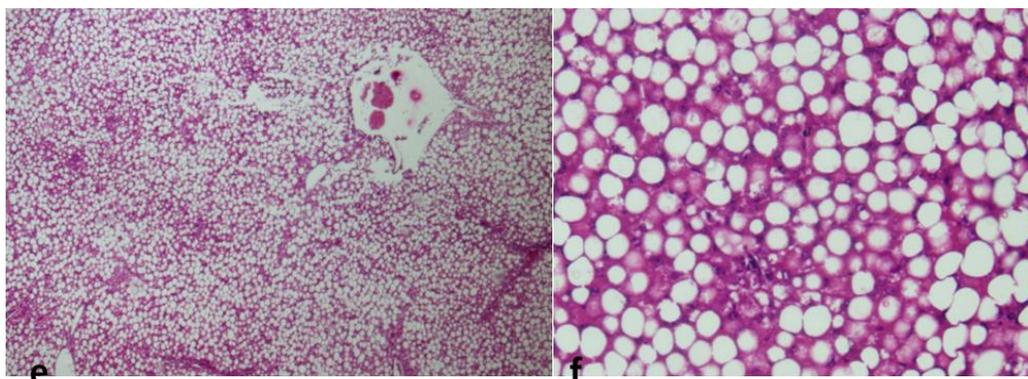
* : Parenchyme hépatique
 EP: Espace porte
 VCL: Veine Centro lobulaire

Figure 39. Coupe histologique du foie des rates contrôles (x100)



a: stéatose macro-vésiculaire , inflammation chronique, fibrose (x 200)
b: congestion vasculaire (x 100)

Figure 40. Le parenchyme hépatique des rates recevant le régime enrichi en graisse et en cholestérol HFAD.



e: parenchyme hépatique (x40).
f : stéatose (x 200).

Figure 41. Le parenchyme hépatique des rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*(HFADP).

- **Colon**

Les fonctions essentielles du colon consistent en la récupération d'eau à partir du résidu liquidien de l'intestin grêle et l'évacuation des déchets alimentaires.

Sur le plan histologique le colon est formé d'une paroi regroupant cinq tuniques concentriques. De l'intérieur vers l'extérieur, on distingue ainsi : La muqueuse, la sous muqueuse, la musculaire muqueuse, la musculeuse, la séreuse. (**Figure 42**).

Après l'analyse histologique les résultats obtenus comparé au contrôle (ctr) (**Figure 42**) sont résumé dans le tableau 18.

Tableau 18. Interprétation de l'étude histologique du colon des rates de différents lots

Groupe	Histologie du colon
CTR	Paroi colique saine (Figure 42).
HFAD	Paroi colique détruite par une dense réaction inflammatoire avec une diminution de la mucosécrétion de quelques glandes (Figure43).
HFADP	Aspect normal, la paroi colique comprend les cinq couches (muqueuse, la sous muqueuse, musculaire muqueuse, musculeuse et la séreuse) (Figure 44).

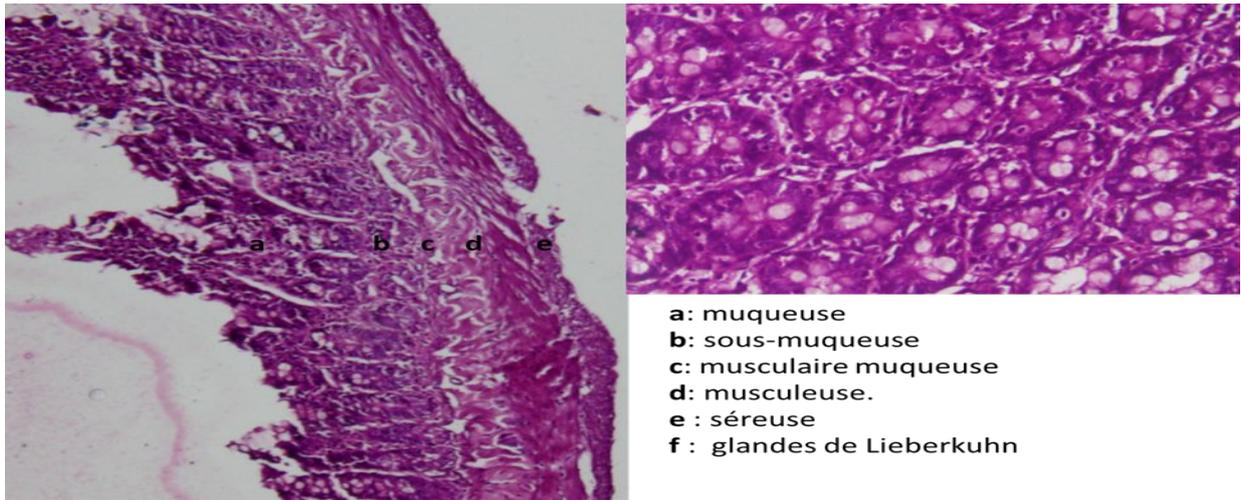


Figure 42. Coupe histologique du colon des rates contrôles

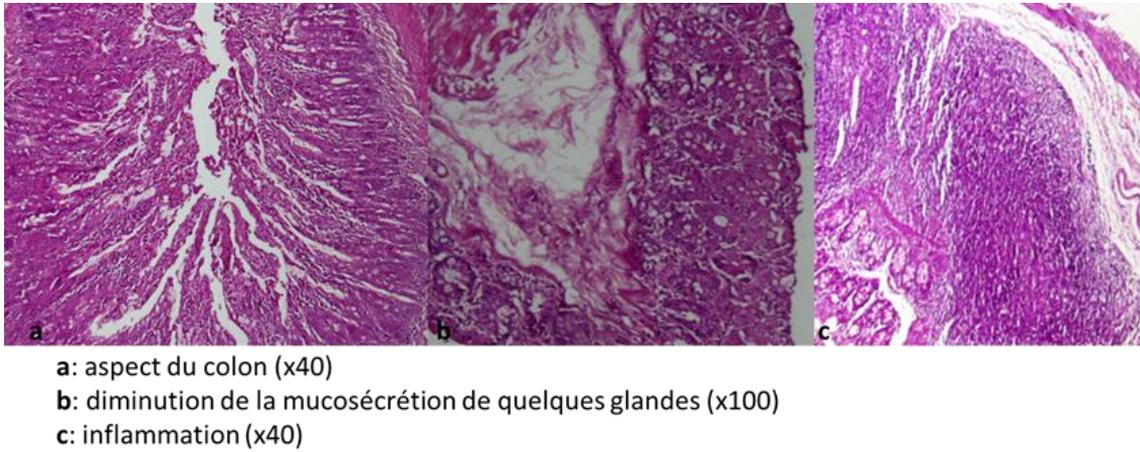


Figure 43. Coupe histologique du colon des rates recevant le régime enrichi en graisse et en cholestérol HFAD

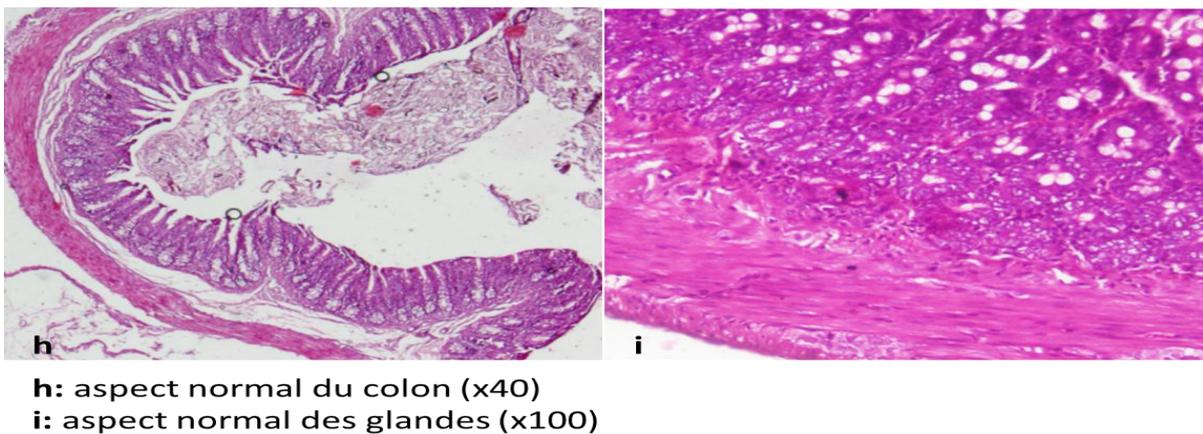


Figure 44. Coupe histologique du colon des rates nourries d'un régime enrichi en graisse animale, du cholestérol et en pulpe de *Zizyphus lotus*(HFADP).

Discussion

La prévalence de l'obésité progresse régulièrement depuis plusieurs années. Cette pathologie, caractérisée par une accumulation de graisses au niveau du tissu adipeux viscéral et sous-cutané, est également associée à un état inflammatoire chronique de faible intensité, se traduisant notamment par une augmentation significative des taux circulants de différentes cytokines pro-inflammatoires : Tumor necrosis factor α (TNF α), d'Interleukin 6 (IL-6) ainsi que des niveaux circulants de plusieurs marqueurs de l'inflammation : (CRP, fibrinogène, sérum amyloïdes, etc.) (Vidal, 2003). Ces modifications physiopathologiques peuvent être à l'origine de maladies cardiovasculaires, de dyslipidémie ou de l'insulinorésistance associée à l'obésité (Gouranton, 2007).

En effet, dans le cas de l'insulinorésistance, il a été montré que le développement du tissu adipeux et la modulation de l'expression des adipokines qui en résultent, ont un rôle fondamental dans la genèse de cette affection. Ainsi, le tissu adipeux et l'adipocyte en particulier, longtemps considéré comme un simple site de stockage de lipides, apparaissent aujourd'hui comme un tissu endocrine capable de moduler la sensibilité à l'insuline par le biais de son secrétome (Gouranton, 2007).

Chez les sujets obèses, un état de stress oxydant a été mis en évidence. Il est caractérisé par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et le niveau des systèmes de défense anti-oxydants de la cellule, en faveur des ERO (Gardès-Albert *et al.*, 2003). Il faut noter que les ERO ne doivent pas être considérées comme des facteurs uniquement dommageables, mais participant à de nombreux processus physiologiques tels que ceux liés à la signalisation de l'insuline (Bisbal *et al.*, 2010).

Toutefois, lorsqu'un état de stress oxydant s'établit dans la cellule, les ERO en excès sont susceptibles d'attaquer les cibles cellulaires, ce qui a pour conséquence des dommages oxydatifs au niveau des lipides, des protéines, des acides nucléiques, pouvant notamment conduire à un dysfonctionnement endothélial et des processus inflammatoires (Hulsmans *et al.*, 2012). Les produits d'oxydation des cibles cellulaires, tout comme les systèmes anti-oxydants, peuvent servir de biomarqueurs pour mettre en évidence un état de stress oxydatif.

Un état de stress oxydant a été rapporté au cours de l'obésité, aussi bien chez l'animal que chez l'homme. Ainsi, des protéines modifiées par un aldéhyde issu de l'oxydation des lipides, le 4-hydroxynonéal, ont été identifiées dans le tissu adipeux de souris obèses insulinorésistantes, par analyse protéomique et spectrométrie de masse (Grimsrud *et al.*, 2007). Plusieurs protéines impliquées dans la réponse au stress cellulaire, à la lipotoxicité, à la signalisation de l'insuline, ont subi une carbonylation, processus directement lié à l'oxydation, témoignant ainsi de la présence d'un stress oxydant (Grimsrud *et al.*, 2007).

En outre, un récent travail expérimental mené sur des rats rendus obèses par sevrage précoce a apporté une preuve supplémentaire du lien entre obésité et stress oxydant (**Franco et al., 2013**). En effet, ces rats, comparativement à des animaux témoins, ont développé une obésité viscérale accompagnée d'hypertension et de dyslipidémie, les animaux présentaient également une stéatose hépatique ; auxquelles s'ajoutait un état de stress oxydant au niveau du plasma et du foie, objectivé par l'augmentation d'un marqueur de peroxydation lipidique et une diminution des activités d'enzymes antioxydantes (SOD, GSH-Px).

Plusieurs hypothèses mécanistiques ont été évoquées pour tenter d'expliquer comment le stress oxydant est susceptible de participer à la pathogenèse de l'obésité, mais cette dernière elle-même pourrait être responsable de l'induction d'un état de stress oxydant. Le stress oxydatif est donc à la fois induit par l'obésité, mais il favorise aussi l'accumulation des graisses, ce qui crée un cercle vicieux (**Bonnefont, 2013**).

Le stress oxydant peut ainsi stimuler la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. Au cours de l'obésité, l'accumulation excessive de lipides stimule le développement du tissu adipeux en activant la prolifération des pré-adipocytes, leur différenciation en adipocytes et en augmentant la taille des adipocytes (**Spiegelman et Flier, 2001**). Or, il a été montré que le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène favorise la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes, en régulant positivement des activateurs transcriptionnels tels que le CCAAT/Enhancer Binding Protein- β (C/EBP- β) et le Peroxisomal Proliferator Activated Receptor- γ (PPAR- γ), intervenant dans le programme de différenciation adipocytaire (**Lee et al., 2009**).

A ces effets et d'autres, les importantes ressources et connaissances médicales, scientifiques liées au style de vie sont aujourd'hui consacrées à l'identification des stratégies capables de combattre ce problème de santé majeur comme l'indique l'organisation mondiale de la santé.

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

Notre choix s'est porté sur la pulpe de *Zizyphus lotus* car elle est consommée et utilisée par la population en médecine traditionnelle.

Le but de ce travail est d'évaluer si l'administration d'un régime hypergras enrichi de pulpe de *Zizyphus lotus*, peut lutter contre le stress oxydatif et l'inflammation chronique chez les rates.

Après l'analyse de nos résultats concernant le gain du poids, nous avons observé une augmentation hautement significative en gain du poids chez les rates recevant le régime

hypergras (HFAD) comparées aux rates témoins (Ctr) et aux rates recevant le régime hypergras enrichi en pulpe (HFADP). Alors qu'aucune différence significative n'est observée chez les rates recevant le régime hypergras enrichi en pulpe comparées aux témoins (Ctr).

Ce résultat peut s'expliquer par la richesse de la pulpe en acides gras insaturés (60.95% dans 21.50% des acides gras polyinsaturés). Plusieurs études rapportent en effet que la consommation de régimes riches en graisse contenant des AGPI n-3 d'huile de poisson limite l'hypertrophie de dépôts adipeux par rapport à la consommation de régimes riches en graisse contenant du lard (graisse saturée) chez le rat (**Parrish et al., 1990 ; Hainault et al., 1993**). De plus, l'augmentation de la teneur en acides gras polyinsaturés à longues chaînes oméga 3 présents dans le régime des rongeurs (de 1% à 12% des acides gras totaux) conduit à une diminution de la masse grasse. Selon (**Shirouchi et al., 2007**), cette perte de masse grasse est induite par une diminution de la prolifération des préadipocytes et de l'adiposité. Ainsi, l'expression de gènes codant pour des enzymes de la lipogénèse hépatique (AGS, EM, ACC et la protéine spot S14) et de la glycolyse (glucokinase [GK] et pyruvate kinase [PK]) est réprimée chez des rats nourris avec des régimes hyperlipidiques contenant des AGPI n-3 d'origine marine. Ce type d'expériences nous a amené à conclure quant à l'influence bénéfique des oméga-3. Tout d'abord, ces acides gras polyinsaturés ont réglé l'évolution pondérale par la réduction de la lipogénèse (**Michalik et al., 2000**).

De plus, la présence de glucides fermentescibles (fibres) dans l'alimentation pourrait même participer au contrôle de l'appétit, et d'autres fonctions physiologiques clés, qui peuvent contrer les désordres métaboliques associées à l'obésité (**Delzenne, 2011**).

Plusieurs études confirment que même les polyphénols sur la prise du poids et le métabolisme lipidiques notamment le cumin agit lui sur la leptine et la glycémie et abaisse ainsi le poids par un moindre stockage du glucose sous forme de graisse (**Ardekani, 2009**), ainsi que les polyphénols du caroubier abaisse les poids des tissus adipeux blancs épидymaires et périrénaux (**Myoung-nam Woo et al., 2009**).

Nos résultats montrent que la glycémie diminué chez les rates nourries au régime hypergras enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus*, ceci est confirmé avec les résultats de **Benammar et al., (2010)** qui ont montré que les extraits de la pulpe et la tige de *Zizyphus lotus* ont un rôle important au niveau de la régulation de l'insulinémie, ce qui indique une diminution de l'hyperglycémie. De plus, l'expérience sur la tolérance au glucose indique que ces extraits de *Zizyphus lotus* diminuent le taux de glucose circulant. Ces observations suggèrent aussi que les extraits de pulpe et de tige favorisent l'utilisation de glucose (**Benammar et al., 2010**).

Cette diminution de la glycémie peut être attribuée aux fibres et aux polyphénols sachant que la pulpe renferme 28.00% de fibre et 12.006 mg PE/ g DW de polyphénols ; nos résultats concordent avec ceux de **Liatis (2009)**, de l'étude menée sur 46 personnes ayant une cholestérolémie élevée, qui ont montré que les fibres alimentaires peuvent entraîner une réduction significative du taux d'insuline de 3.23 $\mu\text{U/ml}$ versus une augmentation de 3.77 $\mu\text{U/ml}$ et améliore par la suite la résistance à l'insuline. D'autre part, cette réduction de la glycémie peut être expliquée par le fait que la pulpe contient des AGPI de la série n-3 ; Plusieurs études ont montré que les AGPI de la série n-3 exercent un effet hypoglycémiant (**Harris, 1989 ; Lichtenstein et al., 1998**). D'autres études ont montré qu'une supplémentation de l'alimentation par de l'huile de poisson contenant les AGPI n-3 exerçait un effet bénéfique dans la progression des maladies cardio-vasculaires y compris le diabète et l'obésité.

Nos résultats montrent que le régime hypergras augmente significativement les teneurs plasmatiques en triglycérides par rapport aux régimes témoins et régimes hypergras enrichis en pulpe de *Zizyphus lotus*. Cette augmentation reflète les perturbations du métabolisme lipidique dues à l'état inflammatoire chronique provoqué par l'excès du poids. Ces données vont dans le même sens que les travaux de **Lafontan, 2008; Wakil et Abu-Elheiga (2009)** montrant l'existence d'une relation entre le régime alimentaire et la pathologie.

La supplémentation en pulpe de *Zizyphus lotus* entraîne une diminution hautement significative des taux plasmatiques en triglycérides cependant aucun effet n'est observé sur le taux du cholestérol total plasmatique.

La diminution des lipides plasmatiques due aux AGPI n-3 qui pourrait jouer un rôle sur l'obésité en diminuant la fourniture de substrats au tissu adipeux. Plusieurs études ont rapporté une diminution des lipides plasmatiques après l'administration d'AGPI n-3 chez les rongeurs (**Belzung et al., 1993**) et chez l'homme (**Harris, 1989**). Ainsi, ce résultat nous laisse postuler l'hypothèse suggérant que les composés bioactifs de la pulpe de *Zizyphus lotus* sont des composés polaires qui peuvent restaurer le catabolisme des triglycérides via leur hydrolyse au niveau des tissus périphériques par la lipoprotéine-lipase (LPL).

Au cours de l'obésité, l'accumulation de graisse au niveau du tissu adipeux conduit à l'induction d'un stress oxydant systémique, chez la souris et l'homme (**Furukawa et al., 2004 ; Urakawa et al., 2003**). Cela se traduit chez la souris par une augmentation de la synthèse des ERO, spécifiquement dans le tissu adipeux. Cette augmentation est corrélée à une induction de la NADPH oxydase et une diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes (catalase, SOD, glutathion-peroxydase) (**Gouranton et Landrier, 2007**).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et instables, participant au vieillissement des protéines, à la peroxydation lipidique, et à l'altération de l'ADN. Longtemps considérés comme des agents toxiques responsables de dysfonctions et de mort cellulaires, il est actuellement admis que les ERO sont de véritables seconds messagers impliqués dans l'expression de gènes, et la régulation des fonctions de prolifération et de mort cellulaire. De plus, ils sont des médiateurs inflammatoires impliqués dans diverses pathologies (**Dhalla et al., 2000 ; Patel et al., 2000**).

Les lipides et principalement les acides gras poly insaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre les doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué oxydé en radical pyroxylo. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical pyroxylo formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (**Esterbauer et al., 1992**).

La peroxydation des lipides constitués d'AGPI résulte en une désorganisation des structures membranaires entraînant le dysfonctionnement des protéines qui y sont imbriquées ainsi que la libération des aldéhydes qui, à forte concentration, s'avèrent toxiques pour les cellules (**Slater, 1984**). La plupart de ces aldéhydes sont très réactifs et peuvent être considérés comme des seconds messagers toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. L'aldéhyde le mieux étudié est le dialdéhyde malonique (MDA) (**Esterbauer et al., 1991**).

Nos résultats concernant les marqueurs du statut oxydant plasmatique montrent que les teneurs plasmatiques en malondialdéhyde (MDA) et en hydroperoxydes sont élevées chez les rates recevant le régime hypergras enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus*. Nous pouvons expliquer ce résultat par la présence de l'acide érucique (3%) qui est un acide gras toxique d'une part, et d'autre part l'augmentation d'oxydation des acides gras polyinsaturés (**Claire et Fabrice, 2006**).

Par ailleurs, nous avons dosé le taux des protéines carbonylées. Elles sont considérées comme des marqueurs de l'oxydation des protéines (**Mayne, 2003**). Ces protéines carbonylées sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés (particulièrement l'histidine, proline, arginine et lysine) (**Lean et Burn, 2007**).

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative, malgré l'observation d'une diminution chez les rates recevant le régime enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFADP).

Comme marqueurs antioxydant, quelques enzymes : superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase et la glutathion réductase sont dosées.

Les valeurs obtenues montrent que le régime enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* augmente significativement l'activité de glutathion réductase et glutathion peroxydase cependant l'activité de la catalase diminue significativement comparée aux régimes gras et témoins. La pulpe de *Zizyphus lotus* n'entraîne aucun effet sur l'activité de SOD. Cela peut être expliqué par le fait que la catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de la glutathion peroxydase est limitée et elle joue un rôle significatif dans le développement d'une tolérance au stress oxydatif et dans la réponse adaptative des cellules (**Wassmann et al., 2004**).

L'activation du système enzymatique ou l'augmentation des teneurs de glutathion réductase et de glutathion peroxydase est due à la présence des composés bioactifs dans la pulpe de *Zizyphus lotus* notamment les polyphénols, qui un rôle protecteur contre les différentes pathologies. Leur nature chimique fait de ces composés des agents réducteurs et ce sont, par ailleurs, les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation (**Derbel et Ghedita, 2005**). Chaque classe chimique des polyphénols semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques (**Bruneton, 1999 ; Wichtl et al., 1999**), par exemple les flavonoïdes désactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif (**Nijveldt et al., 2001**).

Plusieurs travaux affirment qu'il existe une corrélation inverse entre la consommation des phytonutriments et l'incidence des pathologies chroniques. Certains d'entre eux sont actifs par leur pouvoir antioxydant, d'autres participent à la détoxification enzymatique des substances cancérigènes présentes dans l'organisme (**Derbel et Ghedita., 2005 ; Morand, 2013 ; Ghedadba et al., 2014**).

Plusieurs enquêtes épidémiologiques ont montré les effets bénéfiques de la consommation des fruits et des légumes ayant une forte concentration en composés phénoliques dans la prévention des maladies liées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies métaboliques et le cancer (**Bouayed et al., 2008**).

En effet, l'ensemble de ces observations démontre que la composition chimique de la pulpe de *Zizyphus lotus* renferme des composés actifs : polyphénols, β -carotène, fibres, AGPI,

qui ont un effet antioxydant puissant et exercent des effets bénéfiques au cours de cette pathologie.

L'étude microscopique des tissus, permettant de comprendre leur fonctionnement, et de connaître leur structure, afin d'y découvrir éventuellement certaines anomalies. Nous sommes intéressés à l'étude de deux organes : le foie et le colon.

Le foie est un organe essentiel à la vie chez tous les mammifères. Il est un organe central du métabolisme énergétique et des substances toxiques auxquelles l'individu est exposé. Le foie est la cible d'agressions diverses, telles que les virus, les substances chimiques présentes dans l'alimentation ou l'environnement de vie. Il subit également des transformations pathologiques profondes, lors du diabète ou de l'obésité.

L'étude histologique du foie révèle une stéatose macro vésiculaire au niveau du parenchyme hépatique avec une fibrose chez les rates recevant le régime hypergras ainsi que chez les rates recevant le régime hypergras enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* comparés aux témoins cependant une inflammation chronique est observée chez les rates recevant le régime hypergras et une discrète inflammation est notée chez les rates recevant le régime hypergras enrichi en pulpe.

Le parenchyme hépatique peut réagir à ces agressions de façon aigüe aboutissant à une hépatite fulminante où la nécrose massive des hépatocytes provoque une insuffisance hépatique qui peut s'avérer létale en absence de transplantation. Cependant, on observe souvent une réponse chronique, caractérisée par le développement d'une stéatose ou par de nécrose hépatocytaire à des degrés variables, d'infiltration tissulaire des cellules inflammatoires, et de fibrose. La progression de ces conditions pathologiques peut aboutir au développement d'une cirrhose hépatique voire d'un carcinome hépatocellulaire (**Degli Esposti, 2011**).

Les mécanismes pathogènes à l'origine de la progression d'une stéatose simple vers une pathologie hépatique plus sévère ne sont pas encore élucidés. L'insulino-résistance et l'obésité sont les causes épidémiologiques associées à la NASH (Non Alcoholic Stéatohepatitis) et au développement d'une cirrhose cryptogénique (sans causes sous-jacentes reconnues).

Les causes de cette accumulation sont multiples : il peut s'agir d'une synthèse et/ou d'une disponibilité accrue de lipides ; d'une sécrétion et/ou d'un catabolisme de triglycérides

diminué, ou bien d'une combinaison de ces altérations. Les triglycérides intra-hépatiques proviennent des plusieurs carrefours métaboliques.

En effet, les triglycérides sont produits à partir des acides gras captés par le foie depuis le sérum, suite soit à une lipolyse du tissu adipeux soit à une augmentation quantitative des apports lipidiques alimentaires. Ils peuvent également être issus de l'hydrolyse des triglycérides sériques (**Fabbrini et al., 2010**). De même cette stéatose peut être expliquée par la présence de l'acide érucique dans la composition de la pulpe de *Zizyphus lotus*, il a été montré, chez le rat de laboratoire qu'une très forte consommation d'acide érucique provoque des lésions cardiaques en plus de l'accumulation anormale de graisse dans le foie et d'un retard de la croissance (**Claire et Fabrice, 2006**).

La stéatose est généralement considérée comme une lésion bénigne, mais elle peut constituer la première étape de la progression d'une hépatopathie vers un large spectre de lésions hépatiques qui vont de la stéatohépatite (une stéatose accompagnée de lésions hépatocellulaires, d'une inflammation chronique et d'une fibrose) jusqu'à la cirrhose (**Leclercq et Sempoux, 2006**).

On estime actuellement que la stéatose et la stéato-hépatite non alcooliques sont des manifestations du syndrome métabolique (autrefois appelé syndrome X) caractérisé par une obésité, une hyperinsulinémie, une résistance à l'insuline, un diabète, une hypertriglycéridémie, un taux bas de lipoprotéines de haute densité (HDL) et une hypertension (**Alberti et Zimmet, 1998**).

Cependant, nous notons une discrète inflammation chez les rates recevant le régime enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus* (HFADP), comparées aux autres rates (HFAD), ceci peut être expliqué par sa richesse en composés bioactifs ayant un effet anti-inflammatoire.

En ce qui concerne l'étude histologique du colon, les résultats obtenus montrent la présence d'une inflammation chronique avec la diminution de la mucosécrétion chez les rates (HFAD) comparées aux rates contrôlées (ctr), alors que nous constatons un aspect normal chez les rates (HFADP) comparées aux rates témoins.

Les résultats obtenus peuvent être expliqués par la richesse de la pulpe de *Zizyphus lotus* en composés bioactifs notamment les polyphénols. Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols

et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) dans le plasma (Salas- Salvado *et al.*, 2008), que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines (IL-8, IL-13 et IFN- α) circulantes (Karlsen *et al.*, 2007) ou encore que l'augmentation du pouvoir antioxydant du plasma dû à une consommation de jus de fruits concentré était associée à une diminution des cassures de brin d'ADN (Nantz *et al.*, 2006).

L'inflammation est la réponse principale de l'organisme à une agression et est précisément régulée afin de limiter les atteintes possibles des structures de l'organisme. Néanmoins, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique (Bengmark, 2004) et la plupart des pathologies chroniques possèdent une composante inflammatoire. C'est le cas de l'obésité, du diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et du cancer (Hotamisligil, 2006). Les différentes études menées sur les effets protecteurs des polyphénols dans ces contextes pathologiques ont montré que ceux-ci diminuaient les marqueurs de l'inflammation (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2010) et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation (Santangelo *et al.*, 2007).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que les polyphénols pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) : phospholipase A2, cyclooxygénase et lipoxygénase. Ils agissent également sur la production de NO en modulant l'activité de NOS une inhibition de ces enzymes par les polyphénols réduit ainsi la production d'AA, de NO, de prostaglandines et de leucotriènes, médiateurs de l'inflammation (Kim *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2009).

Des études menées *in vitro* ont également montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibaient la production de cytokines telles que IL-4, IL-5 et IL-13, que la quercétine inhibait la production de TNF- α par des macrophages stimulés au lipopolysaccharide (LPS), que le kaempférol inhibait l'expression et la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β ou de l'IL-6 dans les mastocytes (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2010).

De plus, il est maintenant connu que les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant *in vitro* et *in vivo* sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Santangelo *et al.*, 2007).

Du fait de la faible absorption des polyphénols au niveau de l'intestin grêle, une large partie de ces composés est retrouvée dans la lumière du côlon. Ces composés ainsi que leurs sous-produits issus du métabolisme par la microflore intestinale sont donc en contact direct avec la muqueuse intestinale où ils peuvent agir en tant qu'antioxydant mais également en tant qu'anti-inflammatoire (**Del Rio et al., 2010**).

Ainsi, les polyphénols pourraient jouer un rôle nutritionnel intéressant dans le contrôle de l'inflammation intestinale (**Dryden et al., 2006**). Les études chez l'homme portant sur la consommation de polyphénols au cours des pathologies inflammatoires intestinales sont peu nombreuses. À notre connaissance, une seule étude clinique a montré une diminution du « clinical activity index » après supplémentation en curcumine chez des patients (**Hanai et al., 2006**).

Toutefois, de nombreux travaux ont évalué les effets des polyphénols au cours d'études in vitro sur des lignées cellulaires intestinales et in vivo dans des modèles expérimentaux d'inflammation intestinale (**Shapiro et al., 2007; Romier et al., 2009**). La plupart de ces études ont été réalisées avec des polyphénols purifiés, quelques-unes ont utilisé des extraits végétaux riches en polyphénols et très peu ont évalué l'impact d'aliments entiers. L'effet protecteur des polyphénols sur la rétraction du côlon est également observé avec la curcumine (**Arafa et al., 2009**), la quercitrine (**Camuesco et al. 2004; Camuesco et al. 2006**), l'hespéridine (**Xu et al., 2009**), la wogonine (**Lim, 2004**) ou encore avec le rutoside.

Les résultats obtenus de notre étude viennent confirmer effectivement l'effet antioxydant et anti-inflammatoire des polyphénols de *Zizyphus lotus*, plante largement utilisée en médecine traditionnelle.

Conclusion générale

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimique contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants et anti-inflammatoires. Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vue les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse à savoir le BHA et le BHT.

L'objectif primordial assigné par cette étude englobe le même contexte afin d'évaluer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des plantes médicinales.

Le choix de ces plantes de différentes familles est basé sur quelques données ethnopharmacologiques (infections microbiennes, anti-inflammatoire, ulcère, cancer et antidiabétique).

Il ressort de l'analyse phytochimique des deux plantes :

- La pulpe et la racine de *Zizyphus lotus* sont riches en fibre.
- La feuille et la fleur d'*Anthyllis vulneraria* sont riches en matière minérale.
- La composition en acide gras montre que les quatre huiles présentent des fortes teneurs en acides gras insaturés et des teneurs moyennes en acides gras saturés : la feuille d'*Anthyllis vulneraria* renferme des teneurs importantes en n-3 (36.11%) et en n-6 (10.83%). Cependant on note présence de l'acide érucique dans la pulpe et la racine de *Zizyphus lotus* et absence dans la fleur et feuille d'*Anthyllis vulneraria*.
- En ce qui concerne les métabolites secondaires, nous avons remarqué que la pulpe de *Zizyphus lotus* présente le rendement le plus élevé en polyphénols et flavonoïdes. Le dosage des polyphénols et flavonoïdes a révélé que la fleur d'*Anthyllis vulneraria* est la partie la plus riche.

L'évaluation de l'activité antioxydante a montré que les différents extraits de *Zizyphus lotus* et d'*Anthyllis vulneraria* ont une forte activité antioxydante à faible concentration.

Egalement des tests de toxicité ont été réalisés sur des splénocytes de rats, les résultats ont montré que les différents extraits phénoliques de *Zizyphus lotus* et d'*Anthyllis vulneraria*

ne présentent aucune toxicité à des concentrations entre 31.25 µg/ml et 10 mg/ml dont la dose toxique est estimée à 25 mg/ml.

Par ailleurs, l'évaluation du pouvoir anti-inflammatoires des extraits phénoliques de *Zizyphus lotus* et d'*Anthyllis vulneraria* par le dosage du taux de la libération de NO₂ par les RAW2647 a montré qu'à une concentration de 0.5 mg/ml, l'extrait phénolique de la racine a un pouvoir d'inhiber la libération de NO₂ plus élevée que celui de la pulpe de *Zizyphus lotus* et la fleur que la feuille d'*Anthyllis vulneraria*. Cependant à cette concentration, l'extrait phénolique de *Zizyphus lotus* possède le pouvoir de réduire la libération de NO₂ qui est supérieur non seulement à celui de la pulpe de *Zizyphus lotus* mais aussi à celui de l'acide ascorbique antioxydant de référence.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés par l'étude des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires de la pulpe de *Zizyphus lotus* chez des rates de la souche « Wistar ».

Les premiers résultats significatifs de notre étude *in vivo* montrent que la pulpe de *Zizyphus lotus* induit une diminution de poids corporel ainsi que la glycémie et les triglycérides chez les rates recevant un régime hypergras plus de la pulpe de *Zizyphus lotus* comparées aux rates recevant le régime hypergras.

Une modification du statut oxydant/ antioxydant est constatée au cours de l'obésité et l'inflammation expérimentale, cela confirme l'installation d'un stress oxydatif résultant d'une production accrue des espèces oxygénées actives et d'une altération à la baisse des défenses antioxydantes chez les rates qui présentent l'obésité et l'inflammation.

A cet effet une augmentation de l'activité de la glutathion peroxydase et réductase chez les rates recevant le régime enrichi en pulpe de *Zizyphus lotus*. Cependant une diminution de l'activité de catalase et aucune différence significative est noté concernant l'activité de SOD.

Il est important de souligner que la pulpe de *Zizyphus lotus* augmente la peroxydation lipidique intracellulaire et favorise l'accumulation des acides gras au niveau des hépatocytes. Cette accumulation est due à la présence de l'acide érucique.

Il apparait que la pulpe de *Zizyphus lotus* a un effet protecteur de la paroi colique et également un effet anti-inflammatoire.

Comme perspectives, il sera judicieux d'effectuer d'autres études, telles que :

- Détermination de profil phénolique de deux plantes étudiées.
- Evaluation l'effet de la pulpe de *Zizyphus lotus* sur le métabolisme lipidique
- Evaluation d'autres marqueurs inflammatoires comme les cytokines.
- Evaluation *in vivo* de pouvoir anti-inflammatoire de l'extrait phénolique de *Zizyphus lotus* et d'*Anthyllis vulneraria*.

Références bibliographiques

1. **Abdel-Zaher A.O., Salim S.Y., Assaf M.H. et Abdel-Hady R.H. (2005).** Antidiabetic activity and toxicity of Zizyphusspina-christi leaves. J. Ethnopharmacol, 101:129-138.
2. **Abi Azar R. (2007).** Complexations des protéines lactières par les extraits de gousses vertes de caroubier. Propriétés technologiques des coagulums obtenus, Agro. paristech Ecole Doctorale Abies, Thèse de doctorat.
3. **Abu-Zarga M., Sabri S., Al-Boudi A., Ajaz S., Sultana N. et Rahman A-U. (1995).** New cyclopeptide alkaloids from Zizyphus lotus. Journal of Natural Products, 58:504-511.
4. **Adedapo A.A., Jimoh F.O., Koduru S., Masika P.J. et Afolayan A.J. (2009).** Assessment of the medicinal potentials of the methanol extracts of the leaves and stems of Buddleja saligna. BMC Complement Altern. Med., 9: 21p.
5. **Adhvaryu M.R., Reddy N., et Parabia M.H. (2007).** Effects of four Indian medicinal herbs on Isoniazid-, Rifampicin- and Pyrazinamide-induced hepatic injury and immunosuppression in guinea pigs. World J Gastroenterol, 13:3199-3205.
6. **Aebi H. (1974)** catalase. In : methods of enzymatic analysis. 2 nd. HU Bergmeyer. Verlag chemie GmbH, Weinheim., 2: 673-684.
7. **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (2002).** Les fibres alimentaires : définition, méthode de dosage, allégations nutritionnelles, Rapport du comité d'experts spécialisé dans la nutrition humaine.
8. **Albert Szent-Györgyi a reçu en 1937** le prix Nobel de Physiologie et Médecine « pour ses découvertes liées aux processus de combustion chimique, avec une mention spéciale à la vitamine C et à la catalyse de l'acide fumarique ».

9. **Alberti K.G. et Zimmet P.Z. (1998).** Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1 : diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 15 : 539-53.
10. **Arafa H.M., Hemeida R.A., El-Bahrawy A.I. et Hamada F.M. (2009).** Prophylactic role of curcumin in dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis murine model. *Food Chem Toxicol.*, 47:1311-1317.
11. **Ardekani J.M., Akbarian Z. (2009).** Comparison of the cumin oil and sibutramine effects on blood free leptin, glucose, and weight in wistar rat, Turkish Society of Molecular Medicine, Third International Congress of Molecular Medicine, May 5-8, Istanbul, Turkey, Abstracts 106 p.
12. **Aruoma O.I., Spencer J.P.E., Butler J. et Hlliwel B. (1995).** Commùentary reaction of plant derived and syntitic antioxidants whittrichloromethyl-peropxyl radicals. *Free rad. Res.*, 22: 187-190.
13. **Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N. et Atmani, D. (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem.*, 112: 303-309.
14. **Audigie C.L., Figarelle J. et Zons Zani F. (1980).** Manipulation d'analyses biochimiques. Ed. Doin. Paris. 88-97.
15. **Bahorun T. (1997).** Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. AMAS. Food and agricultural rsearch council. Reduit. Mauritius.
16. **Bate-Smith E.C. (1973).** Ahaemanalysis of tannin: The concept of relative orstingency, *Phytochemistry* .12: 907-212.
17. **Baytop T. (1984).** Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present) Nobel Press, Istanbul, Turkey.

18. **Beecher G.R. (2003).** Overview of dietary flavonoid nomenclature occurrence and intake. *Journal of nutrition*, 133 (10): 3248-3254.
19. **Belarbi M. (2003).** Etude des composés nutritionnels et antinutritionnels des glands de chêne et l'efficacité nutritionnelle de leurs protéines chez le rat « Wistar » en croissance. Thèse pour l'obtention du Doctorat d'Etat en sciences naturelles. Université Tlemcen.
20. **Belarbi-Benmahdi M., Khaldi D., Baghdad C., Gouzi H., Bendimerad N. et Hammouti B. (2009).** "Physicochemical and nutritional study of argan oil (*Argania spinosa* L.) in south-western Algeria", *Pigment & Resin Technology*. 38 (2): 96-99.
21. **Belarbi M., Bendimered S., Sour S., Soualem Z., Baghdad C., Hmimed S., Chemat F., Visioli F., (2011).** Oleaster oil positively modulates plasma lipids in humans. *J. Agric. Food Chem.*, 59 (16): 8667-8669.
22. **Belzung F., Raclot T. et Groscolas R. (1993).** Fish-oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. *Am. J. Physiol.*, 264 : 1111-1118.
23. **Benammar C., Hichami A., Yessoufou A., Simonin A-M, Belarbi M., Allali H. et Khan N.A. (2010).** *Zizyphus lotus* L. (Desf.) modulates antioxidant activity and human T-cell proliferation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 10:54.
24. **Bengmark, S. (2004).** "Acute and "chronic" phase reaction-a mother of disease." *Clin. Nutr.* 23: 1256-1266.
25. **Berger M.M. (2006).** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 48-53.
26. **Bidet D., Gagnault J., Girard P. et Trotin F. (1987).** Inflammation, allergie douleurs et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: les flavonoïdes. *L'actualité chimique*, 89-97.

27. **Bisbal C., Lambert K. et Avignon A. (2010).** Antioxidants and glucose metabolism disorders. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 13: 439-446.
28. **Bligh E.G. , Dyer W.J. (1995).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37: 911–917
29. **Bloor S. J., (2001).** Overview of methods for analysis and identification of flavonoids. *Method. Enzymol.* 335: 3-14.
30. **Bonnefont-Rousselot D. (2013).** Obesity and oxidative stress. *Obésité*10.1007/s11690-013-0408-3.
31. **Borgi W. et Chouchane N. (2006).** Activité anti-inflammatoire des saponosides et des flavonoïdes des écorces des racines de *Zizyphus lotus* (L.). *Revue des Régions Arides*, 289-286.
32. **Borgi W., Ghedira K. et Chouchane N. (2007).** Anti-inflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks. *Fitoterapia*, 78:16-19.
33. **Borgi W., Recio M.C., Rios J.L. et Chouchane N. (2008).** Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. *South African journal of botany*, 74: 320-324.
34. **Botting R.M. et Botting J.H. (2000).** Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clinical Drug Investigation*, 19: 1-7.
35. **Bouayed J., Rammal H., Younos C., Dicko A. et Soulimani R. (2008).** Caractérisation et bioévaluation des polyphénols : nouveaux domaines d'application en santé et nutrition. *Phytonutrition expérimentale*, 6: 71–74.
36. **Boudraa S., Hambaba L., Zidani S. et Boudraa H. (2010).** Mineral and vitamin composition of fruits of five underexploited species in Algeria: *Celtisaustralis* L., *Crataegusazarolus* L., *Crataegusmonogyna*Jacq., *Elaeagnusangustifolia* L. and *Zizyphus lotus* L. *Fruits* . 65(02) : 75-84.

37. **Braca A., Sortino C., Politi M., Morelli I. et Mendez J. (2002).** Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J. Ethnopharmacol.*, 79 (3): 379-381.
38. **Brownlee H., Hedjer J. et Scott I. (1992).** Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. *Phys. Mol. Plant pathol.*, 40 : 227-232.
39. **Bruneton J. (1993).** *Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales*. Paris, France: Lavoisier. 278-279.
40. **Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*, 3^{ème} édition. 3, Lavoisier, Paris.
41. **Camuesco D., Comalada M., Concha A. et al. (2006).** "Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin. Nutr.*, 25: 466-476.
42. **Camuesco D., Comalada M., Rodriguez-Cabezas M.E. et al. (2004).** "The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression." *Br J. Pharmacol.*, 143: 908-918.
43. **Carillon E. (2000).** *La phytothérapie face à l'évolution médicale*.
44. **Catalano L., Franco I., De Nobili M. et Leita L. (1999).** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica*, 43: 193-205.
45. **Catoire C., Henri Z. et Bouet C. (1999).** Dossier et article édité par fruits oubliés (jujubes et jujubier).
46. **Catoire C., Zwang H., Bouet C. (1994).** Le jujubier ou le *Zizyphus lotus*. Fruits oubliés. Article n°1.
47. **Cavé A., (1993).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 2^{ème} Ed. Tec. Et Doc Ed Lavoisier, Paris. 274-285.

48. **Chan AS., Yip E.C., Yung L.Y., Pang H., Luk S.C., Pang S.F. et Wong Y.H. (2006).** CKBM stimulates MAPKs but inhibits LPS-induced IFN-gamma in lymphocytes. *Phytother. Res.*, 20:725-731.
49. **Christopoulou E., Lazaraki M., Komaitis M. et Kaselimis K. (2004).** Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils. *Food Chem.*, 84: 463-474.
50. **Claire D. et Fabrice V. (2006).** Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées édition Qnae. 812p.
51. **Cox P-A. et Balick M-J. (1994).** "The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery," *Scientific American*. 82-87.
52. **Da Silva E.J.A., Oliveira A.B. et Lapa A.J. (1994).** Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and coumestrol, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46(2) : 118-22.
53. **Dacosta E. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (éd). Paris, 317p.
54. **Das H., Wong J. et Lien E. (1994).** Carcinogenicity and cancerpreventing activities of flavonoids: A structure-system-activity-relationship (SSAR) analysis.
55. **Davies M.G., Fulton G.J. et Hagen P.O. (1995).** Clinical biology of nitric oxide. *Br. J. Surg.*, 82: 1598-1610.
56. **De Oliveira M., Sampaio M., Simon F., Gibert B. et Mors W. (1972).** Antitumor activity of condensed flavonols. *An. Acad. Brazil.*, 41-44.
57. **Degli Esposti D. (2011).** Les mécanismes de réponse à l'inflammation chronique dans le foie stéatosique et les conséquences sur l'homéostasie cellulaire et la cancérogenèse thèse doctorat. 3p.

58. **Del Rio D., Costa L.G., Lean M.E. et al. (2010).** "Polyphenols and health: what compounds are involved?" *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 20: 1-6.
59. **Delzenne N.M. et Cani P.D. (2011).** Interaction between obesity and the gut microbiota: relevance in nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 31:15-31.
60. **Densiov E.T. et Afanas'ev I.B. (2005).** IN: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A). 703-861.
61. **Derbel S. et Ghedira K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé *Phytothérapie*, 1: 28-34.
62. **Descamps-Latscha B. et Witko-Sarsat V. (1996).** Cytokines pro-inflammatoires et cellules phagocytaires. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 36 : 310-314.
63. **Dhalla N.S., Temsah R.M. et Netticadan T. (2000).** Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.*, 18 : 655-73.
64. **Di Carlo G., MascoJo N., Izzo A.A., Capasso F. (1999).** Flavonoids: olei and new aspects of a class of naturaJ therapelitic drllgs. *Life Sci.*, 65, 337-353.
65. **Didry N., Pinkas M. et Torck M. (1982).** La composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces degaindelia. *PI med. Phytother.* XVI : 7-15.
66. **Dogyan S., Turan Y., Ertuerk H. et Arslan D. (2005).** Characterization and Purification of Polyphenol oxidase from artichoke (*Cynarascolymus L.*). *J. Agric. Food Chem.*, 53: 776-785.
67. **Dombrowicz D. et Capron M. (2001).** Eosinophils, allergy and parasites. *Current Opinion in Immunology*, 13: 716-720.

68. **Dotson K.D., Jerrell J.P., Picciano M.F. et Perkins E.G. (1992).** High-performance liquid chromatography of human milk triacylglycerols and gas chromatography of component fatty acids. *Lipids*, 27 : 933-939.
69. **Droge W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Reviews of physiology*, 82: 47-95.
70. **Dryden G.W., Song M. et McClain C. (2006).** "Polyphenols and gastrointestinal diseases." *Curr. Opin. Gastro. Enterol.*, 22: 165-170.
71. **Dubois M.K.A., Gilli Y.K. et Hamilton P.A. (1956).** Colometric method for determination of sugars and related substances, *Anal et chem. Jour.*, 28 : 350-356.
72. **Edmond ROCK. (2003).** Stress oxydant, micronutriments et sante. Université d'été de Nutrition 2003 – Clermont-Ferrand . 35-38.
73. **El-Waziry A.M. (2007).** Nutritive value assessment of ensiling or mixing Acacia and Atriplex using in vitro gas production technique. *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, 3(6): 605-614.
74. **Eming S.A., Krieg T. et Davidson J.M. (2007).** Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127: 514-525.
75. **Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H. et Jurgens G. (1992).** The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.*, 13: 341-342.
76. **Esterbauer H., Schau R. et Zollner H. (1991).** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonanal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free rad. Boil. med.*, 11: 81-128.
77. **Fabbrini E., Sullivan S. et Klein S. (2010).** Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*, 51:679-689.

78. **Farombi E.O. (2003).** African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. African journal of biotechnology, 2 (12): 662-671.
79. **Fathiazad, F., Mazandarani, M. & Hamedeyazdan, S. (2011).** Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 1(2), 63 – 67.
80. **Fauve R.M. et Hevin M. (1998).** Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. In: inflammation. Russo-Marie F., Peltier A., Polla B S. Eds, John Libbey Eurotext (France). 10-19.
81. **Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. Mécanismes biochimiques. 108-115.
82. **Fellat-Zerrouk K., Smoughen S. et Maurin R. (1987).** Etude de la pulpe du fruit de l'arganier (*Argania spinosa*) du Maroc. Matière grasse et latex. Actes institut. Agron. vét. Rabat.7 :17-22.
83. **Fleuriet A., (1982).** Expression et régulation du métabolisme des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la croissance Thèse Doc. Etat, Montpellier.
84. **Fouché J., Marquet A. et Hambuckers A. (2000).** Les plantes médicinales de la plante au médicament, Observation du monde des plantes.
85. **Franco J.G., Lisboa P.C., Lima N.S. et al. (2013).** Resveratrol attenuates oxidative stress and prevents steatosis and hypertension in obese rats programmed by early weaning. J Nutr. Biochem. 24: 960-966.
86. **Fukai K., Ishigami T. et Hara Y. (1991).** Antibacterial activity of tea polyphenols against hypopathogenic bacteria. Agric. Biol. Chem., 55: 1895-1897.

87. **Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M. et al. (2004).** Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 114: 1752-1761.
88. **Galati E.M., Monforte M.T., Kirjavainen S., Forestieri A.M., Trovato A. et Tripodo M.M. (1994).** Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco.*, 40(11) : 709-12.
89. **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'Actualité Chimique*, 11-12: 91–6.
90. **Ghalem M., Merghache S., Ghalem S. et Belarbi M. (2012).** Phenolic contents and in-vitro antioxidant activity of some secondary metabolites of *Anthyllis vulneraria l.* from Algeria. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences*, 2 (3): 51-64.
91. **Ghedadba N., Bousselela H., Hambaba L., Benbia S. et Mouloud Y. (2014).** Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubiumvulgare L.* *Pharmacognosie*, 10298-0832.
92. **Girotti-channu C. (2006).** Etude de la lipolyse et de synthèse des composés du Derme sous l'effet de la Cirsimarine ,Flavone extraite de *Microtea Debilis*. Thèse de Doctorat .Institut national des sciences appliquées de Lyon.127.
93. **Godevac D., Zdunic G., Savikin K., Vajs V. et Menkovic N. (2008).** Antioxidant activity of nine Fabaceae species growing in Serbia and Montenegro. *Fitoterapia*, 79: 185-187.
94. **Gonzalez-Gallego J., Garcia-Mediavilla M.V., Sanchez-Campos S. et Tunon M.J. (2010).** Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br. J. Nutr.*, 104:S15-S27.
95. **Gordon M.H. (1990).** The mecanisme of antioxydant action in vitro. In food antioxydants; Hudson, B.J.F., Ed; Elsevier Applied Science: London, U. k., 1-18.

96. **Goudable J. et Favier A. (1997).** Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr .Clin. Métabol.*, 11: 115-120.
97. **Gouranton E. et Landrier J.-F. (2007).** Les facteurs modulant l'expression des adipokines en relation avec l'insulinorésistance associée à l'obésité. *Obes.* 2: 272-279.
98. **Grand F., Guitton J. et Goudable J. (2001).** Optimisation des paramètres du dosage des nitrites et nitrates sériques par la technique de Griess. *anale de biologie clinique*, 59 (5) : 559-565.
99. **Green L.C., Wagner D.A. , Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S, Tannenbaum S.R. (1982).** Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids . *Anal Biochem*, 126:131–138.
100. **Grimsrud P.A., Picklo M.J., Griffin T.J. et Bernlohr D.A. (2007).** Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol. Cell. Proteomics*, 6: 624-637.
101. **Guignard J.L. (1979).** Abrégé de biochimie végétale. 2^{ème} ED. Masson Paris, p : 84.
102. **Guo W., Kong E. et Meydani M. (2009).** "Dietary polyphenols, inflammation, and cancer." *Nutr. Cancer*, 61: 807-810.
103. **Gutiérrez F., Jimenez B., Ruiz A. et Albi M.A. (1999).** Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved. *J. agric. Food Chem.* 47: 121-127.
104. **Hainault I., Carlotti M., Hajduchi E., Guichard C. et Lavau M. (1993).** Fish oil in a high fat diet prevents obesity, hyperlipemia, and adipocyte insulin resistance in rats. *Ann. NY Acad. Sci.*, 683: 98-101.

105. **Halabalaki M., Urbain A., Paschali A., Mitakou S., Tillequin F. et Skaltounis A.L. (2011).** Quercetin and Kaempferol 3-O-[-L-Rhamnopyranosyl-(1 2)-R-Larabinopyranoside]-7-O--L rhamnopyranosides from *Anthyllishermanniae*: Structure Determination and Conformational Studies. *Journal of Natural Products*, 74: 1939-1945.
106. **Hanai H., Iida T., Takeuchi K. et al. (2006).** "Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial." *Clin. Gastro. enteral. Hepatol.*, 4: 1502-1506.
107. **Hänsel R., Keller K. Et Rimpler H. (1992).** *Hagers Hadbuch der pharmaceutischen Praxis*, springer Verlarg, berlin, Heidelberg new york, London, Paris, Tokio.
108. **Harborne JB. (1980).** Plant phenolics. In: BELL EA, CHARLWOOD BV (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology*, volume 8 *Secondary Plant Products*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 329-395.
109. **Harris W.S. (1989).** Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: A critical review. *J. Lipid Res.*, 30: 785- 807.
110. **Havsteen B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96: 67-202.
111. **Hayase F. et Kato M. (1984).** Antioxydant compounds of sweet potatoes. *J. Nutri. Sci. vetaminol.* 30: 37-46.
112. **Hayes K.C. et Khosla P. (1992).** Dietary fatty acid thresholds and cholesterolemia. *FASEB J.*, 6 : 2600-2607.
113. **Hayouni E., Abedrabba M., Bouix M. et Hamdi M. (2007).** The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quecus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chem.*, 105: 1126-1134.

114. **Henneberg W. et Stohmann F. (1860).** Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer. Vol. I. Schwetsehtke Sohn, Braunschweig. 4p.
115. **Hogan S.P., Rosenberg H.F., Moqbel R., Phipps S., Foster P.S., Lacy P. et Kay A.B. (2008).** Rothenberg ME (2008). Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 709-750.
116. **Hotamisligil G.S. (2006).** "Inflammation and metabolic disorders." *Nature*, 444: 860-867.
117. **Hulsmans M., van Dooren E. et Holvoet P. (2012).** Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 14: 264-76.
118. **Hunter J.E. (2001).** Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids*, 36: 655-668.
119. **Hunter K.A., Crosbie L.C., Weir A., Miller G.J., Dutta-Roy A.K. (2000).** A residential study comparing the effects of diets rich in stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on fasting blood lipids, hemostatic variables and platelets in young healthy men. *J. Nutr. Biochem.*, 11: 408-416.
120. **Iserin P. (2001).** Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Ed. Larousse. 10-132.
121. **Izzo A.A. (1996).** *Rev. J. Pharm. Pharmacol.*, 48, 1103-1111.
122. **Jadwiga N., Iwna W. et Halina S. (2001).** Triterpenoid sapogenin from *Anthyllis vulneraria*. *Acta poloniae pharmaceutica*, 58: 289-291
123. **Jahaniaval F., Kakuda Y. et Marccone M.F. (2000).** Fatty acid and triacylglycerol compositions of seed oils of five *Amaranthus* accessions and their comparison to other oils. *J Am. Oil. Chem. Soc.*, 77(8) : 847-852.
124. **Kamm W. et Dionisi F. (2001).** Analysis of steryl in cocoa butter by on-line liquid chromatography-gas chromatography. *J.of chromatography A.*, 918: 341-349.

125. **Karlsen A., Retterstol L., Laake P. et al. (2007).** "Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of proinflammatory mediators in healthy adults." *J. Nutr.*, 137: 1951-1954.
126. **Khartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M. et Sokmen A. (2007).** Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100: 584-589.
127. **Khosla P. et Sundram K. (1996).** Effects of dietary fatty acid composition on plasma cholesterol. *Prog. Lipid Res.*, 35(2) : 93-132.
128. **Kim H.P., Son K.H., Chang H.W. et al. (2004).** "Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms." *J. Pharmacol. Sci.*, 96: 229-245.
129. **Kjeldhal J. (1883).** Neue method zur bestimmung des stickstoffs in organischen korpern. *Z. Anal. Chem.*, 22: 366-382.
130. **Kreofsky T., Scalager G., Vuk-Pavlovic Z., Abraham R. et Rohrabach M. (1992).** Condensed tannins promotes the release of arachidonic acid from rabbit residents alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 7: 172-181.
131. **Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A. et Abdelly C. (2008).** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *C.R. Biol.*, 331: 865-873.
132. **Kubow S. (1996).** The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Nutr. Biochem.*, 7 : 530-541.
133. **Kumar V., Cotran R.S. et Robbins S.L. (2003).** *Robbins Basic Pathology*. Saunders.
134. **Lafontan M. (2008).** Advances in adipose tissue metabolism. *Int. J. Obes.*, 32 : 39-51.

135. **Lamien-Meda A., Lamien C.E., Compaoré M.M., Meda RN., Kiendrebeogo M., Zeba B., Millogo JF. et Nacoulma O.G. (2008).** Polyphenol content and antioxidant.
136. **Landete, J.M. (2012).** Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 936–948.
137. **Landolfi R., Mower R.L., Steiner M. (1984).** *Biochem Pharmacol*, 33, 1525-1530.
138. **Lean ME.J. et Burn J. (2007).** Tentatives pharmacologiques et nutritionnelles pour corriger le stress oxydatif. Journées annuelles de diabétologie de l'Hôpital Dieu. 1-10.
139. **Leclercq I., Sempoux C. (2006).** Hépatopathie non alcoolique: de la stéatose à la cirrhose. *Acta Endoscopica* 36:299-314.
140. **Lecoq A. (1965).** Manual d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles.
141. **Lee H, Lee YJ, Choi H, et al (2009).** Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem* 284: 10601–9.
142. **Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P. et Prost M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale.* 30: 1076-1081.
143. **Levine R.L., Garland D., Olivier C.N., Amica A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shantiel S. et Stadtman E.R. (1990).** determination of carbonyl content in oxidatively modified protein; *Ehod Enwy*, 186 : 464-478.
144. **Liatis S. et coll. (2009).** *Diabetes Metab.* 3 : 115-20.
145. **Lichtenstein A.H., Kennedy E. et Barrier P. (1998).** Dietary fatty consumption and health. *Nutr. Rev.*, 56: 3-19.
146. **Lim B.O. (2004).** "Efficacy of wogonin in the production of immunoglobulins and cytokines by mesenteric lymph node lymphocytes in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68: 2505-2511.

147. **Limasset B., Doucen C., Dore J. Ch., Ojasoo T., Damon M., de Paulet A. C. (1993).** *Biochem. Pharmacol.*, 46, 1257-1271.
148. **Linden G., Lovient D. (1994).** *Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole.* Ed. Masson. Paris. 104-109.
149. **Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H. et Zeng X. (2009).** Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex Kudingcha* C.J. Tseng, *food chemistry*, 112 : 35-40.
150. **Mabry T. et Ulubelen A. (1980).** Chemistry and utilization of phenylpropanoïdes including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.*, 28: 188-196.
151. **Maillard M. N. (1996).** Thèse Doct., E.N.S.IA., Paris, 148p.
152. **Majno G. et Joris I. (2004).** *Cellules, tissus et maladies.* Oxford Univ. Press.
153. **Male D., Roitt Y., Brostoff J. et Roth D.B. (2007).** Mécanisme de l'immunité innée. In: *Immunologie.* Eds, Masson (France), 155p.
154. **Martinez-Cayuela, M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease (A review). *Biochimie*, 77: 147-161.
155. **Masquelier J, Dumon M. et Dumas J. (1979).** Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique.* 1 : 101-104.
156. **Maurin R., Fellat-Zerrouk K. et Kirs m. (1989).** Huile d'argan, *Arganiaspinosa* du Maroc, triglycérides. *Actes du congrés. Euro-lipid. angers.* 1 :151-158.
157. **Mayne S.T. (2003).** Antioxidant nutrient and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutri.*, 133: 933-940.
158. **Memelink J., Verpoort R. et Kigine J.W. (2001).** Organisation of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism.

159. **Menkovic N., Savikin K., Tasic S., Zdunic G., Stešević D., Milosavljevic S. et Vincek D. (2011).** Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *Journal of Ethnopharmacology*, 133 : 97-107.
160. **Michalik L., Desvergne B. et Wahli W. (2000).** Les bases moléculaires de l'obésité : vers de nouvelles cibles thérapeutiques ? *médecine/sciences*, 16 : 1030-1039.
161. **Middleton E.J. (1996).** Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacol.* 34(5): 344-348.
162. **Middleton E.J., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer *Pharmacol. Rev.*, 52: 673–751.
163. **Mighri H., Hadjlaoui H., Akrouit A., Najjaa H. et Neffati M. (2010).** Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *C. R. Chimie*, 13: 380-386.
164. **Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère peroxydant ou thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg I. 155p.
165. **Miner J.N., Ardecky B., Benbatoul K., Griffith K., Larson C.J., Mais D.E., Marschke K., Rosen J., Vajda E. et Negro-Vilar A. (2007).** Anti-inflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects exhibits an altered protein–protein interaction profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 19244-19249.
166. **Mitjavila M.T. et Moreno J.J. (2012).** The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases *Biochem. Pharmacol.*, 84 : 1113-1122.
167. **Mole S., Waterman P.G. (1987).** Tonic acid proteolytic enzymes: enzyme inhibition substrat derivation, *Photochemistry*, 26: 99-102.

168. **Morand C. (2013).** Les polyphénols du thé et du cacao ont-ils des effets santé ?
Phytothérapie 11: 92-99.
169. **Myoung-Nam W., Seon-Min J., Young Chul S., Mi-Kyung L., Mi Ae K. et Myung-Sook C. (2009).** "Anti-obese property of fucoxanthin is partly mediated by altering lipid-regulating enzymes and uncoupling proteins of visceral adipose tissue in mice," *Molecular Nutrition et Food Research*, 53:1603-1611.
170. **Nantz M.P., Rowe C.A. et Nieves C., et al. (2006).** "Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate." *J. Nutr.*, 136: 2606-2610.
171. **Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R. et Krishna D.R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 33: 2-16.
172. **Neuzil J. et Stocker R. (1993).** Bilirubin attenuates radical mediated damage to serum albumin *FEBS let.* 311 (3): 281-284.
173. **Ng S.C. (1992).** Non-steroidal anti-inflammatory drugs- uses and complications. *Singapore Med. J.*, 33: 510-513.
174. **Nijveldt R.J., Nood E.V., Van Hoorn DE.C., et al. (2001).** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74 (4): 418-425.
175. **Nohl H. et Hegner D. (1978).** Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur. J. Biochem.*, 82: 563-567
176. **Nourooz-Zadeh J., Tajaddini- sarmad I.J., Ling K.I.E. et Wolf P.S.(1996).** Low density lipoprotein is major carrier of lipid hydroperoxyde concentrations. *Biochem. J.*, 313: 781-786.

177. **Okamura H., Mimura A. et Yakou Y. (1993).** Antioxydant activity of Tannins and flavonoid in Eucalyptus rostarta. *Phytochem*, 33: 557-561.
178. **Okuda T., Kimura Y., Yoshida T. et Hatanv T. (1983).** Studies on the activities of tannins And Related coumpounds from medicinal plant and drugs. Inhibition effects of lipid peroxidation in mithchordria and microsome of liver. *Chem. Pharm. Bull.*, 31:1625-1631.
179. **OMS. (2002).** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO /EDM /TRM /2002.1.
180. **Organisation mondiale de la santé. (2000).** Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle.
181. **Oueslati, S., Ksouri, R., Falleh, H., Pichette, A. Abdelly, C. & Legault, J. (2012).** Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte Suaeda fruticosa Forssk. *Food chemistry.*, 132, 943 – 947.
182. **Ozturk M., Aydogmus-Ozturk F., Duru M.E. et Topçu G. (2007).** Antioxidant activity of stem and root extract of rhubarb (*Rheumribes*): an edible medicinal plant. *Food chemistry*, 103: 623-630.
183. **Pan Y., Wang k., Huang S., Wang H., Mu X., He C., Ji X., Zhang J. et Huang F. (2008).** Antioxydant activity of microwave –assisted extract of longan (*dimocarpus longan* lour.) peel, *food chemistry*, 106: 1264- 1270.
184. **Paris et Hurabielle (1981).** Abrégé de matière médicale- pharmacognosie. Tome 1 Ed. masson, paris ISBN 2-225-66165-0 :182p.
185. **Parke, A., Parke, D.V. (1995).** The pathogenesis of inflammatory disease: Surgical shock and multiple system organ failure. *Inflammopharmacology* 3, 149-168.
186. **Parrish C.C., Pathy D.A. et Angel A. (1990).** Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats. *Metabolism*. 39 : 217-219.

187. **Patel R.P., Moellering D., Murphy-Ullrich J., Jo H., Beckman J.S. et Darley-Usmar V.M. (2000).** Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 28 : 1780-1794.
188. **Patrice Magnard. (2014).** La réaction inflammatoire aiguë. Copyright 2000-2014 Maxicours RCS PARIS B432623429.
189. **Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. et Defraigne J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16: 233-239.
190. **Pincemail J., Siquet J., Chapelle J-P. et al. (2000).** Evaluation des concentrations plasmatiques en antioxydants, anticorps contre les LDL oxydées et homocystéine dans un échantillon de la population liégeoise. *Ann. Biol. Clin.*, 58 :178-185.
191. **Poisson J.P. et Narce M. (2003).** Corps gras alimentaires : aspects chimiques et biochimiques. In : Graille J, ed. *Lipides et corps gras alimentaires*. Paris : Lavoisier Tec & Doc. 1-50.
192. **Pokorny J., Yanishlieva N. et Gordon M. (2001).** Antioxidants in food, practical applications. Woodhead publishing limited. ISBN 1 85573 463 X.
193. **Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, e-*Revue de génie industriel*. 4 :1313-8871.
194. **Prieto P., Pineda M. et Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269: 337-341.
195. **Prior R.I., Wu X.L. Schaich K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (10): 4290-4302.

196. **Quezel P. et Santa S. (1963)**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I et Tome II. CNRS, Paris, 1087p.
197. **Rached W., Benamar H., Bennaceur M., Marouf A. (2010)**. Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *J. Biological. Sciences*, 10(4): 316-324.
198. **Rahmani M. (2005)**. Composition chimique de l'huile d'argan vierge. *Cahiers agricultures*, (14), (5) : 461-465.
199. **Rallidis L.S., Paschos G., Liakos G.K., Velissaridou H., Anastasiadis G. et Zampelas A. (2003)**. Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidemic patients. *Atherosclerosis*, 167 : 237-242
200. **Rankin J.A. (2004)**. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues*, 15: 3-17.
201. **Ravrn H, Andary C, Kovacs G et Molgaard P. (1984)**. cafféic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochimie. Syst. Ecol.* 17, 175-184.
202. **Romier B., Schneider Y.J., Larondelle Y. et During A. (2009)**. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr. Rev.*, 67: 363-378.
203. **Rsaissi N. et Bouhache M. (2002)**. La lutte chimique contre le jujubier .Programme National de transfert de Technologie en Agriculture (PNTTA), DERD (Ed) Rabat.(94) : 4p.
204. **Ruiz G. (2005)**. Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloides d'Algues Rouges. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges Discipline : Chimie appliquée-Chimie de substances Naturelles.258p.
205. **Ruslan M. (2008)**. Origin and physiological roles of inflammation *Nature*, 454: 428-435

206. **Russo-Marie F., Peltier A. et Polla B. (1998).** L'inflammation. Editions John Libbey Euro text, 565p.
207. **Sahnoun Z., Jamoussi K. et Zeghal K.M. (1998).** Radicaux libres et anti-oxydants : physiologie, pathologie humaine et aspects thérapeutiques (IIème partie) = Cellular systems implicated in production of free radicals and physiological functions of these radicals and free radicals in human pathology Rencontre Nationales de Pharmacologie 1998, 53(4) : 355-389
208. **Salas-Salvado J., Fernandez-Ballart J. et Ros E. et al. (2008).** "Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial." Arch. Intern. Med., 168: 2449-2458.
209. **Sanchez-Moreno C. (2002).** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. Food Sci. Tech. Int., 8(3): 121-137.
210. **Santangelo C., Vari R., Scazzocchio B. et al. (2007).** "Polyphenols, intracellular signalling and inflammation." Ann. Ist. Super. Sanita, 43: 394-405.
211. **Scalbert A. (1991).** Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, 30: 3875-3883.
212. **Selvakumar G., Saha S. et Kundu S. (2007).** Inhibitory activity of pine needle tannin extracts on some agriculturally resourceful microbes. Indian J. microbial., 47: 267-270.
213. **Shahidi F. et Miraliakbari H. (2004).** département omega -3 (n-3) fatty acid in health and disease. Part 1- cardiovasculair disease and cancer. J. med. Food., 7: 387-401.
214. **Shapiro H., Singer P., Halpern Z. et al. (2007).** "Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis." Gut. 56: 426-435.

215. **Shirouchi B, Nagao K, Inoue N, Ohkubo T, Hibino H, Yanagita T (2007)**. Effect of dietary omega 3 phosphatidylcholine on obesity-related disorders in obese Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *J Agric Food Chem*. 55:71-76.
216. **Singleton V.L et Rossi, JA. Jr. (1965)**. colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic –phosphotungstic acid reagents .*american journal of ecology and viticulture*,16: 144-158
217. **Slater T.F. (1984)**. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 105 : 283-305.
218. **Sorg O. (2004)**. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, 327: 649-662.
219. **Sour S., Belarbi M., Khaldi D, Benmansour N, Sari N, Nani A, Chemat F. et Visioli F. (2011)**. Argan oil improves surrogate markers of CVD in humans. *British Journal of Nutrition*. 107: 1800-1805.
220. **Spiegelman B.M. et Flier J.S. (2001)**. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104: 531-543.
221. **Stavric B. et Matula T. (1992)**. Flavonoids in food: Their significance for nutrition and health. In *Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications*. Ong, A.S.H., Packer, L., Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, p: 274-293.
222. **Steinhubl S.R. (2007)**. Platelets as Mediators of Inflammation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 21:115-121.
223. **Su M.S., Shyu Y.T. et Chein P.J. (2008)**. Antioxidant activities of citrus herbal product extracts, *food chemistry*, 11: 892-896.
224. **Suksamrarn S., Suwannapoch N., Aunchai N., Kuno M., Ratananukul P., Haritakum R., Jansakul C. et Ruchirawat S. (2005)**. Ziziphine N, O, P, new

- antiplasmodial cyclopeptides alkaloids from *Zizyphus oenoplia* var. brunoniana. *Tetrahedron*, 61 :1175-1180.
225. **Swain, T. & Hillis, W. E. (1959)**. The phenolic constituents of *Purmus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food. Agric.*, 10, 63 – 68.
226. **Thannickal V.J. et Fanburg B.L. (2000)**. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 279: L1005-L1028.
227. **Trease E. et Evans W.C. (1987)**. *Pharmacognosy. Billiare. Tindall. London* 13: 61-62.
228. **Triboulot C., Hichami A., Denys A. et Khan N.A. (2001)**. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids exert antihypertensive effects by modulating calcium signaling in T cells of rats. *J. Nutr.* 131: 2364-2369.
229. **Unten L., Koketsu M. et Kim M. (1997)**. Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agr. Food. Chem.*, 45: 2009-2019.
230. **Urakawa H., Katsuki A., Sumida Y., et al. (2003)**. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88: 4673-4676.
231. **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. et Telser J. (2007)**. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell.*, 39: 44-84.
232. **Vane J. et Botting R. (1987)**. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Faseb J.*, 1: 89-96.
233. **Vidal H. (2003)**. Obésité et inflammation : les adipocytokines. 64-5-C2-0003-4266-101019-ART7.
234. **Wakil S.J. et Abu-Elheiga L.A. (2009)**. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J. lipid Res.*, 1194: 200-215.

235. **Wassmann S., Wassmann K. et Nickenig G. (2004).** Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 44(4) : 381-386.
236. **Weill B., Batteux F. et Dhainaut J. (2003).** Immunopathologie et reactions inflammatoires. Eds, De Boeck Universite (Paris). 12-23.
237. **Wichtl M. et Anton R. (1999).** Plantes thérapeutiques. Tec & Doc.
238. **Xu L., Yang Z.L., Li P. et al. (2009).** "Modulating effect of Hesperidin on experimental murine colitis induced by dextran sulfate sodium." *Phytomedicine* 16: 989-995.
239. **Yousfi M., Nedjmi B., Bellal R., Ben Bertal D. et Palla G. (2002).** Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79 (10): 1049-1050.
240. **Yu Z. et Dahlgren R.A. (2005).** Evaluation of methods for measuring polyphenols in copper foliage, *J. Chem. Ecol.*(26): 2119-2140.
241. **Yusuf Y., (2006).** Catechins in foods, *Trends Food Science Technology* .,17: 64-71.
242. **Zelko I.N., Mariani T.J. et Folz R.J. (2002).** Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 337-349.
243. **Zhang, S.Y., Zheng, C.G., Yan, X.Y. & Tian, W.X. (2008).** Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 371 (4): 654 – 658.
244. **Zhishen J., Mengcheng T. et Jianming W. (1999).** Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials, *Food Chemistry*, 64: 555-559.
245. **Zhou M.X., Holmes M.G., Robards K. et Helliwell S. (1998).** Fatty acid composition of lipids of Australian oats. *J. Cereal Sci.*, 28: 311-319.

Annexes

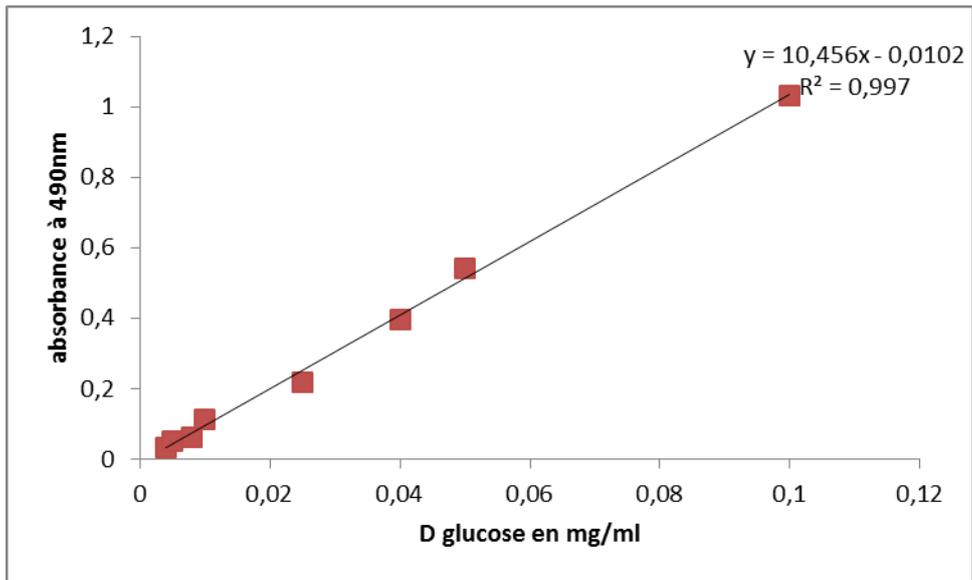


Figure A1. Courbe d'étalonnage de D+ Glucose mg/ ml

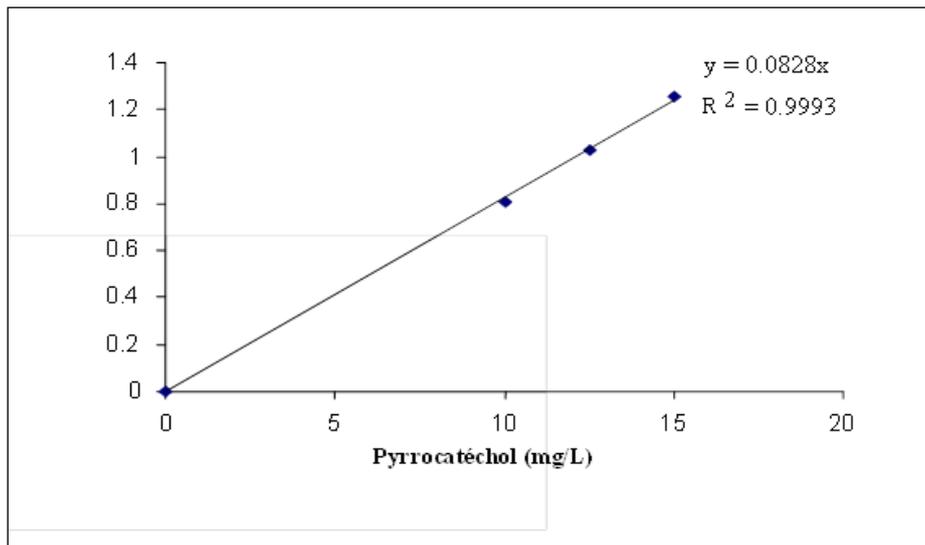


Figure A2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.

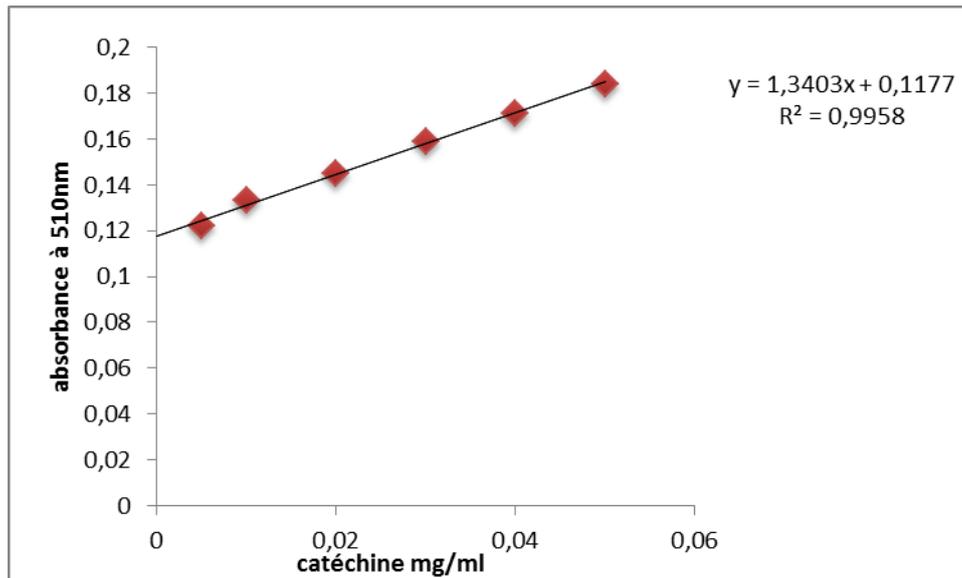


Figure A3. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

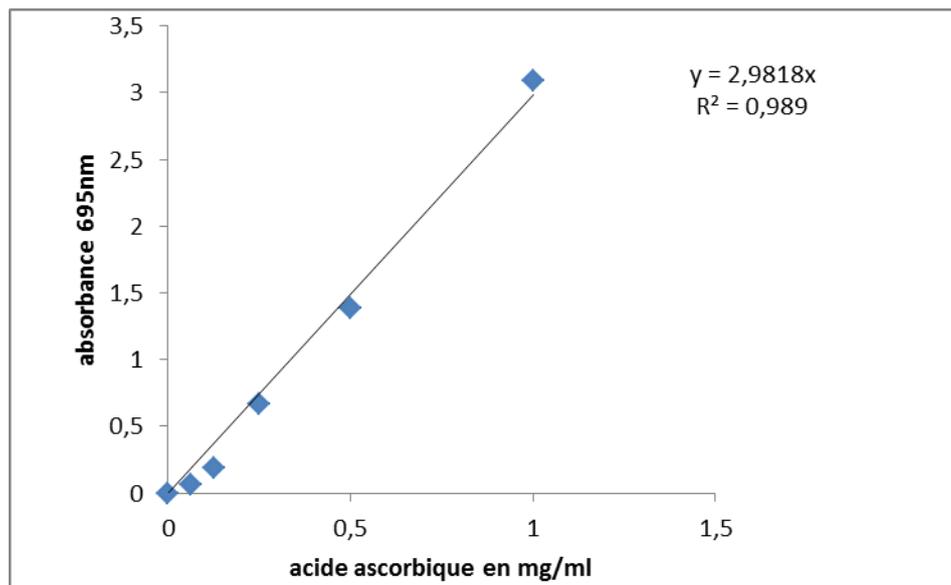


Figure A 4. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'activité antioxydante totale (CAT)

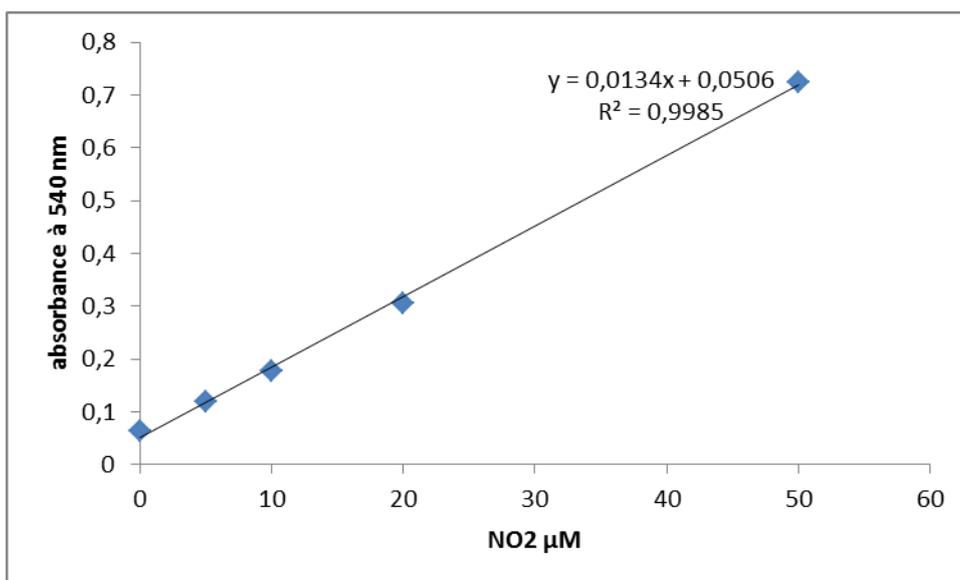


Figure A5. Courbe d'étalonnage pour le dosage de NO_2

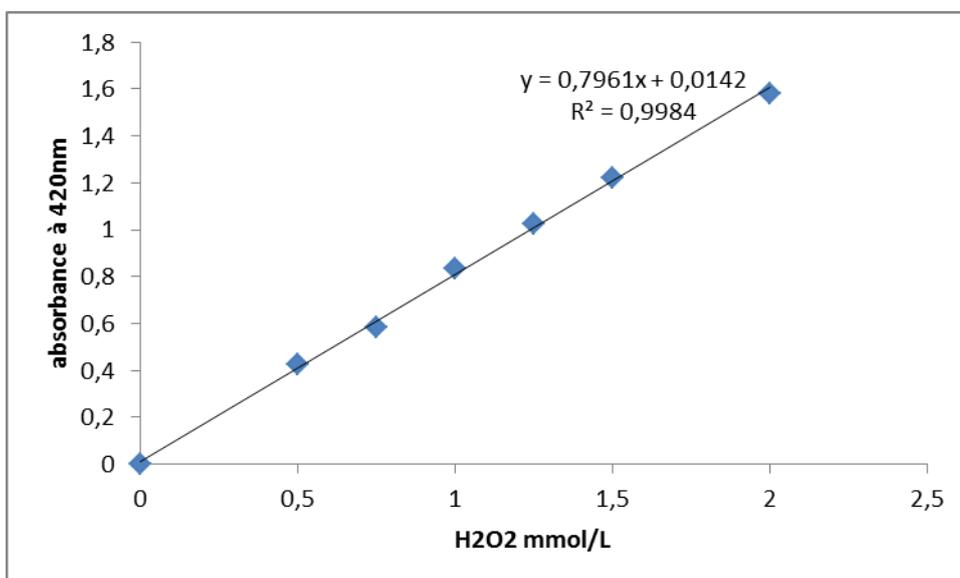


Figure A6. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'activité de la catalase.