

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université ABOU BEKR BELKAID –TLEMCEM–

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

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimie :

Synthèse et activités biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème:

**Etude phytochimique et l'évaluation de l'activité
antioxydante des extraits préparés des feuilles de
*Zizyphus lotus***

Présenté par : M^{elle} HAMMOUMI Chahinez

Soutenu le 19 -06-2023 devant les membres de jury :

Président	CHAOUICHE Mohammed Tarik	MCA	Univ. Tlemcen
Encadrant	AZZI Rachid	Pr	Univ. Tlemcen
Co-Encadrant	ABBOU Fayza	Docteur	Univ. Tlemcen
Examineur	BELAID-MEDJDOUB Houria	MCB	Univ. Tlemcen

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciement

En premier lieu, je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements, à **Mr. AZZI Rachid**, Professeur au département de Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen, pour avoir accepté de m'encadrer et diriger ce modeste travail, pour sa gentillesse, sa bienveillance, son soutien, sa disponibilité permanente et ses précieux conseils. J'ai eu le grand plaisir de travailler sous sa direction.

J'exprime également mes remerciements à **Mr CHAUCHE Mohammed Tarik**, Maître de conférences classe A au département de Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury ainsi que pour sa sympathie.

J'adresse mes sincères remerciements à **Mme BELAID-MEDJDOUB Houria**, maître de conférences classe B, au Département de Biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail ainsi que sa gentillesse.

Mes sincères remerciements vont également à **M^{elle} ABBOU Fayza**, docteur en biochimie pour son soutien et son aide pour la réalisation de la pratique de ce travail.

C'est un grand merci que j'adresse à tous les membres du laboratoire Antibiotiques, Antifongiques, Physico-chimiques, Synthèse et activité biologique de l'Université de Tlemcen pour leurs gentillesse et leurs conseils.

Dédicace

Votre lecture de ces lignes signifie qu'ALLAH m'a réussi à terminer mon étude universitaire, qui a toujours semblé difficile à réaliser.

À mes parents, maman ma vie, papa mon soutien, vous avez été mes premiers enseignants et mes plus grands admirateurs. Votre amour inconditionnel m'a permis de me sentir soutenue et encouragée dans toutes les étapes de ma vie. Je ne pourrais jamais vous remercier assez pour tout ce que vous avez fait pour moi.

À ma grand-mère, vous m'avez toujours encouragée à poursuivre mes rêves, même lorsque je doutais de moi-même. Vos mots de sagesse et votre sérénité ont été une source d'inspiration pour moi tout au long de mes études.

À mes sœurs, mon frère, vous êtes ma famille et mon plus grand trésor. Votre amour, votre soutien et votre sourire ont illuminé mes journées, même dans les moments les plus difficiles.

À mes amies, mes collègues de promo qui m'ont partagé des moments inoubliables toutes les années d'étude, de la tristesse à la joie, de l'échec à la réussite. Nos moments de travail et de détente resteront gravés dans ma mémoire pour toujours.

À ma famille, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines qui m'ont conseillé et encouragé à réaliser mes objectifs.

À mes chers professeurs qui m'ont enseigné tout au long de mon parcours universitaire.

Cette réussite n'est pas seulement la mienne, mais elle est également la vôtre, alors avec tout la gratitude, le respect et l'amour je vous la dédie.

Chahinez

الملخص

السدره هو نبات طبي ، من عائلة النبقيات ، يستخدم على نطاق واسع لخصائصه العلاجية.

يركز هذا العمل على الدراسة الكيميائية النباتية ، والتحليل الكمي للمركبات الفينولية (متعدد الفينول الكلي والفلافونويدات) وتقييم النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات الهيدرو ميثانول الخام المحضرة بالغلي أو النقع ومستخلصاتها العضوية أسيتات الإيثيل لأوراق السدر عن طريق دراسة قدرة اختزال الحديد (FRAP) ، أو عن طريق تثبيط الجذر الحر DPPH. أظهر التحليل النوعي الذي تم إجراؤه على مستخلصات الهيدرو ميثانول الخام المحضرة بالغلي أو النقع وجود القلويدات، الفلافونويدات، الكينونات، التربينات، الصابونين والعفص ومركبات مختزلة وعدم وجود الأنتراكينونات.

سجل التحليل الكمي وجود البوليفينول والفلافونويد الكلي في جميع المستخلصات المدروسة بكميات متفاوتة من مستخلص إلى آخر، حيث تم تسجيل أعلى محتوى من البوليفينول للمستخلص الخام المحضر بالنقع (0.03 ± 262.2 ميكروغرام مكافئ حمض الغاليك لكل ميليغرام مستخلص) بينما تم الكشف عن أعلى محتوى من مركبات الفلافونويد للمستخلص الخام المحضر عن طريق الغلي بترتيب 0.026 ± 92.3 ميكروغرام مكافئ كاتشين لكل ميليغرام مستخلص.

أظهرت المستخلصات التي تمت دراستها نشاطاً قوياً مضاداً للأكسدة، حيث تم تسجيل أفضل قدرة اختزال للحديد لمستخلصات أسيتات الإيثيل المحضرة بالنقع أو الغلي بقيمة EC_{50} ، حوالي 0.50 مجم / مل و 0.59 مجم / مل ، على التوالي. من ناحية أخرى ، تم تسجيل أفضل نتائج تثبيط الجذر الحر DPPH للمستخلصات الخام المحضرة بواسطة الغلي أو النقع ، بقيمة IC_{50} حوالي 0.53 و 0.58 مجم / مل على التوالي. يظل هذا النشاط منخفضاً مقارنةً بالنشاط الذي تم الحصول عليه بواسطة الجزيئات المرجعية المدروسة.

الكلمات المفتاحية: السدره ، الاختبارات الكيميائية النباتية ، متعدد الفينول الكلي ، الفلافونويدات ، النشاط المضاد للأكسدة

، FRAP و DPPH.

Résumé

Zizyphus lotus est une plante médicinale, de la famille des *Rhamnacees*, connu en Algérie sous le nom de Sedra. Elle est largement utilisée pour ses propriétés thérapeutiques.

Ce travail s'intéresse à l'étude phytochimique, le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) et l'évaluation de l'activité antioxydante des deux extraits bruts hydrométhanoliques préparés par décoction ou macération et leurs fractions organiques acétate d'éthyle des feuilles de *Zizyphus lotus* par la méthode du pouvoir de réduction du Fer (FRAP), et la méthode de piégeage du radical DPPH.

L'analyse qualitative réalisée sur les extraits bruts hydrométhanolique préparés par décoction ou macération a révélé la présence des alcaloïdes, de flavonoïdes, de quinones, de terpènes, de saponines, de tanins et de composés réducteurs et l'absence des anthraquinones.

L'analyse quantitative a enregistré la présence des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans tous les extraits étudiés avec des quantités variables d'un extrait à un autre.

La teneur la plus élevée en polyphénols a été enregistrée pour l'extrait brut préparé par macération de l'ordre de $262,2 \pm 0,03 \mu\text{g EAG/mg E}$. Tandis que, la teneur la plus élevée en flavonoïdes, a été révélée pour l'extrait brut préparé par décoction de l'ordre de $92,3 \pm 0,026 \mu\text{g EC/mg E}$.

Les extraits étudiés ont présenté une activité antioxydante puissante. Le meilleur pouvoir réducteur du fer a été enregistré pour les fractions acétate d'éthyle préparées par macération ou décoction avec des EC_{50} , d'ordre de 0,50 mg/ml et 0,59 mg/ml, respectivement. Par contre, les meilleurs résultats du piégeage du radical DPPH ont été enregistrés pour les extraits bruts préparés par décoction ou macération, avec des CI_{50} de l'ordre de 0,53 et 0,58 mg/ml respectivement. Cette activité reste faible par rapport à celle obtenus par les molécules de références étudiées.

Mots clés : *Zizyphus lotus*, tests phytochimiques, polyphénols totaux, flavonoïdes, activité antioxydante, FRAP et DPPH.

Abstract

Zizyphus lotus is a medicinal plant in the Rhamnaceae family, known in Algeria as Sedra. It is widely used for its therapeutic properties.

This work focuses on the phytochemical study, the determination of phenolic compounds (total polyphenols and flavonoids) and the evaluation of the antioxidant activity of crude hydromethanolic extracts prepared by decoction or maceration and their ethyl acetate organic fractions of *Zizyphus lotus* leaves using the Iron Reducing Power (FRAP) method, and the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrozyl) free radical scavenging assay.

Qualitative analysis of crude hydromethanolic extracts prepared by decoction or maceration revealed the presence of alkaloids, flavonoids, quinones, terpenes, saponins, tannins and reducing compounds, and the absence of anthraquinones.

Quantitative analysis recorded the presence of total polyphenols and flavonoids in all the extracts studied, with quantities varying from one extract to another.

The highest polyphenol content was recorded for the crude extract prepared by maceration at $262.2 \pm 0.03 \mu\text{g EAG/mg E}$. Whereas, the highest flavonoid content was revealed for the crude extract prepared by decoction at $92.3 \pm 0.026 \mu\text{g EC/mg E}$.

The extracts studied showed powerful antioxidant activity. The best iron-reducing power was recorded for ethyl acetate fractions prepared by maceration or decoction with EC50s in the order of 0.50 mg/ml and 0.59 mg/ml, respectively. In contrast, the best DPPH radical scavenging results were recorded for crude extracts prepared by decoction or maceration, with IC50s of the order of 0.53 and 0.58 mg/ml respectively. This activity remains low compared with that obtained by the reference molecules studied.

Key words: *Zizyphus lotus*, phytochemical tests, total polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, FRAP and DPPH.

Liste des abréviations

ERO : Les espèces réactives d'oxygène.

ERN : Les espèces réactives d'azote.

O₂•- : le radical superoxyde.

O₂- : le superoxyde.

•OH : le radical hydroxyle.

ROO• : le radical peroxyde.

SOD : Superoxyde dismutase.

H₂O₂ : le peroxyde d'hydrogène.

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

ABTS : (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)).

ORAC : (Capacité d'Absorption de l'Oxygène Radical).

FRAP : (Ferric Reducing Antioxidant Power).

EB : Extrait brut.

EBM : Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération.

EBD : Extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction.

FAEM : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération.

FAED : Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction.

µg Eq C/ mg Es : microgramme Equivalent catéchine par milligramme d'extrait sec.

µg EAG/ mg Es : microgramme Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec.

I (%) : Pourcentage d'inhibition

CI₅₀ : Concentrations qui inhibent 50% du radical libre DPPH.

EC₅₀ : Concentration efficace à réduire 50% du fer.

Liste des figures

Figure 1 : Image représentative de feuilles de Zizyphus Lotus.....	6
Figure 2 : Image représentative des fleurs de Zizyphus Lotus.....	7
Figure 3 : Image représentative de fruit de Zizyphus Lotus.	8
Figure 4 : Carte représentative de répartition géographique de Zizyphus Lotus.	9
Figure 5 : Balance anti-oxydants /radicaux libres.	13
Figure 6 : Classification des antioxydants.	17
Figure 7 : Le test de DPPH.	18
Figure 8 : Le test d'ABTS.	18
Figure 9 : Le test d'ORAC.	19
Figure 10 : Le test de FRAP.	20
Figure 11 : Le test de blanchiment du bêta-carotène.....	20
Figure 12 : Schéma résumant les étapes d'extraction.	25
Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	35
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.	35
Figure 15 : Le pouvoir réducteur de fer (FRAP) en présence des références ; Acide ascorbique, BHA et BHT.	37
Figure 16 : Evaluation du pouvoir réducteur du fer (FRAP) en présence d'extrait brut eau-méthanol préparé par macération (EBM) et sa fraction acétate d'éthyle (FAEM) des feuilles de Zizyphus lotus.....	37
Figure 17 : Evaluation du pouvoir réducteur du fer (FRAP) en présence d'extrait brut eau-méthanol préparé par décoction (EBD) et sa fraction acétate d'éthyle (FAED) des feuilles de Zizyphus lotus.	38
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, en présence des références ; acide ascorbique, BHA et BHT.	39
Figure 19 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, en présence d'extrait brut eau-méthanol préparé par macération (EBM) et sa fraction acétate d'éthyle (FAEM) des feuilles de Zizyphus lotus.....	40
Figure 20 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, en présence d'extrait brut eau-méthanol préparé par décoction (EBD) et sa fraction acétate d'éthyle (FAED) des feuilles de Zizyphus lotus.	40

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractéristiques des différents extraits des feuilles de <i>Zizyphus lotus</i>	33
Tableau 02 : Tests phytochimiques des extraits bruts des feuilles de <i>Zizyphus lotus</i>	34
Tableau 03 : Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les différents extraits de feuilles de <i>Zizyphus lotus</i>	36
Tableau 04 : Les valeurs d'EC50 des différents extraits des feuilles de <i>Zizyphus lotus</i> avec les molécules de référence.	38
Tableau 05 : Les valeurs d'IC50 des différents extraits de feuilles de <i>Zizyphus lotus</i> avec les molécules de référence.	41

Table des matières

المخلص	4
Résumé	5
Abstract.....	6
Liste des abréviations	7
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	9
Introduction.....	1
Première partie : Synthèse bibliographie	
Chapitre 01: Plante étudiée	
1. Historique et origine.....	5
2. Nomenclature	5
3. Classification.....	5
4. Description botanique	6
4.1. Les feuilles :	6
4.2. Les fleurs :	6
4.3. Le fruit :	7
5. Répartition géographique	8
5.1. Au Monde	8
5.2. En Afrique.....	8
5.3. En Algérie :	8
6. Composition chimique	9
7. Utilisation	9
7.1. Traditionnelle :	9
7.2. Alimentaire :	10
8. Activités biologiques.....	10
Chapitre 02 : L'activité antioxydante	
1. Le stress oxydatif	13
2. Les radicaux libres	14
2.1. Les espèces réactives	14
2.1.1. Les espèces réactives d'oxygène	14
2.1.2. Les espèces réactives d'azote	14
3. Les antioxydants	15

3.1. Les antioxydants enzymatiques	16
3.2. Les antioxydants non enzymatiques	16
4. Techniques de recherche de l'activité antioxydante	17
4.1. Les techniques antiradicalaires	17
4.2. Les techniques antioxydantes	19

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre 03 : Matériel et méthodes

1. Objectif	23
2. Matériel végétal	23
3. Préparation des extraits	23
2.1. Extraits bruts	23
2.1.1. Macération	23
2.1.2. Décocction	24
2.2. Fractionnement des extraits	24
2.3. Extraits récupérés	24
2.4. Calculs des rendements	25
4. Les tests phytochimiques	26
4.1. Les composés azotés (les alcaloïdes)	26
4.2. Les composés phénoliques	26
4.2.1. Les tanins	26
4.2.2. Les flavonoïdes	26
4.2.3. Les anthraquinones	26
4.2.4. Les quinones libres	27
4.3. Les composés terpéniques	27
4.3.1. Les terpénoïdes	27
4.3.2. Les saponines	27
4.4. Les composés réducteurs	27
5. Le dosage des composés phénoliques	27
4.5. Polyphénols totaux	27
4.6. Dosages des flavonoïdes	28
6. Evaluation de l'activité antioxydante	29
6. Analyse statistique	31

Chapitre 04 : Résultats et interprétations

1. Caractéristiques des extraits préparés	33
2. Tests phytochimiques	33
3. Le dosage des composés phénoliques	34
4. Evaluation de l'activité antioxydante	36

Discussion

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées à des fins thérapeutiques en raison de leurs propriétés thérapeutiques. Elles contiennent divers composés actifs qui leur confèrent des propriétés bénéfiques pour la santé humaine. Ces composés comprennent des polyphénols, des flavonoïdes, des terpènes, des alcaloïdes, des polysaccharides... (**Fabricant et Farnsworth, 2001; Heinrich et al., 2020**).

De plus, elles offrent une alternative naturelle et souvent plus douce aux traitements conventionnels. Leurs utilisations peuvent réduire les effets secondaires indésirables associés aux médicaments synthétiques, tout en fournissant des bienfaits thérapeutiques. Ce qui souligne leurs potentiels en tant que ressource pour le développement de nouveaux traitements (**Heinrich et al., 2020**).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), les plantes médicinales sont souvent plus accessibles et économiquement abordables dans de nombreuses régions du monde, offrant ainsi des options de traitement plus largement disponibles, en particulier dans les communautés défavorisées et les pays en développement (**OMS, 2013**).

La phytothérapie est une forme de médecine alternative qui utilise des extraits de plantes ou leurs parties, tels que les feuilles, les fleurs, les racines, les écorces et les graines, à des fins thérapeutiques. Elle repose sur les propriétés médicinales des plantes et de leurs composés actifs pour prévenir, traiter ou soulager divers troubles de santé (**Ekor, 2014**).

Elle est étroitement liée à l'activité antioxydante des plantes médicinales qui sont riches en composés actifs qui possèdent des propriétés puissantes pour la protection contre les dommages oxydatifs (**Sarikurkcü et al., 2008**).

Zizyphus lotus est une plante arbustive appartenant à la famille des *Rhamnaceae*. C'est une plante médicinale d'origine méditerranéenne et largement répandue dans divers pays. (**Bellakhdar et al., 2013**). Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour leurs propriétés bénéfiques, notamment des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, digestives et sédatives (**El Mokni et al., 2017**).

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation d'activité antioxydante, par méthode de piégeage du radical libre DPPH et la réduction du fer (FRAP), des extraits bruts eau-méthanol et leurs fractions acétate d'éthyle, préparés par macération ou décoction des feuilles séchées et broyées de *Zizyphus lotus*.

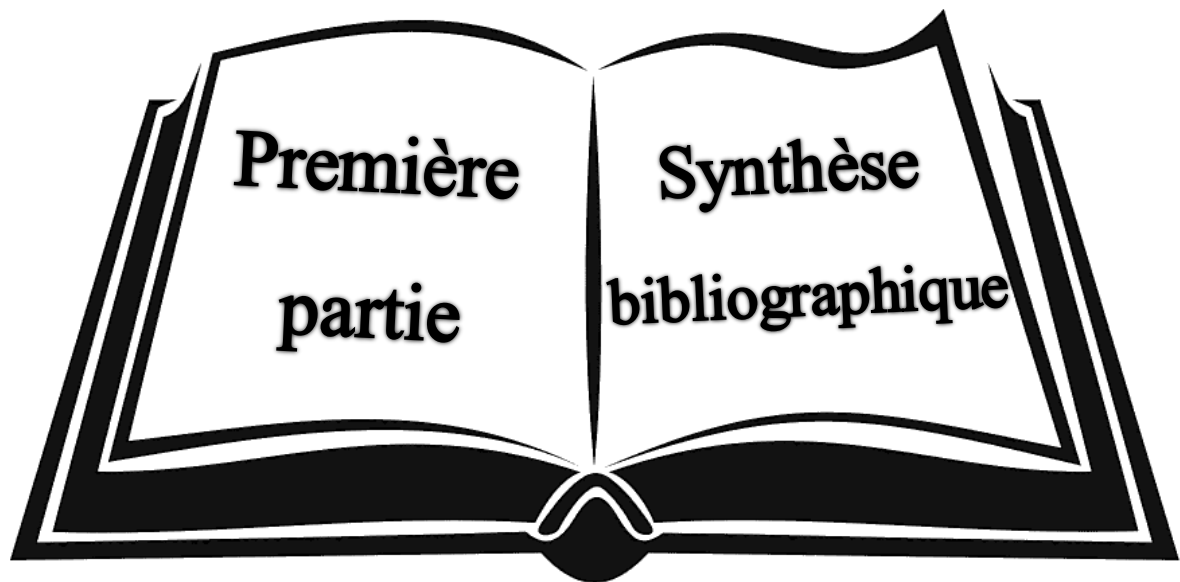
Notre étude sera présentée comme suit :

Une synthèse bibliographique qui se divise en deux chapitres :

- La plante étudiée ;
- Stress oxydatif et activité antioxydante.

Une étude expérimentale qui résume les différentes techniques réalisées et les résultats obtenus :

- Préparation des extraits de la plante étudiée ;
- Tests phytochimiques ;
- Dosage des composés phénoliques ;
- Etude du pouvoir antioxydant des extraits préparés de la plante par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, et le pouvoir réducteur du fer (FRAP).





1. Historique et origine

Zizyphus Lotus (*Z. Lotus*), aussi connu sous le nom de jujube, fait partie de la famille des Rhamnacées des angiospermes (Bhansali, 1975). Cette famille représentée par 135 à 170 espèces de *Zizyphes* (Maraghni et al., 2010). *Z. lotus* L. appelé également jujubier des lotophages ou jujubier de berbère (Bonnet, 2001).

La Chine est le pays où la culture du jujube est la plus ancienne. À ce jour, plus de 95 % de la production de jujubes est toujours concentrée en Chine (Liu et Wang, 2009).

2. Nomenclature

Le nom *Zizyphus* vient du mot grec ancien "zyziphos", qui signifie une plante épineuse, tandis que le nom spécifique lotus fait référence au fruit de la plante qui était consommé par les anciens Égyptiens et Romains (Gledhill, 2008).

Elle est connue dans différente langue :

Français	Jujubier sauvage, lotier.
Anglais	Wlid jujube, lotus tree.
Arabe	سدر بري (sidr bary), نبق بري (nebk bary), sedra (Quattrocchi., 2012).

3. Classification

Selon Quézel et Santa (1962) *Zizyphus lotus* se classe comme suit :

Règne	Végétale
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Sous classe	Dicotylédone
Ordre	Celastrales
Famille	Rhamnacée
Genre	<i>Zizyphus</i>
Espèce	<i>lotus</i>
Nom binomial	<i>Zizyphus lotus</i> L. (Quézel et Santa., 1962)

4. Description botanique

Z. Lotus est un arbuste ou petit arbre épineux et sarmenteux de la famille des Rhamnacées. Il peut atteindre une hauteur de 5 à 10 mètres et possède une écorce grise et fissurée (Arbonnier, 2019).

4.1. Les feuilles :

Les feuilles du *Zizyphus Lotus* sont alternes, simples, ovales ou oblongues, à base angulaire et apex pointu d'environ 2 à 5 cm de long et 1 à 2,5 cm de large (Al-Takriti, 1979).

Les feuilles sont d'une surface lisse verte foncée brillante au-dessus et d'un vert plus pâle au-dessous (Figure 1) (Islam et al., 2017).



Figure 1 : Image représentative de feuilles de *Zizyphus Lotus* (Photo personnelle).

4.2. Les fleurs :

Les fleurs sont hermaphrodites, petites, actinomorphes et pentamères. Elles ont un diamètre approximatif de 5 mm et sont disposées en cymes axillaires et terminales, avec 1 à 3 fleurs par cyme. Les pétales sont blancs ou verdâtres et mesurent environ 1,5 à 2 mm de long. Ils ont un calice penta lobé et une corolle à cinq pétales. Les étamines sont plus longues que les pétales et portent des anthères jaunes. Le pistil est formé de deux carpelles soudés à la base et surmonté d'un style court et bifide. La floraison a lieu de mai à juin (Figure 2) (Arbonnier, 2004 ; Maraghni et al., 2010).



Figure 2 : Image représentative des fleurs de *Zizyphus Lotus* (Photo personnelle).

4.3. Le fruit :

Le fruit de *Zizyphus lotus* est une baie de petite taille, de forme ronde à ovale, de couleur jaune à brun-rougeâtre. Il est également connu sous le nom de datte de mer ou de jujube sauvage. Le fruit est charnu et sucré, avec une saveur acidulée et légèrement astringente (Figure 3) (Belhadj et al., 2013).



Figure 3 : Image représentative de fruit de *Zizyphus Lotus*
<https://portal.wiktrop.org/species/show/760> (consulté le 14/05/2023).

5. Répartition géographique

5.1. Au Monde

Z. lotus est une plante tropicale et subtropicale qui pousse généralement dans les pays arides et semi-arides et est largement distribuée en Chine, en Iran, en Afrique, en Corée et à Chypre européenne, en Espagne, en Grèce, en Sicile (Figure 4) (Richardson et al., 2004; Adeli et Samavati, 2015).

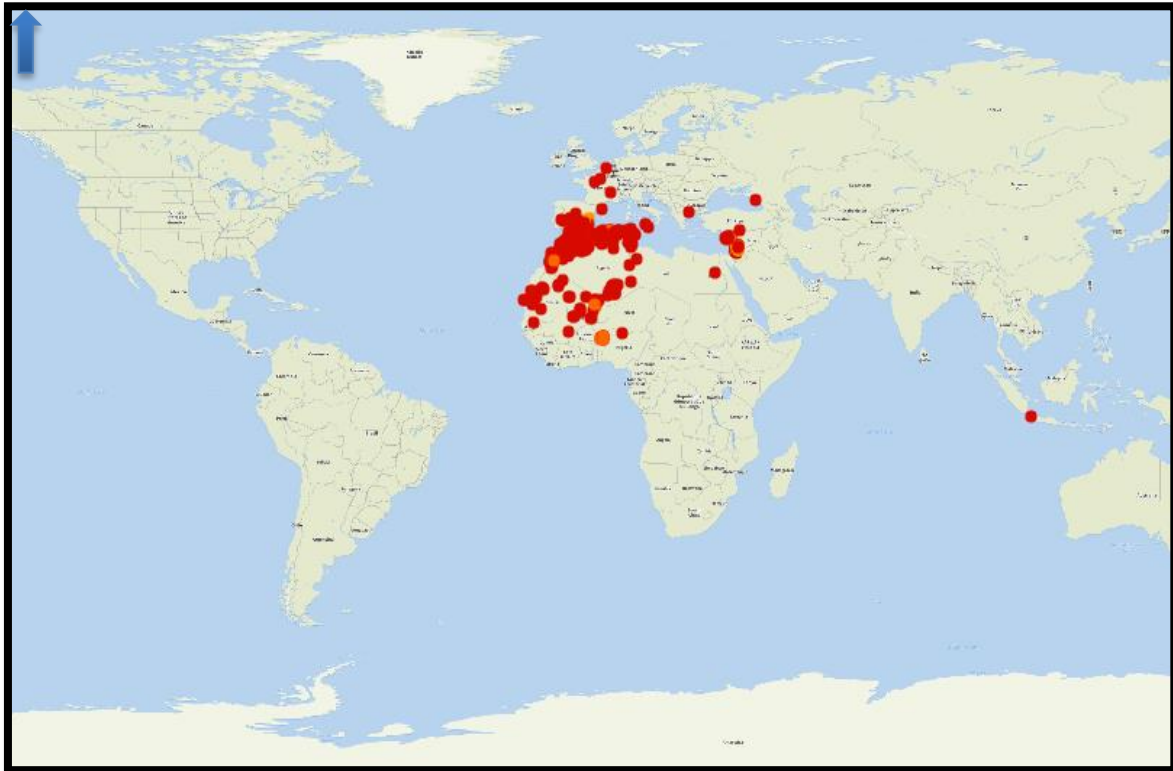


Figure 4 : Carte représentative de répartition géographique de *Zizyphus Lotus*
https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/130658/tab/carte (consulté le 02/05/2023).

5.2. En Afrique

En Afrique, *Z. Lotus* est largement distribué dans la région méditerranéenne, comme l'Algérie, le Maroc, la Tunisie, la Libye (Pottier, 1981).

5.3. En Algérie :

Z. lotus est également connu sous le nom de "Sidr" en Algérie (Bachir et al., 2016). C'est un arbuste épineux à feuilles persistantes qui pousse dans les régions semi-arides de l'Algérie (Derridj et al., 2012). Il est présent notamment dans les régions côtières et montagneuses (Ghalem et Hameurlaine, 2014).

6. Composition chimique

Les molécules bioactives les plus présentes dans la plante sont : Acides gras, Alcaloïdes, Flavonoïdes, Tanins, Saponines, Stérols, Vitamines et minéraux... (**Belarbi et Makhloufi, 2019**).

Les fruits de *Z. lotus* contiennent des polysaccharides solubles dans l'eau, ainsi que des acides aminés, des lipides, des vitamines, des minéraux tels que le calcium, le magnésium, le potassium et le fer (**Adeli et Samavati, 2015**), des flavonoïdes (**Rizzo et al., 2012**) et des alcaloïdes notamment la loturine et la lotusine (**Al-Qudah et al., 2016**).

Selon d'autre étude le fruit de *Zizyphus lotus* est riche en composés phénoliques, en particulier en acides phénoliques tels que l'acide caféique et l'acide chlorogénique. La teneur en composés chimiques de *Zizyphus lotus* peut varier en fonction de divers facteurs, tels que la région géographique de sa culture, les conditions climatiques, la saison de récolte, la partie de la plante utilisée et la méthode d'extraction employée (**Belarbi et Makhloufi, 2019**).

Ces composés ont des effets bénéfiques sur la santé, tels que la réduction du risque de maladies chroniques comme le diabète, les maladies cardiovasculaires et le cancer (**Brahmi et al., 2016**).

Les feuilles de *Z. lotus* contiennent des composés phénoliques tels que l'acide chlorogénique, l'acide férulique et la quercétine, ainsi que des flavonoïdes tels que la lutéoline et l'apigénine (**Lamia et al., 2019**).

L'écorce de *Z. lotus* contient des alcaloïdes tels que la lotusine et la lotusidine, ainsi que des triterpènes et des stérols (**Khlifi et al., 2017**).

7. Utilisation

7.1. Traditionnelle :

En médecine traditionnelle, tant en Afrique du Nord qu'au Moyen-Orient, plusieurs parties de *Z. lotus* sont administrées sous forme d'agents antiurinaires, d'antidiabétiques, d'infections cutanées, antifièvre, d'antidiarrhéiques, d'insomniaques, de sédatifs, de bronchites et d'activités hypoglycémiques (**Adzu et al., 2003 ; Anand et al., 1989**).

Les fruits de *Z. lotus* ont été utilisés traditionnellement pour leurs propriétés médicinales, notamment pour traiter les troubles gastro-intestinaux, les infections respiratoires (**Bouhlali et al., 2017**) ainsi que les troubles du sommeil et le diabète (**El Mahi et al., 2018**).

Les feuilles de *Z. lotus* sont utilisées traditionnellement pour traiter l'hypertension artérielle, les ulcères gastriques et les maladies du foie (**Lamia et al., 2019**).

Les racines de *Z. lotus* sont utilisées traditionnellement pour traiter les maux de tête, les douleurs articulaires et la constipation (**Bouhlali et al., 2017**).

7.2. Alimentaire :

Le fruit de *Zizyphus lotus* est également une source de nutriments importants grâce à sa teneur élevée de divers composés bioactifs (**Belhadj et al., 2013**). Ils sont comestibles et ont une saveur sucrée et légèrement acidulée. Ils peuvent être consommés frais, séchés ou transformés en confiture, sirop ou viennoiserie (**Al-Rawi, 2018**).

Les feuilles de *Zizyphus lotus* sont parfois utilisées comme ingrédient dans les plats traditionnels du Moyen-Orient et d'Afrique du Nord (**El Ouariachi et al., 2019**). Servant aussi comme aromatisant dans la préparation de boissons traditionnelles ou de tajines (**Lamia et al., 2019**).

Les graines de *Zizyphus lotus* peuvent être grillées et consommées comme une collation saine (**Kilani et al., 2008**).

8. Activités biologiques

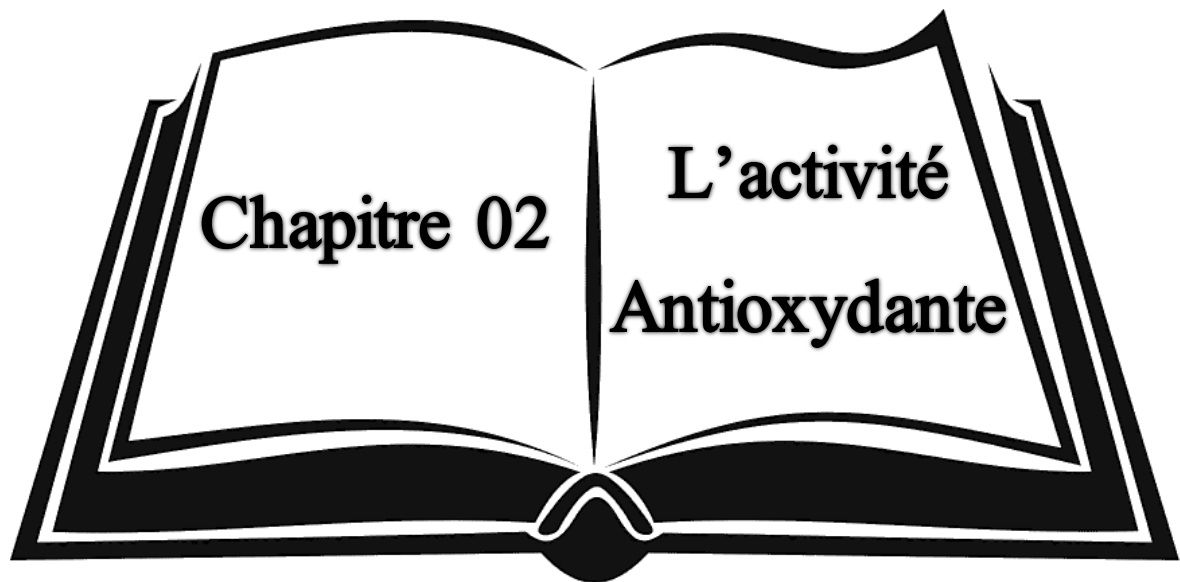
En phytothérapie, les propriétés des composés bioactifs des plantes dépendent de la partie de la plante concernée (racine, pédoncule, pulpe ou fruit) et du type d'extrait concerné. Le *Z. lotus* est connu pour sa richesse en polyphénols présentant des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, immunomodulatrices (**Abdoul-Azize et al., 2013 ; Ghazghazi et al., 2014**).

D'autres études ont montré que les extraits des feuilles de *Z. lotus* avaient une forte activité antioxydante, ce qui peut être utile pour prévenir les dommages causés par les radicaux libres dans le corps. C'est extrait ont présenté une activité antimicrobienne contre plusieurs souches de bactéries, ce qui peut aider à lutter contre les infections bactériennes (**Djilani et Dicko, 2012**).

Selon une étude, le fruit de *Zizyphus lotus* est riche en composés phénoliques, flavonoïdes et tanins, ainsi qu'en vitamines, minéraux et fibres (**Saoudi et al., 2013**). Ces composés ont été

associés à une variété d'effets bénéfiques sur la santé, tels que des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, contre plusieurs bactéries pathogènes, y compris *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* (**Bouhlali et al., 2015**). Elles ont également des propriétés anticancéreuses, analgésiques et antispasmodiques ce qui le rend utile pour soulager les douleurs abdominales (**Khouja et al., 2007**).

Une autre étude a révélé que les extraits de *Zizyphus lotus* avaient des propriétés antioxydantes significatives, qui pourraient aider à protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres et les maladies liées à l'âge (**Sulaiman et al., 2009**).



1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est connu par le déséquilibre entre l'apparition d'espèces réactives oxygène/azote (ROS/RNS) et les défenses antioxydantes cellulaires (Valko *et al.*, 2007; Waterman *et al.*, 2002).

Il résulte par la production de radicaux libres et la capacité de l'organisme à neutraliser ces derniers à l'aide des antioxydants (Figure 5) (Halliwell et Gutteridge, 2015).

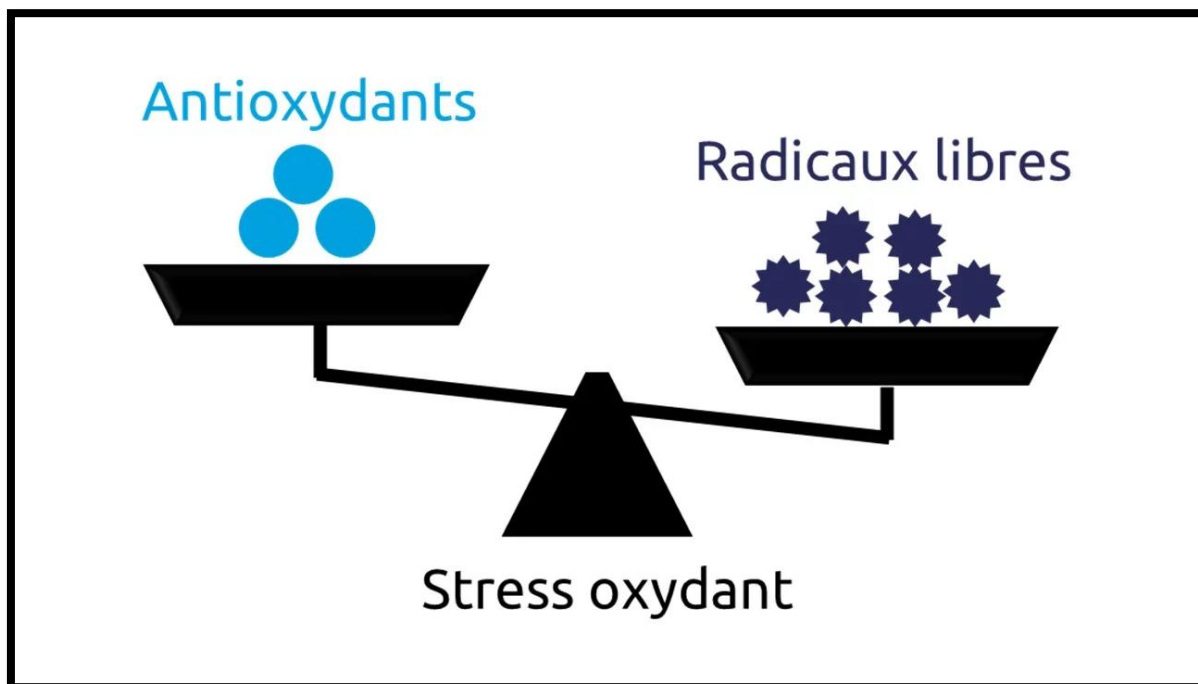


Figure 5 : Balance antioxydants /radicaux libres (Nimse et Pal., 2015)

Le stress oxydatif peut être causé par divers facteurs, notamment le vieillissement, l'exposition à des toxines environnementales, une mauvaise alimentation, un manque d'exercice physique et le stress (Halliwell et Gutteridge, 2015).

Il peut avoir de graves conséquences sur les systèmes biologiques, y compris des dommages moléculaires (comme les acides nucléiques, les lipides et les protéines) qui conduisent à la mort cellulaire (apoptose ou nécrose) (Valko *et al.*, 2007; Carocho et Ferreira., 2013).

Le stress oxydatif est considéré comme une cause importante de la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques, telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le diabète et le cancer (Sies et Jones., 2020).

2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules instables qui ont un électron non apparié dans leur couche externe. Ce dernier les rend très réactifs et capables de réagir avec d'autres molécules dans leur environnement, notamment les cellules et les tissus de l'organisme. Ils peuvent être générés par des processus naturels du corps, tels que le métabolisme cellulaire, ainsi que par des facteurs externes comme la pollution, les radiations et les toxines (**Halliwell et Gutteridge, 2015**).

2.1. Les espèces réactives

2.1.1. Les espèces réactives d'oxygène

Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) sont des molécules instables produites par le métabolisme cellulaire normal et de source environnementale, qui contiennent de l'oxygène et qui sont capables de réagir avec d'autres molécules, y compris les molécules biologiques telles que les protéines, les lipides et l'ADN (**Sies, 1997**).

Les ERO peuvent être produits à partir de sources endogènes telles que la respiration cellulaire et l'inflammation (**Sies, 1997**), comme elles peuvent également être produits à partir de sources exogènes telles que la pollution atmosphérique et l'exposition à certains produits chimiques (**Valavanidis et al., 2008**).

Les principales ERO comprennent le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical peroxyde ($ROO\bullet$) (**Halliwell et Gutteridge, 2007**).

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent causer des dommages aux cellules et aux tissus du corps humain (**Gupta et al., 2018**), aussi elles peuvent inclure le vieillissement prématuré, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le cancer et d'autres maladies chroniques (**Finkel, 2011**).

2.1.2. Les espèces réactives d'azote

Les espèces réactives d'azote (ERN) sont des molécules azotées qui peuvent interagir avec d'autres molécules biologiques telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques, par l'induction de réactions d'oxydation et de nitration qui peuvent perturber leurs fonctionnements normaux (**Smith, 2018**).

Les ERN sont impliquées dans divers processus biologiques tels que le métabolisme, la signalisation cellulaire et la réponse immunitaire, mais leurs accumulations excessives ou leurs productions incontrôlées peuvent conduire à des dommages cellulaires et à des pathologies (**Møller et Sweetlove, 2010**).

Elles peuvent inclure des dommages cellulaires, une inflammation chronique, une apoptose, une nécrose, une perturbation de la signalisation cellulaire et une altération de la fonction mitochondriale. Elles sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le cancer, le diabète et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (**Vurro et Badeck., 2014**).

3. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances qui peuvent prévenir ou ralentir les dommages causés aux cellules par les radicaux libres (**Halliwell et Gutteridge, 2015**).

Les antioxydants présentent principalement des activités basées sur trois mécanismes : le transfert d'atomes d'hydrogène, le transfert d'électrons et la chélation des métaux (**Granato et al., 2018**). Ils montrent leurs activités par trois voies différentes :

- Prévention : prévention de la formation des radicaux libres et leurs dérivés.
- Interruption : interruption des réactions d'oxydation des radicaux.
- Et inactivation : inactivation des produits de réaction des radicaux libres/dérivés radicaux (**Mirończuk-Chodakowska et al., 2018**).

Les antioxydants, tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes et les polyphénols, peuvent neutraliser les radicaux libres et prévenir ou atténuer les effets néfastes du stress oxydatif sur l'organisme (**Sies et Jones, 2020**). Ils peuvent renforcer le système immunitaire, améliorer la fonction cognitive et réduire l'inflammation et le risque de certaines maladies chroniques. Cependant, les effets bénéfiques des antioxydants peuvent varier selon leurs sources, leurs doses et leurs interactions avec d'autres éléments nutritifs (**Bhullar et Rupasinghe, 2013**).

Les antioxydants peuvent être classés de différentes façons : naturels et synthétiques ; polaires et non polaires ; enzymatiques et non enzymatiques ; endogènes et exogènes ; et par les mécanismes dans lesquels ils sont impliqués (**Mirończuk-Chodakowska et al., 2018**).

3.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont des enzymes produites par les cellules elles-mêmes pour les protéger contre les dommages causés par les radicaux libres en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et en régénérant les antioxydants (**Mates et al., 2018**). Il existe plusieurs types d'enzymes antioxydantes, chacun ayant des rôles spécifiques dans la protection des cellules :

- Superoxyde dismutase (SOD) : Cette enzyme convertit le superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène (**McCord et Fridovich, 1969**).
- Catalase : Cette enzyme décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (**Scandalios, 1993**).
- Glutathion peroxydase : Cette enzyme réduit les peroxydes organiques et inorganiques en eau et en alcool (**Arthur, 2000**).

3.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants non enzymatiques sont des molécules qui peuvent protéger les cellules contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Contrairement aux antioxydants enzymatiques, ces molécules ne sont pas produites par les cellules elles-mêmes, mais doivent être obtenues à partir de l'alimentation ou de suppléments (**Frei et Stocker, 1990**).

Voici quelques types d'antioxydants non enzymatiques :

- Vitamine C : C'est un antioxydant soluble dans l'eau qui protège les cellules contre les dommages causés par les ERO (**Carr et Maggini, 2017**).
- Vitamine E : C'est un antioxydant liposoluble qui protège les cellules contre les dommages oxydatifs causés par les ERO (**Azzi et Stocker, 2000**).
- Flavonoïdes : Ce sont des composés d'origine végétale qui ont des propriétés antioxydantes et peuvent protéger les cellules contre les dommages oxydatifs (Figure 6) (**Manach et al., 2004**).

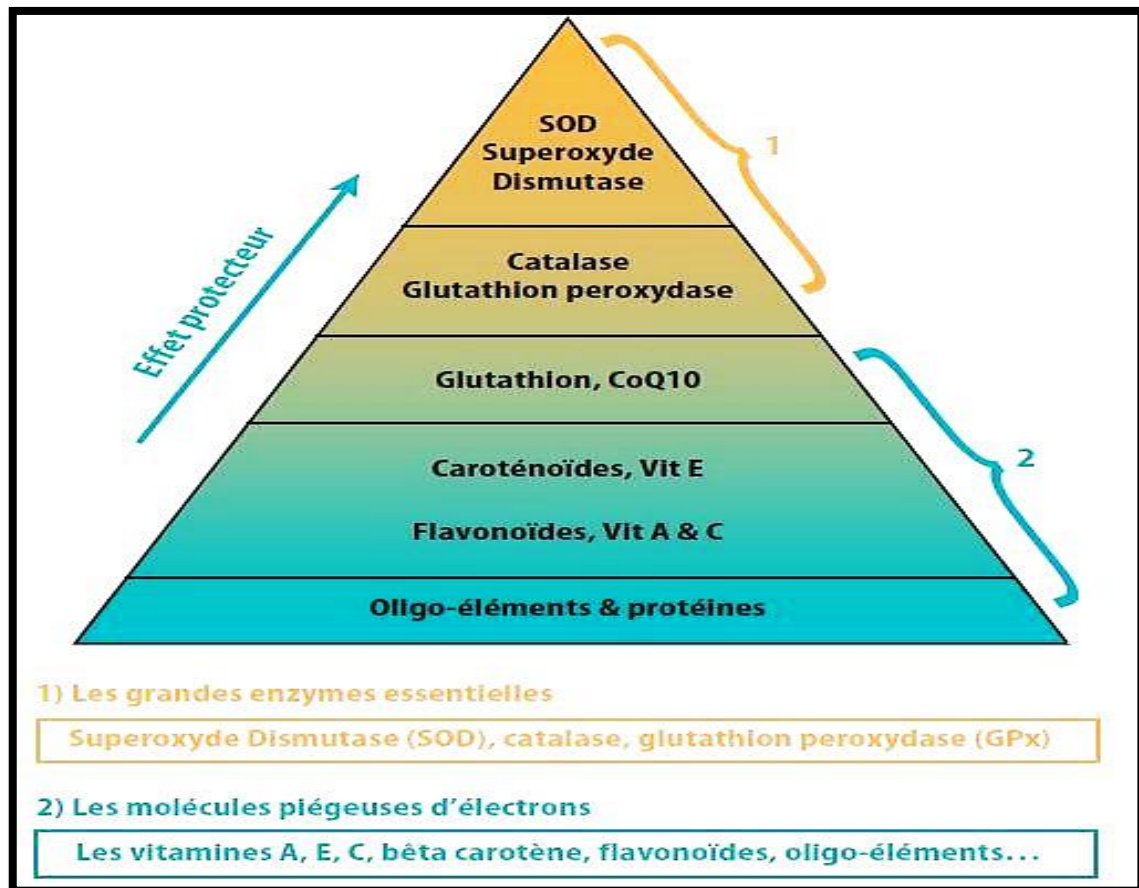


Figure 6 : Classification des antioxydants (Menvielle-Bourg, 2005).

4. Techniques de recherche de l'activité antioxydante

La recherche de l'activité antioxydante peut être réalisée par le dosage des produits formés, en particulier les hydroperoxydes, par des techniques photométriques directes ou indirectes. Elle peut également être évaluée en mesurant l'efficacité d'un composé à piéger les radicaux libres par la comparaison du piégeage d'un additif avec celui d'un antioxydant de référence (Marc *et al.*, 2004).

4.1. Les techniques antiradicalaires

Ce sont des méthodes couramment utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des composés. Elles se basent sur la capacité des antioxydants à piéger des radicaux libres, en particulier les radicaux de l'oxygène (Nimse et Pal, 2015).

- **DPPH** (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) : est l'une des méthodes les plus courantes pour évaluer l'activité antiradicalaire. Elle consiste à mesurer l'effet d'un composé sur la décoloration du radical DPPH. La réduction de la couleur violet foncé du DPPH

est proportionnelle à la capacité antiradicalaire du composé testé (Figure 6) (Mensor *et al.*, 2001).

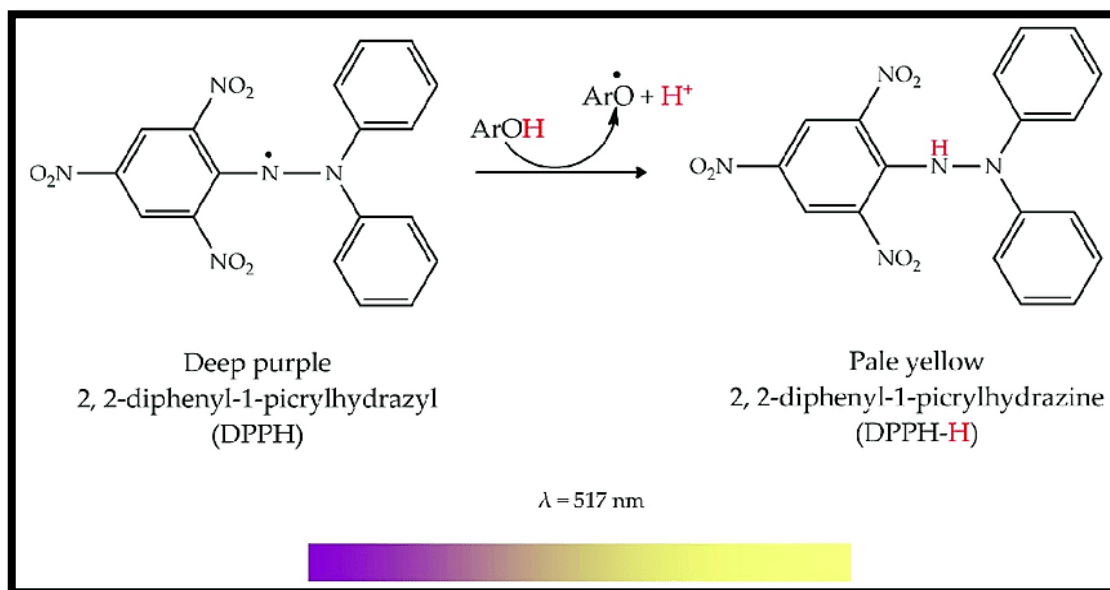


Figure 7: Le test de DPPH (Bibi Sadeer *et al.*, 2020).

- **ABTS** (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)): est basée sur la capacité d'un composé à réduire le radical ABTS^{•+}, mesurée par la diminution de la couleur verte du radical. Cette méthode a l'avantage d'être plus sensible que la méthode DPPH (Figure 7) (Re *et al.*, 1999).

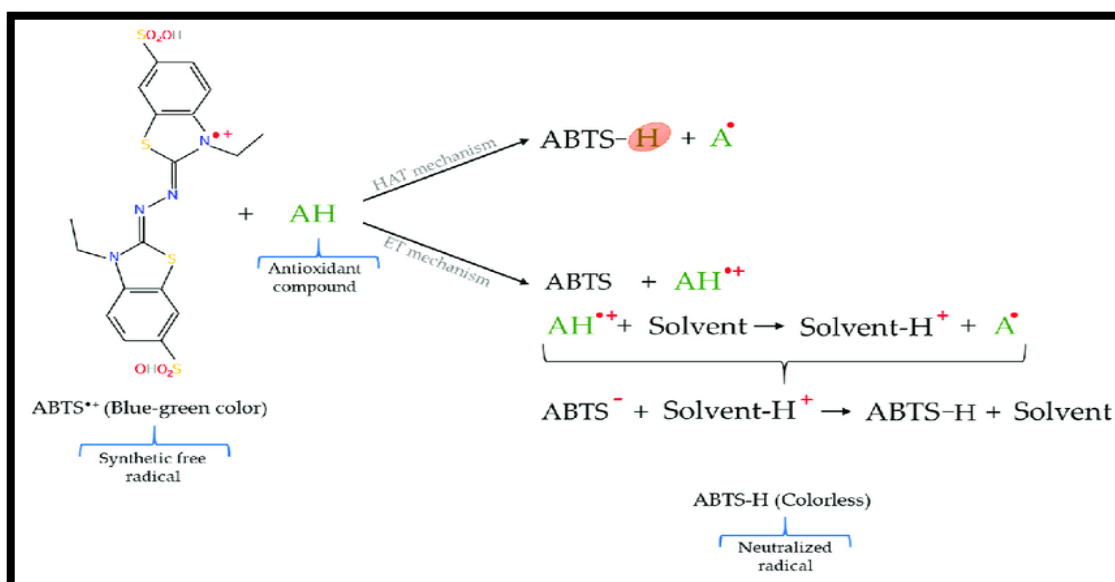


Figure 8 : Le test d'ABTS (Echegaray *et al.*, 2021).

- **ORAC** (Capacité d'Absorption de l'Oxygène Radical) : est basée sur la capacité d'un composé à neutraliser des radicaux libres générés par l'oxydation de l'amine fluorescéine. Cette méthode est considérée comme étant la plus physiologiquement pertinente, car elle mesure l'activité antiradicalaire dans un milieu aqueux qui simule l'environnement cellulaire (Figure 9) (Ou et al., 2001).

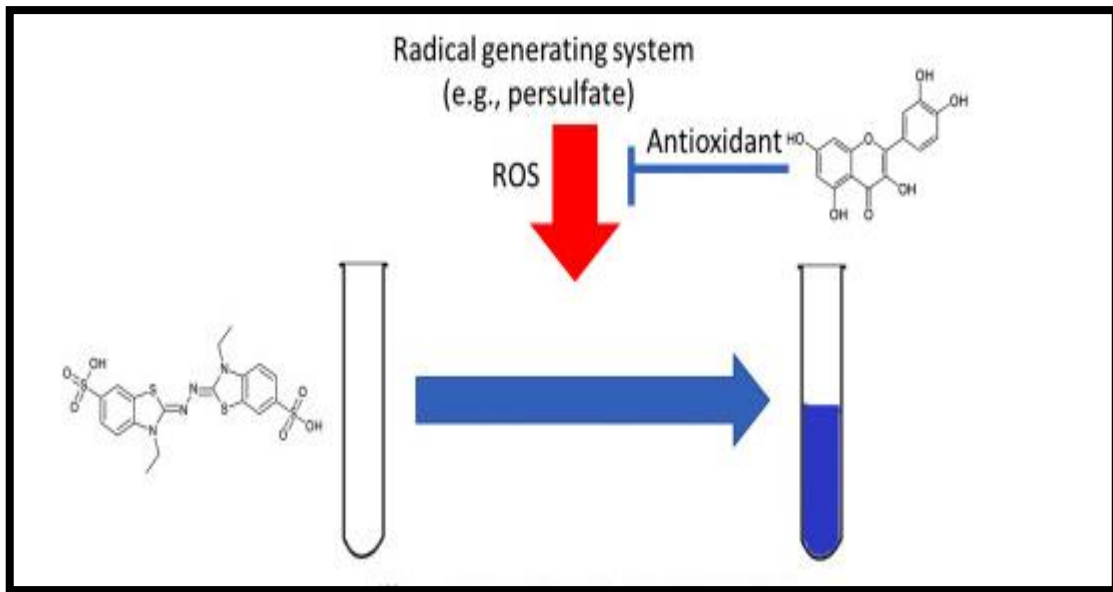


Figure 9 : Le test d'ORAC (Borlinghaus et al., 2020).

4.2. Les techniques antioxydantes

Sont plus larges et peuvent évaluer la capacité des composés à inhiber l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN.

- **FRAP** (Ferric Reducing Antioxidant Power) : est basée sur la réduction de fer ferrique Fe^{3+} en sel de fer Fe^{2+} par les antioxydants responsables à la couleur bleu, Elle est mesurée par méthode spectrophotométrique à une longueur d'onde de 593 nm (Figure 10) (Ou et al., 2001).

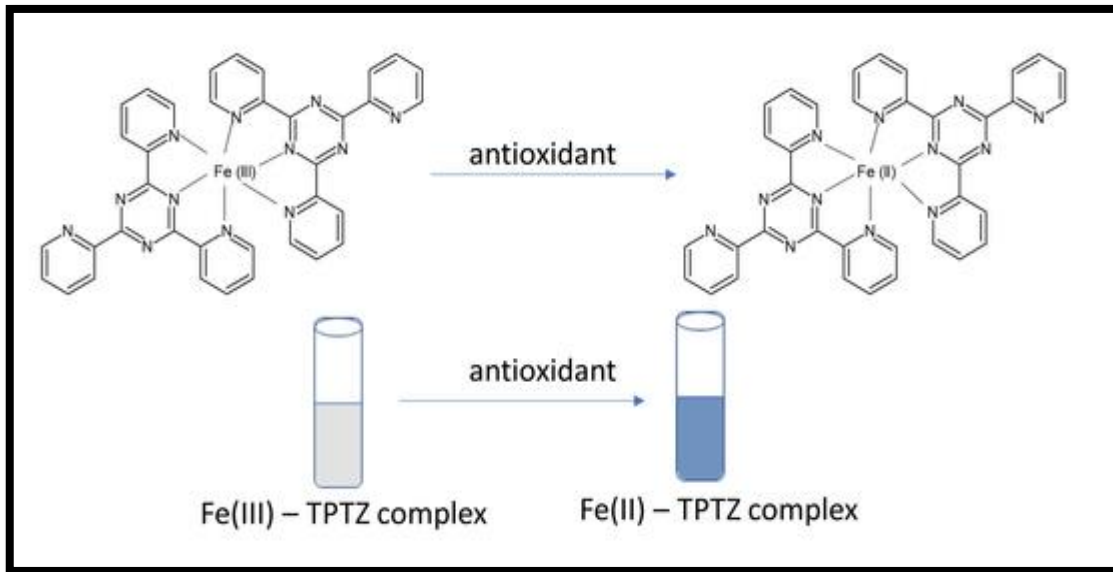


Figure 10 : Le test de FRAP (Wojtunik-Kulesza, 2020).

- **Bêta-carotène** : est basée sur la capacité d'un composé à prévenir ou ralentir l'oxydation du bêta-carotène lorsqu'il est exposé à l'oxygène et à la chaleur qu'il conduit à sa décoloration en perdant sa couleur orange et devient incolore (Figure 11) (Kong *et al.*, 2006).

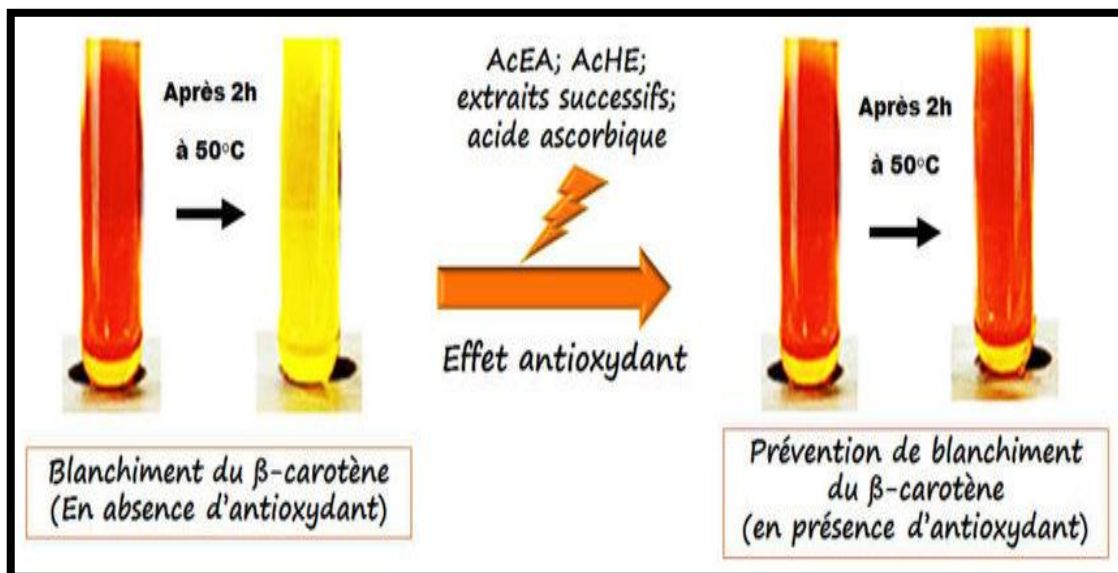
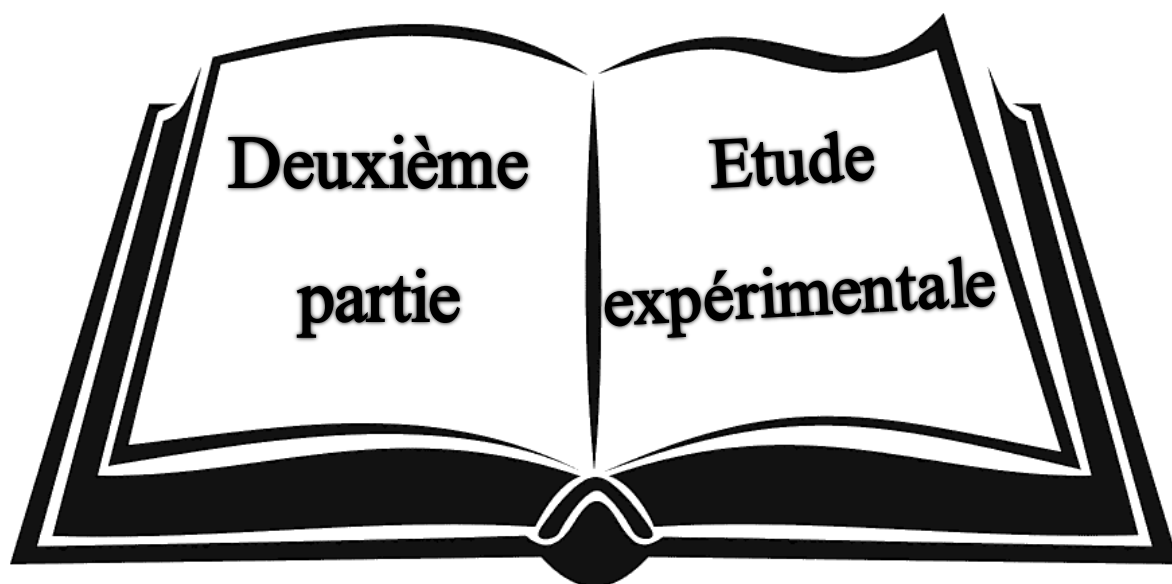


Figure 11 : Le test de blanchiment du bêta-carotène (Dib, 2017).





1. Objectif

Notre travail est réalisé au sein du laboratoire de recherche antibiotiques, antifongiques, physico-chimie, synthèse et activités biologiques « **LAPSAB** », Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et l'univers, Université Abou Bekr Belkaïd « Tlemcen ».

L'objectif de notre travail est l'étude phytochimique, le dosage des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés à partir des feuilles de *Zizyphus Lotus*.

2. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles de *Zizyphus lotus*, récoltées dans la région de Nedroma, la wilaya de Tlemcen en Novembre 2022. Les feuilles ont été séchées à l'ombre à l'abri de la lumière, à température ambiante et préservées dans une boîte en verre. Après séchage, les feuilles ont été broyées en petits morceaux pour la préparation des extraits.

3. Préparation des extraits

Les extraits ont été préparés par un solvant hydro-méthanolique (eau/ méthanol (30/70 : v/v)).

2.1. Extraits bruts

2.1.1. Macération

Une masse de 10 g du matériel végétal a été macérée avec un volume de 150 ml du solvant, eau/ méthanol (30/70 : v/v), pendant 48 heures à l'abri de la lumière et à une température ambiante avec une agitation. Par la suite, une filtration sur un papier filtre a été effectuée pour obtenir un filtrat qui va être évaporé pour l'élimination du méthanol à l'aide d'un Rotavapor à 60°C.

Après évaporation, 10ml de l'extrait brut a été récupéré afin de réaliser les analyses phytochimiques et le reste a été séché dans une étuve à 35°C puis conservé pour des analyses biologiques.

Une deuxième macération a été réalisée, afin de récupérer la phase aqueuse après évaporation du méthanol pour fractionnement liquide/liquide avec des solvants organiques.

2.1.2. Décoction

Une masse de 10 g du matériel végétal décoctée, sous reflux à une température d'ébullition stable, avec un volume de 200 ml du solvant pendant 45 minutes. Par la suite, une filtration sur un papier filtre a été effectuée pour obtenir un filtrat qui va être évaporé pour l'élimination du méthanol à l'aide d'un Rotavapor à 60°C.

Après évaporation, 10ml de l'extrait brut a été récupéré afin de réaliser les analyses phytochimiques et le reste a été séché dans une étuve à 35°C puis conservé pour des analyses biologiques.

Une deuxième décoction a été réalisée, afin de récupérer la phase aqueuse après évaporation du méthanol pour fractionnement liquide/liquide avec des solvants organiques.

2.2. Fractionnement des extraits

Après la récupération des extraits bruts préparés par macération ou décoction, une extraction liquide-liquide a été réalisée à l'aide de l'ampoule à décanter par le solvant n-Hexane (v/v) puis deux fractionnements successifs par l'acétate d'éthyle (v/v).

La phase organique ainsi récupérée est évaporée à sec à l'aide d'un Rotavapor à 60°C et conservée à l'abri de la lumière pour des analyses phytochimiques et biologiques.

2.3. Extraits récupérés

Quatre extraits ont été récupérés pour des analyses phytochimiques et biologiques :

- Extrait brut hydrométhanolique préparé par macération (**EBM**) ;
- Extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction (**EBD**) ;
- Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par macération (**FAEM**) ;
- Fraction acétate d'éthyle de l'extrait brut hydrométhanolique préparé par décoction (**FAED**).

La figure 12 résume les différentes méthodes de préparation des extraits bruts hydrométhanoliques et leurs fractions préparées à partir des feuilles séchées et broyées de *Zizyphus lotus*.

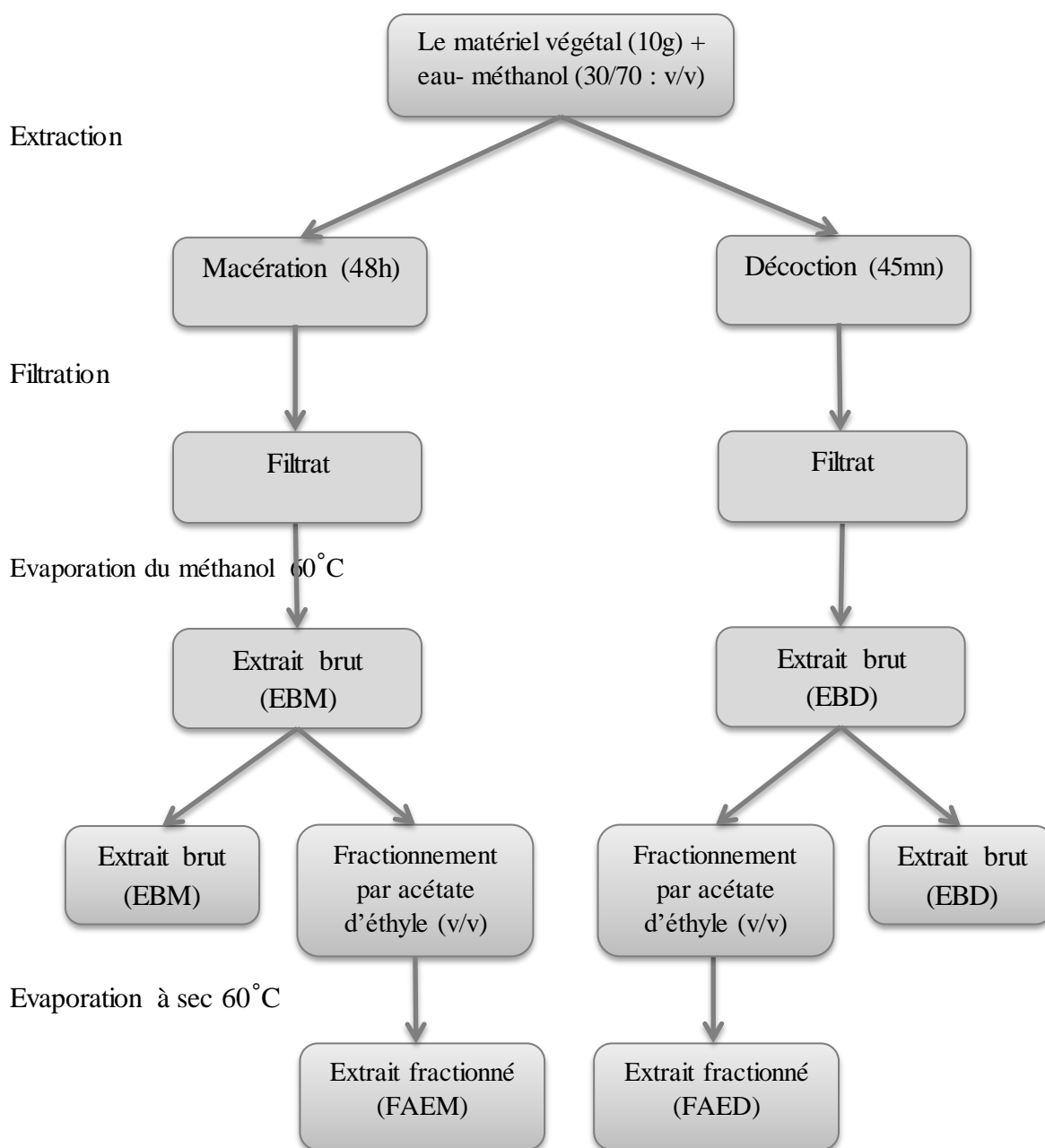


Figure 12 : Schéma résumant les étapes d'extraction.

2.4. Calculs des rendements

Le rendement c'est le rapport entre la masse d'extrait après l'évaporation (M) du solvant et la masse du matériel végétal utilisé (M₀), il est exprimé en pourcentage.

Le pourcentage du rendement de chaque extrait a été calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

Avec :

R: Rendement exprimé en %.

M: masse de l'extrait obtenu après évaporation exprimée en gramme (g).

M₀: masse initiale du matériel végétal en (g).

4. Les tests phytochimiques

Les extraits bruts hydrométhanoliques (EBM et EBD) ont été soumis à une analyse qualitative pour déterminer les principaux métabolites secondaires présents dans les feuilles de la plante étudiée. Cette analyse est réalisée selon les techniques décrites par **Bruneton (1999)** **Harbone (1998)** et basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation.

4.1. Les composés azotés (les alcaloïdes)

Dans deux tubes à essai, nous avons introduit 0,5 ml de l'extrait à analyser, nous avons acidifié le milieu par quelques gouttes de HCl (1%) et nous avons ajouté 0,5 ml de réactif Mayer dans le premier tube et 0,5 ml de réactif Wagner dans le deuxième tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement, révèle la présence des alcaloïdes.

4.2. Les composés phénoliques

4.2.1. Les tanins

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 ml d'extrait à analyser et nous avons ajouté 0,25 ml d'une solution aqueuse de FeCl₃ (1%), le mélange est incubé pendant 15 min à température ambiante. La coloration verdâtre ou bleu noirâtre, indique la présence des tanins.

4.2.2. Les flavonoïdes

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 ml d'extrait à analyser et nous avons ajouté 01 ml de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rose, rouge ou jaune indique la présence des flavonoïdes.

4.2.3. Les anthraquinones

Dans un tube à essai, on introduit 1 ml d'extrait à analyser et on ajoute 1 ml de NH₄OH (10%) ensuite on l'agite. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

4.2.4. Les quinones libres

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 ml d'extrait à analyser et nous avons ajouté 0.1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (1%). L'apparition d'une coloration jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

4.3. Les composés terpéniques

4.3.1. Les terpénoïdes

Test de Slakowski: dans un tube à essai, nous avons introduit 1 ml d'extrait à analyser et nous avons ajouté 0,4 ml de chloroforme et 0,6 ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et une couleur marron à l'interphase, indique la présence des terpénoïdes.

4.3.2. Les saponines

Dans un tube à essai, nous avons introduit 10 ml d'extrait à analyser, puis nous avons agité pendant 15 secondes et le laisse au repos 15 min. L'apparition d'une mousse à hauteur supérieure à 1 cm, indique la présence des saponines.

4.4. Les composés réducteurs

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 ml d'extrait à analyser, nous avons ajouté 0.1 ml de liqueur de Fehling (0.5 ml de réactif A et 0.5 ml de réactif B) et nous avons incubé pendant 8 min au bain marie bouillant. L'apparition d'une précipitation rouge brique, indique la présence des composés réducteurs.

5. Le dosage des composés phénoliques

4.5. Polyphénols totaux

Afin de déterminer la teneur en polyphénols des quatre extraits étudiés, nous avons suivi le protocole décrit par **Vermerius** et **Nicholson (2006)**.

➤ Principe

Le réactif Folin-Ciocalteu de couleur jaune est composé de l'acide phosphotungstique ($H_3PMo_{12}O_4$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation par les composés phénoliques, il est réduit en un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleue qui absorbe à une longueur d'onde de 725 nm. Cette couleur est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

➤ **Protocole**

- ✓ Mélanger 100 µl de chaque extrait (1mg/ml) avec 2000µl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2 %) ;
- ✓ Agiter et incuber les tubes pendant 5min à température ambiante ;
- ✓ Ajouter 100µl de réactif de Folin-Ciocalteu (1 N) ;
- ✓ Incuber pendant 30min à température ambiante et à l'obscurité ;
- ✓ Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 700 nm.

En parallèle, une gamme d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires à partir de l'acide gallique à différentes concentrations (25 à 300µg /ml).

Les résultats sont exprimés en microgramme Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (µg EAG/ mg Es).

4.6. Dosages des flavonoïdes

Pour le dosage des flavonoïdes contenus dans les quatre extraits étudiés, nous avons suivis le protocole décrit par **Zhishen et al., (1999)**.

➤ **Principe**

L'oxydation des flavonoïdes dans un milieu alcalin par le nitrite de sodium (NaNO_2) et le chlorure d'aluminium (AlCl_3) donne un complexe de couleur rose absorbant à 510 nm.

➤ **Protocole**

- ✓ Mélanger 250 µl de chaque extrait (1mg/ml) avec 1 ml d'eau distillée et 75µl de nitrite de sodium NaNO_2 (15 %) ;
- ✓ Après 6 minutes d'incubation à température ambiante, ajouter au mélange 75 µl de trichlorure d'aluminium AlCl_3 (10 %) ;
- ✓ Incuber l'ensemble pendant 6 minutes, et ajouter, 1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (4 %) ;
- ✓ Compléter le volume finale à 2,5 ml ;
- ✓ Agiter et incuber le mélange à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

En parallèle, une gamme d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires à partir de la catéchine à différentes concentrations (50 à 400µg /ml).

Les résultats sont exprimés en microgramme Equivalent catéchine par milligramme d'extrait sec ($\mu\text{g Eq C/ mg Es}$).

6. Evaluation de l'activité antioxydante

La recherche de l'activité antioxydante (*in vitro*), des extraits brut eau-méthanol préparés par décoction ou macération (EBM et EBD) et leurs fractions organique acétate d'éthyle (FAEM et FAED), a été évaluée par le test du piégeage du radical libre DPPH' et le test du pouvoir réducteur de fer (FRAP).

5.1. Test de pouvoir réducteur de fer (Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP))

➤ Principe

La réduction de fer ferrique Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux Fe^{2+} , en présence des antioxydants, est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 700 nm.

Cette méthode est réalisée selon le protocole décrit par **Karagözler et al., (2008)**.

➤ Protocole

- ✓ Mélanger 100 μl de l'extrait à différentes concentrations (0,1 - 1 mg/ml pour l'extrait brut et la fraction organique), avec 250 μl d'une solution tampon phosphate 0,2 M (PH 6,6) et 250 μl d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%) ;
- ✓ Incuber l'ensemble à 50° C pendant 20 minutes dans l'étuve ;
- ✓ Laisser le mélange refroidis ;
- ✓ Ajouter 250 μl de l'acide trichloracétique TCA (10%) pour stopper la réaction ;
- ✓ Centrifuger l'ensemble à 3000 rpm pendant 10 min ;
- ✓ Combiner 500 μl de surnageant avec 500 μl d'eau distillée et 100 μl d'une solution aqueuse de chlorure de fer (FeCl_3) (0,1 %) ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 725 nm contre un blanc, préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol ;
- ✓ Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

Le contrôle positif est représenté par des solutions standards ; acide ascorbique, le BHA et le BHT. Il est réalisé dans les mêmes conditions que les extraits, en mesurant l'absorbance dans différentes concentrations (0,01 à 0,4 mg/ml).

➤ Calcul d'EC₅₀

L'EC₅₀ c'est la concentration efficace de l'extrait qui donne une réponse demi-maximale. Ce paramètre est calculé graphiquement à partir des courbes de régressions linéaires d'absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits étudiés. Il détermine l'extrait le plus efficace avec la valeur la plus faible en EC₅₀.

5.2. Test du piégeage du radical libre DPPH

➤ Principe

Le DPPH est un radical libre qui possède une couleur violet en solution. Lorsqu'un antioxydant est ajouté à une solution de DPPH, il peut le réduire en lui donnant un électron, ce qui entraîne une décoloration de violet au jaune. L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait testé se fait en mesurant la diminution de l'absorbance de la solution à 517 nm (Mensor *et al.*, 2001).

Cette méthode est réalisée selon le protocole de Atoui *et al.*, (2005).

➤ Protocole

- ✓ L'addition de 1950 µl DPPH (0,0025g fraîchement préparé dans 100 ml du méthanol) avec 50µl des solutions d'extraits à différentes concentrations de (0,1 à 1mg/ ml) ;
- ✓ Pour chaque concentration, un blanc est préparé contenant 50 µl de chaque concentration d'extrait et 1950 µl du méthanol ;
- ✓ En parallèle, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl de la solution méthanolique de DPPH ;
- ✓ La lecture de l'absorbance est faite à 517 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante ;

Les contrôles positifs sont représentés par des solutions d'antioxydants standards ; l'acide ascorbique, le BHA et le BHT dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les extraits. Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois.

➤ Calcul des pourcentages d'inhibition

$$I (\%) = [(A \text{ cont} - A \text{ éch}) / A \text{ cont}] \times 100$$

Avec :

I (%): Pourcentage d'inhibition

A cont : Absorbance du contrôle négatif

A éch : Absorbance de l'échantillon testé

➤ **Calcul des CI₅₀**

Le CI₅₀ signifie la concentration de l'extrait qui peut inhiber 50% du radical libre DPPH. Il est calculé graphiquement à partir des équations des courbes de régressions logarithmiques des pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations des extraits testés. Ce paramètre détermine l'extrait le plus efficace avec la valeur la plus faible en CI₅₀.

6. Analyse statistique

Les teneurs en composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits étudiés sont présentés par la moyenne et l'écart-type de trois répétitions :

➤ **la moyenne :**

$$\bar{x} = \frac{n_1 \times x_1 + n_2 \times x_2 + \dots + n_p \times x_p}{n_1 + n_2 + \dots + n_p}$$

➤ **l'écart-type :**

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$



1. Caractéristiques des extraits préparés

L'extraction eau-méthanol (30/70 : v/v) des feuilles séchées et broyées de *Zizyphus lotus*, par macération (48h) ou décoction (sous reflux 45 min), suivie d'un fractionnement par acétate d'éthyle, nous a permis de récupérer quatre extraits :

Macération : un extrait brut (EBM) et sa fraction récupérée par l'acétate d'éthyle (FAEM).

Décoction : un extrait brut (EBD) et sa fraction récupérée par l'acétate d'éthyle (FAED).

Le **tableau 01** regroupe les caractéristiques des extraits obtenus (Rendement, Aspect, couleur et solubilité).

Tableau 01 : Caractéristiques des différents extraits des feuilles de *Zizyphus lotus*.

Extrait	Macération		Décoction	
	EBM	FAEM	EBD	FAED
Rendement %	15,43	2,8	13,35	0,97
Aspect	Poudre cristallisée	Poudre fine	Poudre cristallisée	Poudre fine
Couleur	Vert foncé	Vert foncé	Vert foncé	Vert foncé
Solubilité	Eau distillée	Méthanol	Eau distillée	Méthanol

Macération : extrait brut (EBM) et sa fraction acétate d'éthyle (FAEM) ; Décoction : extrait brut (EBD) et sa fraction acétate d'éthyle (FAED).

D'après les résultats obtenus nous avons observé que tous les extraits ont une couleur vert foncé avec différents aspects ; des cristaux, solubles dans l'eau distillée, pour les extraits bruts (EBM et EBD) et de poudre fine, solubles dans le méthanol, pour leur fractions (FAEM et FAED).

Par ailleurs, nous avons noté des rendements élevés pour les extraits bruts EBM et EBD avec des pourcentages d'ordre de 15,43% et 13,35%.

2. Tests phytochimiques

La présence ou l'absence des différents métabolites secondaires a été détecté par une analyse qualitative basée sur la formation d'une mousse, le changement de couleur et/ou la précipitation.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant

Tableau 02 : Tests phytochimiques des extraits bruts des feuilles de *Zizyphus lotus*.

Métabolites secondaires	Tests/Réactifs	EBM	EBD
Alcaloïdes	Mayer	+	+
	Wagner	++	++
Tanins	FeCl ₃ (1%)	+++	+++
Flavonoïdes	MgCl ₂	-	+
Anthraquinones	NH ₄ OH (10%)	-	-
Quinones libres	NaOH (1%)	+	+
Terpénoïdes	Slakowski	+++	+
Saponines	Test de mousse	+++	+++
Composés réducteurs	Liquueur de Fehling	+++	+++

(+++) Test fortement positif, (++) test moyennement positif, (+) test positif, (-) test négatif

EBM : Extrait brut préparé par macération ; EBD : extrait brut préparé par décoction.

D'après les résultats des tests phytochimiques, regroupée dans le tableau ci-dessus, nous avons noté la richesse des feuilles *Zizyphus lotus* en métabolites secondaires. Nous avons révélé la présence des alcaloïdes, des tanins, des quinones libres, des terpénoïdes, des saponines et des composés réducteurs dans les deux extraits bruts préparés (EBM et EBD) et les flavonoïdes seulement dans l'extrait brut préparé par décoction (EBD).

De même, nous avons marqué l'absence des anthraquinones dans les deux extraits bruts étudiés.

3. Le dosage des composés phénoliques

Le dosage des composés phénoliques dans les extraits bruts hydro-méthanolique (EBM et EBD), ainsi que dans leurs fractions acétate d'éthyle (FAEM et FAED), issus des feuilles de *Zizyphus lotus* a été effectué à l'aide de deux méthodes spectrophotométriques courantes : la méthode Folin-Ciocalteu pour le dosage des polyphénols totaux et la réaction avec le trichlorure d'aluminium en milieu alcalin pour le dosage des flavonoïdes.

Les teneurs en polyphénols totaux sont déterminées à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique ($y = 0,0018x$, $R^2 = 0,995$) (Figure 13). Tandis que les teneurs en flavonoïdes sont déterminées à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de la catéchine ($y = 0,0026x$, $R^2 = 0,999$) (Figure 14).

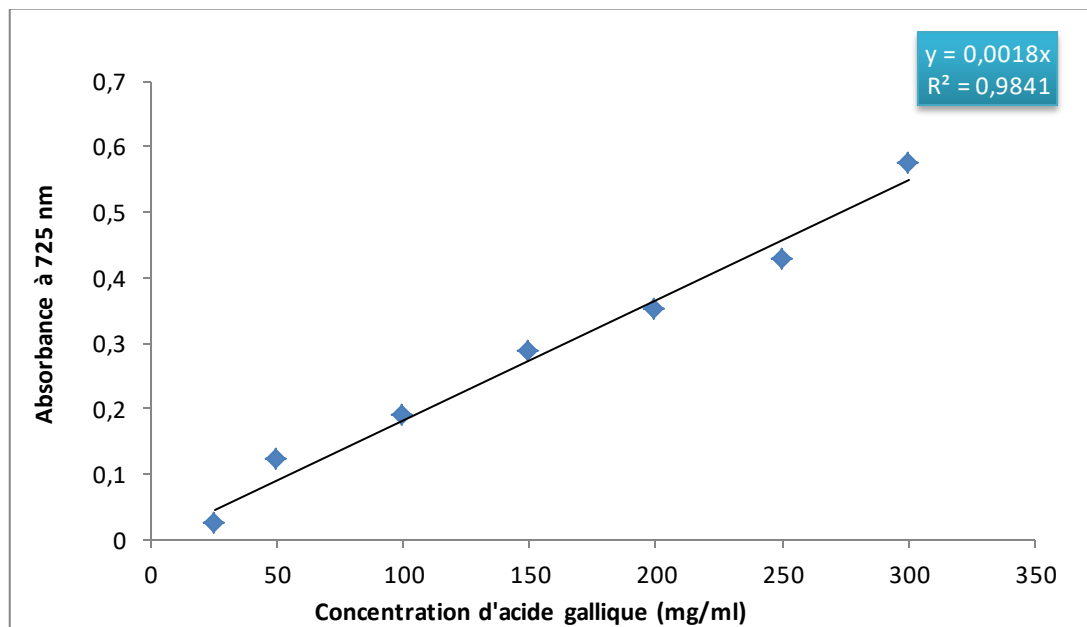


Figure 13 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

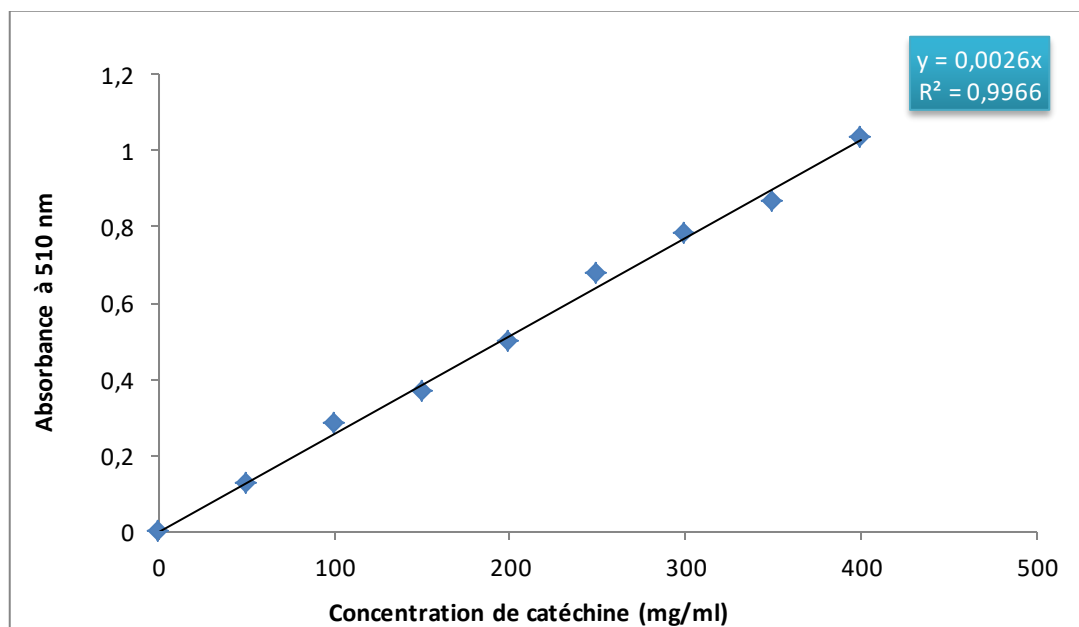


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Le **tableau 03** regroupe les résultats des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits préparés des feuilles de *Zizyphus lotus*.

Tableau 03 : Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les différents extraits de feuilles de *Zizyphus lotus*.

Extrait	Macération		Décoction	
	EBM	FAEM	EBD	FAED
Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mg E}$) \pm Ecart type (n=3)	262,2 \pm 0,03	120,9 \pm 0,001	233,6 \pm 0,003	73,2 \pm 0,02
Flavonoïdes ($\mu\text{g EC/mg E}$) \pm Ecart type (n=3)	57,7 \pm 0,056	87,2 \pm 0,05	92,3 \pm 0,026	74,4 \pm 0,006

Macération : extrait brut (EBM) et sa fraction acétate d'éthyle (FAEM) ; Décoction : extrait brut (EBD) et sa fraction acétate d'éthyle (FAED).

D'après les résultats obtenus, nous avons enregistré les teneurs les plus élevées en polyphénols pour les extraits bruts préparés par macération (EBM) et décoction (EBD), par rapport à leurs fraction (FAEM et FAED), avec des teneurs de l'ordre de 262,2 \pm 0,03 $\mu\text{g EAG/mg E}$ et 233,6 \pm 0,003 $\mu\text{g EAG/mg E}$, respectivement.

Par ailleurs, nous avons noté la teneur la plus élevée en flavonoïdes pour l'extrait brut préparé par macération (EBM), avec une teneur de l'ordre de 92,3 \pm 0,026 $\mu\text{g EC/mg E}$, suivi par la fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par macération (FAEM), avec une teneur de l'ordre de 87,2 \pm 0,05 $\mu\text{g EC/mg E}$.

4. Evaluation de l'activité antioxydante

4.1. Test de pouvoir réducteur du fer (FRAP)

La capacité des différents extraits préparés à partir des feuilles de *Zizyphus lotus* pour réduire le fer a été évaluée en comparaison avec celle de molécules de référence : l'acide ascorbique, le BHA et le BHT.

Les absorbances des différentes concentrations des références ou des extraits préparés ont été représentées par des courbes de régression linéaire (Figure 15, 16 et 17).

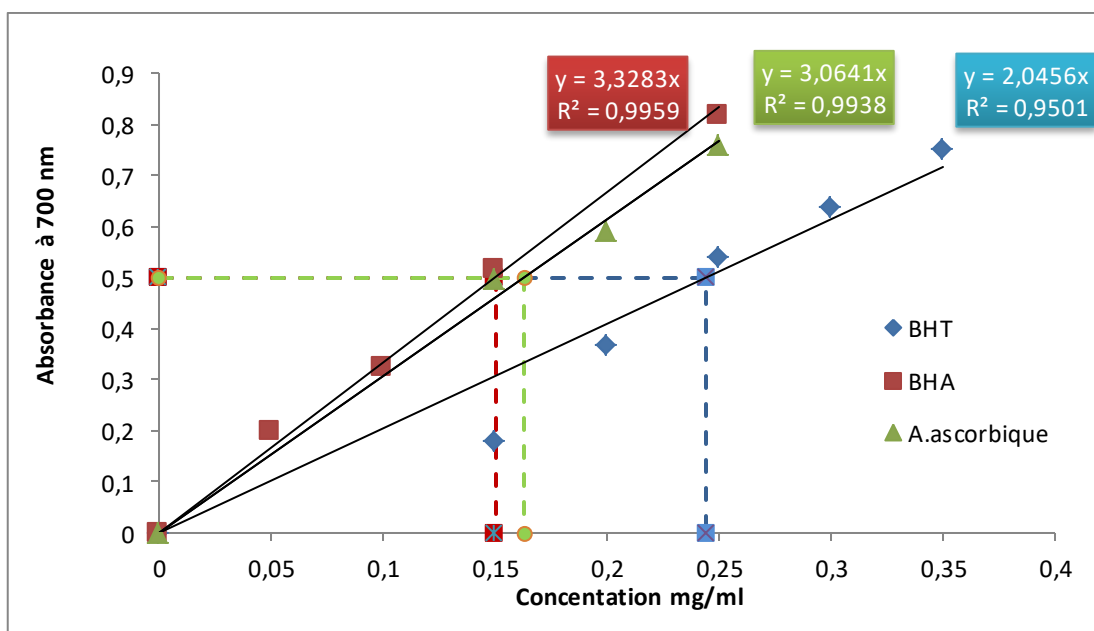


Figure 15 : Le pouvoir réducteur de fer (FRAP) en présence des références ; Acide ascorbique, BHA et BHT.

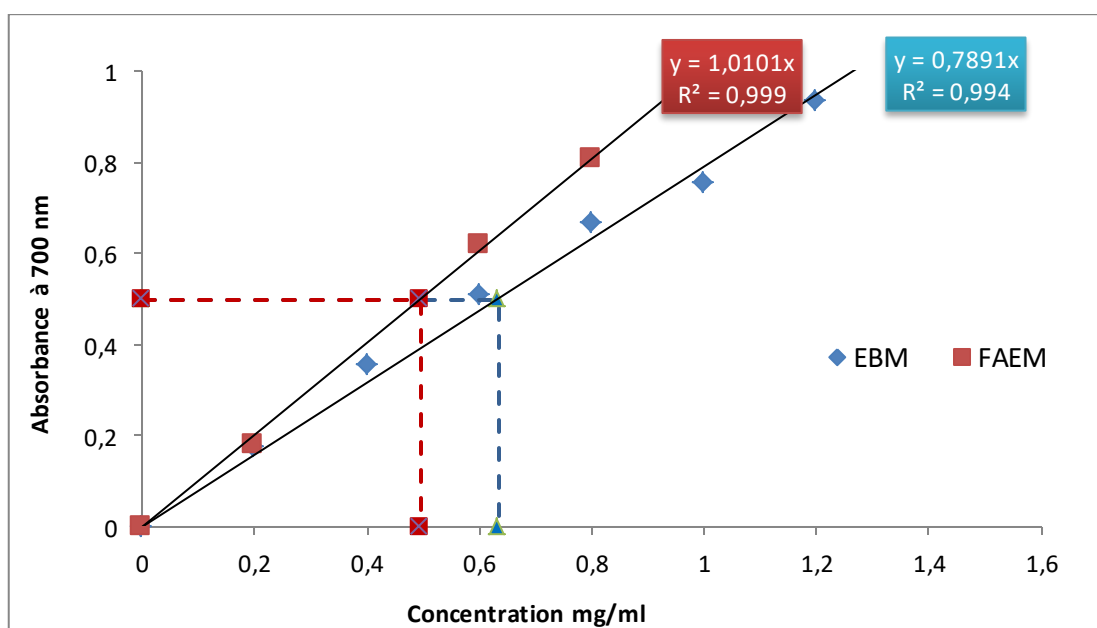


Figure 16 : Evaluation du pouvoir réducteur du fer (FRAP) en présence d'extrait brut eau-méthanol préparé par macération (EBM) et sa fraction acétate d'éthyle (FAEM) des feuilles de *Zizyphus lotus*.

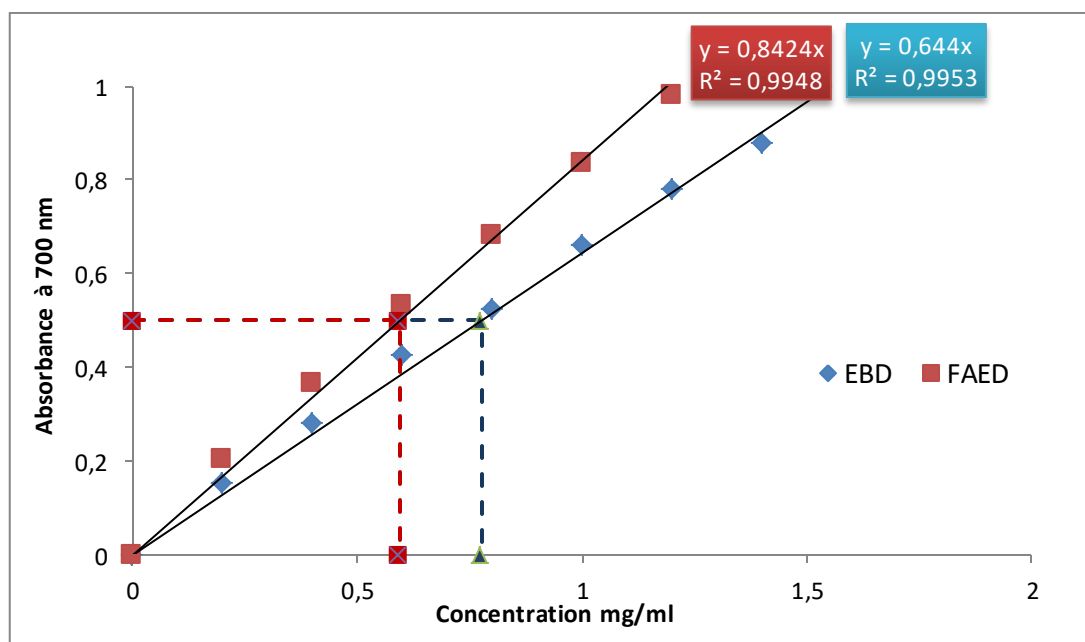


Figure 17 : Evaluation du pouvoir réducteur du fer (FRAP) en présence d'extrait brut eau-méthanol préparé par décoction (EBD) et sa fraction acétate d'éthyle (FAED) des feuilles de *Zizyphus lotus*.

Les valeurs d'EC₅₀ permettent de quantifier et de comparer l'activité réductrice des extraits par rapport aux molécules de référence. Elles sont déterminées graphiquement à partir des courbes de régressions linéaires d'absorbances en fonction des différentes concentrations des extraits étudiés (tableau 04).

Tableau 04 : Les valeurs d'EC₅₀ des différents extraits des feuilles de *Zizyphus lotus* avec les molécules de référence.

EC ₅₀ (mg/ml)			
Références	Acide ascorbique		0,16
	BHA		0,15
	BHT		0,24
Extraits	Macération	EBM	0,63
		FAEM	0,5
	Décoction	EBD	0,78
		FAED	0,59

Macération : extrait brut (EBM) et sa fraction acétate d'éthyle (FAEM) ; Décoction : extrait brut (EBD) et sa fraction acétate d'éthyle (FAED).

A partir des résultats obtenus, nous avons enregistré un meilleur pouvoir réducteur du fer pour la fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par macération (FAEM) avec un EC50 égale à 0,5 mg/ml, suivi par la fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait brut préparé par décoction (FAED) avec un EC50 d'ordre de 0,59 mg/ml. Ces activités restent faibles par rapport à l'acide ascorbique, le BHA et le BHT, standards étudiés dans les mêmes conditions, qui ont enregistré des EC50 d'ordre de 0,16 mg/ml, 0,15mg/ml et 0,20 mg/ml, respectivement.

4.2. Test du piégeage du radical libre DPPH

Les figures 18, 19 et 20 représentent les courbes des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations des molécules de référence ou des extraits préparés par les feuilles de *Zizyphus lotus*.

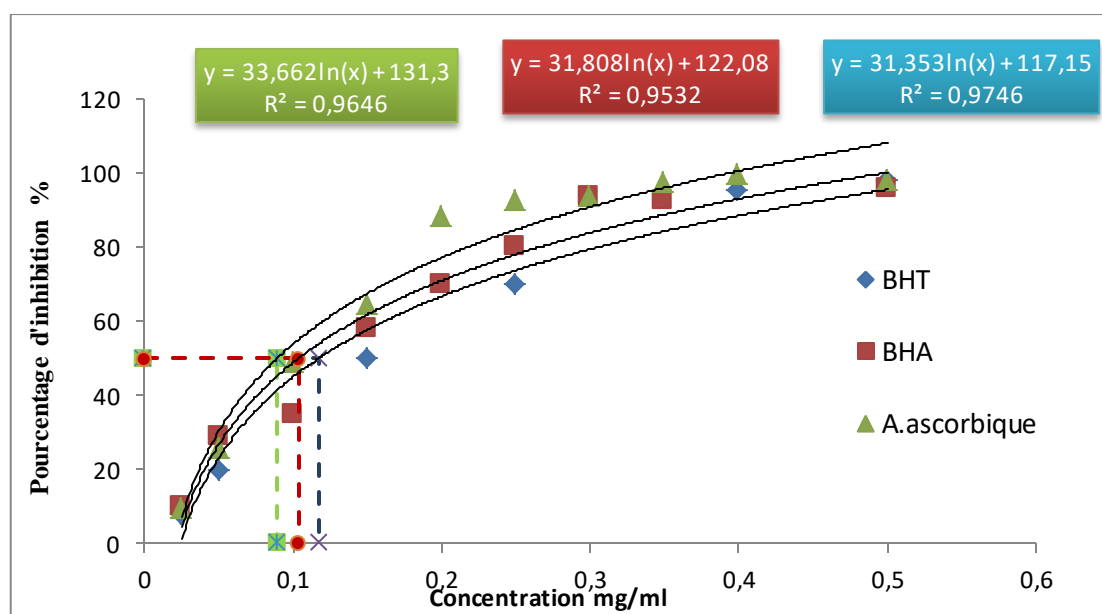


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, en présence des références ; acide ascorbique, BHA et BHT.

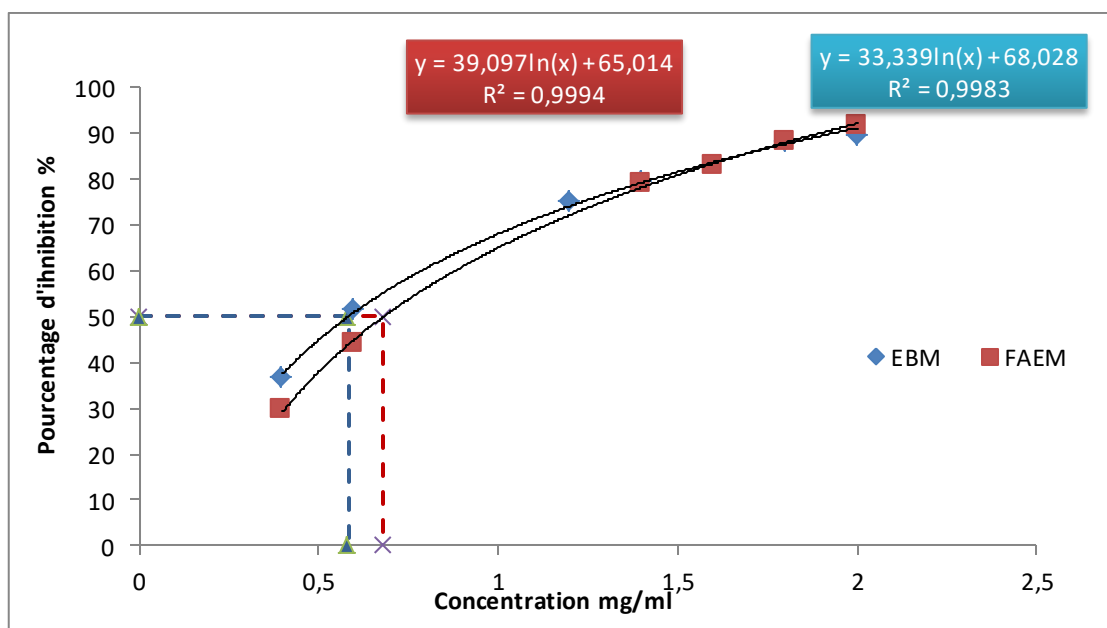


Figure 19 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, en présence d'extrait brut eau-méthanol préparé par macération (EBM) et sa fraction acétate d'éthyle (FAEM) des feuilles de *Zizyphus lotus*.

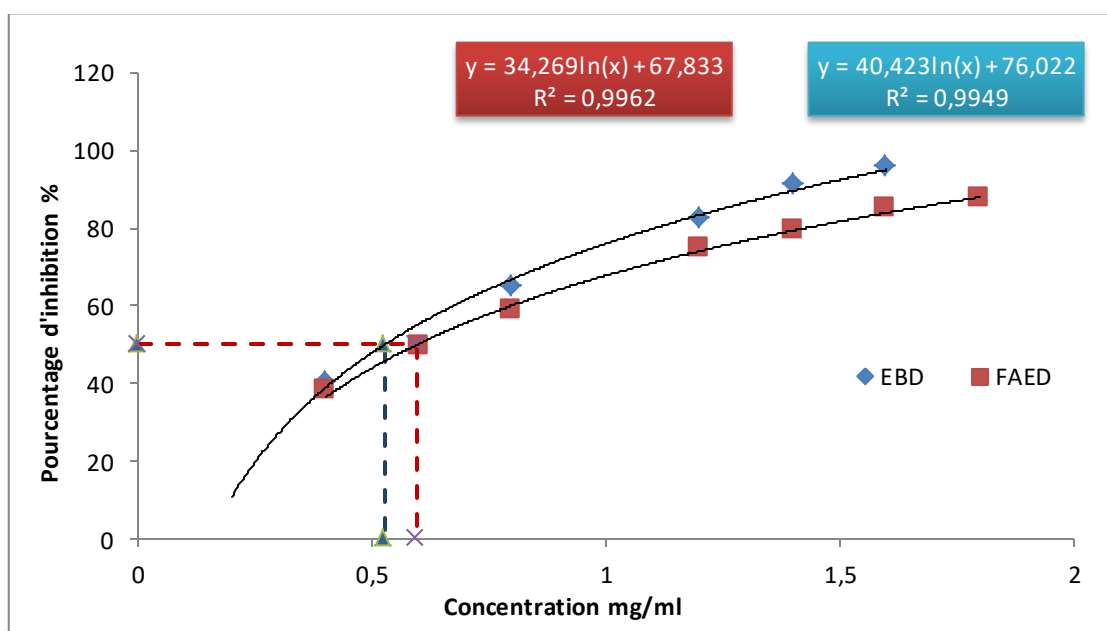


Figure 20 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, en présence d'extrait brut eau-méthanol préparé par décoction (EBD) et sa fraction acétate d'éthyle (FAED) des feuilles de *Zizyphus lotus*.

A partir des équations des régressions logarithmiques obtenues, nous avons déterminé les CI_{50} (concentrations qui inhibent 50% du radical libre DPPH) qui sont regroupées dans le tableau 05.

Tableau 05 : Les valeurs d'IC50 des différents extraits de feuilles de *Zizyphus lotus* avec les molécules de référence.

CI_{50} (mg/ml)			
Références	Acide ascorbique		0,08
	BHA		0,10
	BHT		0,12
Extraits	Macération	EBM	0,58
		FAEM	0,68
	Décoction	EBD	0,53
		FAED	0,6

Macération : extrait brut (EBM) et sa fraction acétate d'éthyle (FAEM) ; Décoction : extrait brut (EBD) et sa fraction acétate d'éthyle (FAED).

D'après les résultats résumés dans ce tableau, nous avons noté une activité antiradicalaire du piégeage du radical libre DPPH presque identique entre les extraits bruts hydro-méthanolique (EBM et EBD), et leurs fractions acétate d'éthyle (FAEM et FAED), préparés des feuilles de *Zizyphus lotus*, avec des CI_{50} entre 0,53 mg/ml et 0,68 mg/ml. Les extraits bruts préparés par décoction (EBD) et de macération (EBM) ont montré les meilleures activités anti-radicalaires, avec des CI_{50} de l'ordre de 0,53 mg/ml et 0,58 mg/ml, respectivement. Cette activité reste faible par rapport à celle obtenus par l'acide ascorbique, BHA et BHT qui ont enregistré des CI_{50} de l'ordre de 0,08mg/ml, 0,10 mg/ml et 0,12mg/ml, respectivement.



L'Algérie a connu une augmentation significative de l'évaluation de l'utilisation des plantes médicinales pour leurs effets bénéfiques. En effet, les molécules isolées des plantes présentent certainement un intérêt pour être utilisées comme thérapies alternatives ou comme modèles pour la synthèse de nouvelles substances (**Houghton., 2000**).

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de la région de Tlemcen, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts hydro méthanolique préparés par décoction ou macération (EBM et EBD) et leurs fractions organique acétate d'éthyle (FAEM et FAED) des feuilles de *Zizyphus lotus*.

Le calcul des rendements d'extractions nous a permis d'enregistrer des pourcentages variables d'ordre de 15,43%, 13,35%, 2,8% et 0,97% pour les extraits bruts (EBM et EBD) et leurs fractions (FAEM et FAED) respectivement.

Les travaux réalisés par **Khouchlaa et al., (2017)** sur les feuilles de *Z. lotus* ont enregistré des rendements d'ordre de 2,28 %, 2,02% et 31,08% pour les extraits bruts n-hexane, dichlorométhane et méthanol, respectivement.

Par ailleurs, **Takoua (2022)**, a noté des rendements d'ordre de 31,27% et 17,42%, pour les extraits bruts méthanolique et aqueux, des feuilles de *Z. lotus*, respectivement.

Cette variation est probablement due au choix du solvant, à la méthode et au temps d'extraction, à la température, à la région et à la période de récolte ...

Sur la base des résultats de l'analyse qualitative, réalisées sur les extraits bruts (EBM et EBD), nous avons révélé la présence des alcaloïdes, de quinones, de terpènes, de saponines, de tanins et de composés réducteurs. Par ailleurs, nous avons noté la présence des flavonoïdes seulement dans l'extrait brut préparé par macération (EBM) et l'absence des anthraquinones dans les deux extraits.

Ces résultats sont confirmés dans les travaux de **Sebsis (2022)** qui a révélé la présence des flavonoïdes, des alcaloïdes, des tanins, des terpènes, des stérols et des saponines et l'absence de quinones.

Ainsi que dans les essais phytochimiques réalisés par **Amari et Gourissi (2017)**, qui ont confirmé la présence des flavonoïdes, des tanins catéchiques et condensés dans les extraits aqueux et méthanolique des feuilles de *Zizyphus lotus*.

La présence et/ou l'absence de certaines familles des métabolites secondaires dépend de plusieurs facteurs tels que la période de récolte, le stade de maturation et la partie utilisée de la plante, ainsi que le solvant utilisé, la méthode d'extraction, la température, ...

Le dosage des composés phénoliques, nous a permis de constater que les teneurs les plus élevés en polyphénols totaux sont enregistrées pour les extraits bruts (EBM et EBD) suivi par leurs fractions (FAEM et FAED), avec des valeurs de l'ordre de $262,2 \pm 0,03 \mu\text{g EAG/mg E}$, $233,6 \pm 0,003 \mu\text{g EAG/mg E}$, $120,9 \pm 0,001 \mu\text{g EAG/mg E}$ et $73,2 \pm 0,02 \mu\text{g EAG/mg E}$, respectivement.

Par ailleurs, les teneurs les plus élevés en flavonoïdes ont été enregistré pour l'extrait brut préparé par décoction (EBD) avec une teneur de l'ordre de $92,3 \pm 0,026 \mu\text{g EC/mg E}$, suivie par la fraction acétate d'éthyle récupérée de l'extrait préparé par macération (FAEM) avec une teneur de l'ordre de $87,2 \pm 0,05 \mu\text{g EC/mg E}$.

D'après un article Review réalisé par **Abdoul-Aziz (2016)**, la quantité des composés phénoliques des feuilles de *Zizyphus lotus*, sont de l'ordre de $664 \text{ mg}/100\text{g}$ pour les polyphénols totaux et varie entre 130 et $199 \text{ mg}/100\text{g}$ pour les flavonoïdes.

Les résultats d'étude réalisée par **Khouchlaa et al. (2017)** ont montré que les taux de polyphénols varient entre $23,11$ et $23,94 \text{ mg EAG /g E}$. Alors que, les taux en flavonoïdes varient entre $12,68$ et $104,12 \text{ mg EQ /g E}$. L'extrait de dichlorométhane a présenté la teneur en polyphénols et flavonoïdes la plus élevée parmi les autres extraits.

D'après ces résultats, nous avons constaté que les feuilles de *Zizyphus lotus* sont riches en composés phénoliques, où il y a une différence entre les teneurs selon le solvant utilisé et la méthode d'extraction.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits préparés de notre plante a été évaluée par deux méthodes : activité antiradicalaire par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrozyl), représentée en CI_{50} et antioxydante par la méthode du pouvoir de réduction du Fer (FRAP), marquée par EC_{50} .

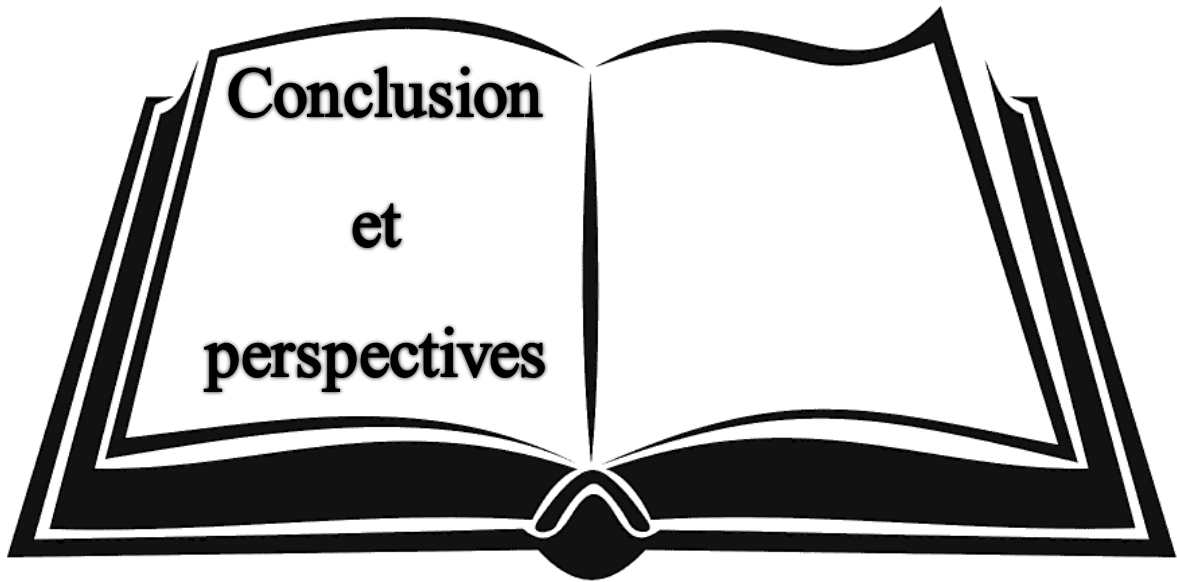
Nous avons enregistré le meilleur pouvoir réducteur du fer pour les fractions acétate d'éthyle préparées par macération ou décoction (FAEM ou FAED) avec des EC_{50} , d'ordre de $0,50 \text{ mg/ml}$ et $0,59 \text{ mg/ml}$, respectivement, par rapport à ceux obtenus pour les extraits bruts (EBM et EBD) d'ordre de $0,63 \text{ mg/ml}$ et $0,78 \text{ mg/ml}$, respectivement.

Par ailleurs, les résultats du piégeage du radical DPPH ont montré que les extraits préparés à partir des feuilles de *Z. lotus* présentent une bonne activité antiradicalaire, en particulier les extraits bruts EBD et EBM qui ont présenté des CI_{50} de l'ordre de 0,53 et 0,58 mg/ml respectivement. Cette activité reste faible par rapport à celle obtenus par l'acide ascorbique, BHA et BHT qui ont enregistré des CI_{50} de l'ordre de 0,08mg/ml, 0,10 mg/ml et 0,12mg/ml, respectivement

Ces résultats sont en accord avec les résultats des travaux de **Khouchlaa et al. (2017)**, pour le test DPPH des trois extraits de feuilles de *Z. lotus*, qui ont montré que l'extrait méthanolique est le plus actif avec une $CI_{50} = 0,7$ mg/ml, par rapport l'extrait de dichlorométhane et l'hexane qui sont les moins actifs.

Selon l'étude de **Takoua (2022)**, l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux des feuilles de *Z. lotus* ont enregistré une CI_{50} égale à $53,72 \pm 4,1$ et $906,1 \pm 8,2$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Le test FRAP réalisé par **Takoua (2022)** a montré que l'extrait aqueux ($EC_{50} = 92,67 \pm 3,8$ $\mu\text{g/ml}$) est plus puissant que l'extrait méthanolique ($EC_{50} = 62,79 \pm 6,5$ $\mu\text{g/ml}$).



Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique, le dosage des composés phénoliques et l'évaluation de l'activité antioxydante de deux extraits bruts hydro méthanolique préparés par décoction ou macération et leurs fractions organiques acétate d'éthyle des feuilles de *Zizyphus lotus*, récoltées dans la région de Nedroma, la wilaya de Tlemcen.

Les résultats obtenus ont conduit aux conclusions suivantes :

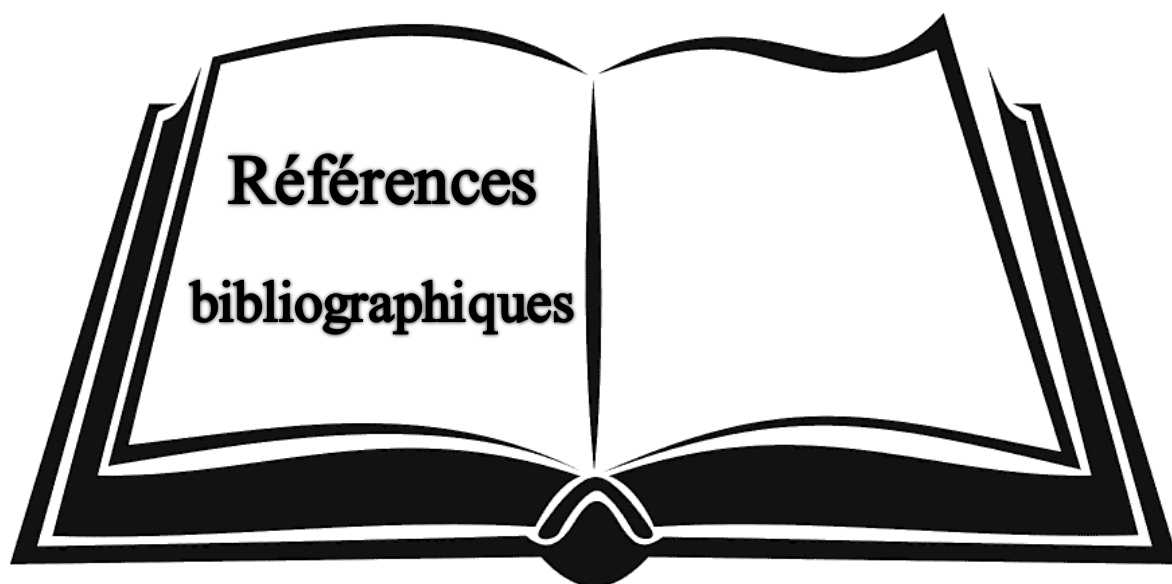
- Les extraits bruts préparés par macération et décoction ont enregistré les meilleurs rendements d'ordre de 15,43%, 13,35%, respectivement.
- Les tests phytochimiques ont permis de mettre en évidence la présence des alcaloïdes, de tanins, de flavonoïdes, de quinones, de terpènes, de saponines, et de composés réducteurs, et l'absence des anthraquinones ;
- Le dosage des composés phénoliques a montré la richesse des extraits préparés en polyphénols totaux et en flavonoïdes ;
- Les extraits bruts préparés par macération et décoction ont enregistré des meilleures teneurs en polyphénols totaux, de l'ordre de $262,2 \pm 0,03 \mu\text{g EAG/mg E}$ et $233,6 \pm 0,003 \mu\text{g EAG/mg E}$, respectivement. Ce sont les mêmes extraits qui ont la meilleure activité antioxydante par le piégeage du radical DPPH, où ils ont présenté des CI_{50} de l'ordre de 0,53 et 0,58 mg/ml respectivement ;
- Par ailleurs, les meilleurs pouvoirs réducteurs du Fer ont été enregistrés par les fractions acétate d'éthyle récupérées des extraits préparés par macération ou décoction, qui ont noté des EC_{50} d'ordre de 0,50 mg/ml et 0,59 mg/ml, respectivement.

Cette étude reste préliminaire et mérite d'être approfondie par d'autres recherches complémentaires qui s'intéressent à :

- Améliorer le rendement par le changement des solvants et les méthodes d'extraction.
- Séparer, identifier et caractériser les composés phénoliques par des méthodes chromatographiques (chromatographie sur couche mince, sur colonne, HPLC...) ou des méthodes spectrophotométriques (RMN, spectroscopie de masse...).
- Effectuer d'autres méthodes pour l'évaluation de l'activité antioxydante comme ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ou ABTS (sel d'ammonium de l'acide

2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity) Bêta-carotène.

- Evaluer d'autres activités biologiques (antidiabétique, antimicrobienne, anti-inflammatoire...).
- Expérimenter l'effet antioxydant de *Zizyphus lotus in vivo* ou *in silico*.
- Etudier les autres parties de la plante (fruits, racines...) et les autres familles des métabolites secondaires (alcaloïdes, saponines, ...).



-A-

- **Abdoul-Azize, S. (2016).** Potential benefits of jujube (*Zizyphus Lotus* L.) bioactive compound for nutrition and health. *Journal of nutrition and metabolism*.
- **Abdoul-Azize, S., Bendahmane, M., Hichami, A., Dramane, G., Simonin, A. M., Benammar, C., ... & Khan, N. A. (2013).** Effects of *Zizyphus lotus* L. (Desf.) polyphenols on Jurkat cell signaling and proliferation. *International immunopharmacology*, 15(2), 364-371.
- **Adeli, M., & Samavati, V. (2015).** Studies on the steady shear flow behavior and chemical properties of water-soluble polysaccharide from *Zizyphus lotus* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 580-587.
- **Adzu, B., Amos, S., Amizan, M. B., & Gamaniel, K. (2003).** Evaluation of the antidiarrhoeal effects of *Zizyphus spina-christi* stem bark in rats. *Acta tropica*, 87(2), 245-250.
- **Al-Qudah, M. A., Al-Abdallat, A. M., & Al-Trad, B. (2016).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Zizyphus lotus* and *Zizyphus spina-christi* from Jordan. *Natural product research*, 30(22), 2537-2540.
- **Al-Rawi, A. (2018).** *Zizyphus lotus* L. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(8), 168-175.
- **Al-Takriti, H. A. (1979).** Flora of Syria, Palestine, and Sinai (1). *American University of Beirut*.
- **Amari, I., & Gourissi, H. (2017).** Étude de l'activité antioxydant et antibactérienne in vitro des extraits méthanolique et aqueux des feuilles du *Zizyphus lotus*. *Université Frères Mentouri Constantine, 1*.
- **Anand, K. K., Singh, B., Grand, D., Chandan, B. K., & Gupta, V. N. (1989).** Effect of *Zizyphus sativa* leaves on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 27(1-2), 121-127.
- **Arbonnier, M. (2004).** Trees, shrubs and lianas of West African dry zones. *Trees, Shrubs and Lianas of West African Dry Zones*, 1-574.
- **Arbonnier, M. (2019).** *Arbres, arbustes et lianes d'Afrique de l'Ouest: Nouvelle édition 2019*. Quae.p 558.
- **Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005).** Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*, 89(1), 27-36.
- **Azzi, A., & Stocker, A. (2000).** Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in lipid Research*, 39(3), 231-255.

-B-

- **Bachir, B., Salah, A., Farid, B., Abderrahmane, A. B., (2016).** *Zizyphus lotus*: a plant with multiple potentialities and biological activities. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 5(3), 320-327.

- **Belarbi, M., & Makhloufi, C. (2019).** Phytochemical profile and pharmacological activities of *Zizyphus lotus* L.: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(9), 121-130.
- **Belhadj, F., Boubaker, J., Dekhil, H., Ati, S., & Ayadi, M. A. (2013).** Nutritional composition and antioxidant properties of Tunisian *Zizyphus lotus* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6954-6961.
- **Bhansali, A. K. (1975).** Monographic study of the family Rhamnaceae of India. *Jodhpur: University of Jodhpur*.
- **Bhullar, K. S., & Rupasinghe, H. P. (2013).** Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- **Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020).** The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.
- **Bonnet, J. (2001).** Larousse des arbres-Dictionnaire des arbres et des arbustes P. 512.
- **Borlinghaus, J., Reiter, J., Ries, M., & Gruhlke, M. C. H. (2020).** Screening procedures and tests for antioxidants. *Pathology*, 389–395. doi:10.1016/b978-0-12-815972-9.00037-8
- **Bouhlali, E. D., Bammou, M., Amrani, S., Alem, C., & Filali-Zegzouti, Y. (2017).** Chemical composition and potential use of Moroccan *Zizyphus lotus* L. and *Cyperus esculentus* tubers as a natural source of nutrients and antioxidants. *Journal of Food Quality*, 2017, 1-8.
- **Bouhlali, E. D., Benali, M., Ennassir, J., & Benoit-Vical, F. (2015).** In vitro antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of several Saharan halophytes of the south-east of Morocco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(20), 5087-5092.
- **Brahmi, F., Mokni, S., & Flamini, G. (2016).** Chemical composition and biological activities of *Zizyphus lotus* L. essential oil. *Food Chemistry*, 197, 1-8.
- **Bruneton, J. (1999).** *Toxic plants dangerous to humans and animals*. Intercept Limited.
- **Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, France : Ed Lavoisier

-C-

- **Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013).** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- **Carr, A. C., & Maggini, S. (2017).** Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9(11), 1211.

-D-

- **Derridj, S., Belhamel, K., & Chouibani, M. (2012).** The distribution and diversity of the genus *Zizyphus Miller* (Rhamnaceae) in Algeria. *Acta Botanica Gallica: Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres botaniques*, 159(3), 307-318.
- **Dib, I. (2017).** Effets vasorelaxants et antihypertenseurs et analyse phytochimique de *Artemisia campestris L. du Maroc Oriental*.
- **Djilani, B., & Dicko, F. (2012).** Antioxidant and antibacterial activities of extracts from leaves of *Zizyphus lotus L.* *Food chemistry*, 131(2), 276-282.

-E-

- **Echegaray, N., Pateiro, M., Munekata, P. E., Lorenzo, J. M., Chabani, Z., Farag, M. A., & Domínguez, R. (2021).** Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: Methods and applications. *Molecules*, 26(13), 3880.
- **Ekor, M. (2014).** The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 177.
- **El Mahi, M., Smaali, M. I., & Taoufik, J. (2018).** Traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of *Zizyphus lotus L.*: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 104-129.
- **El Mokni, R., Mhamdi, B., Hanafi, N., & Gharsallah, N. (2017).** Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *Zizyphus lotus L.* extracts. *Industrial Crops and Products*, 109, 162-169. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.07.062
- **El Ouariachi, E., Aboudrare, A., Ibsouda, S. K., Boulli, A., & Farah, A. (2019).** Ethnobotanical survey of wild edible fruits in the region of Tafilalet (Eastern Morocco). *Journal of Medicinal Plants Studies*, 7(3), 126-133.

-F-

- **Finkel, T. (2011).** Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal of Cell Biology*, 194(1), 7-15.
- **Frei, B., & Stocker, R. (1990).** Antioxidant defense of the extracellular compartment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1034(2-3), 129-140.

-G-

- **Ghalem, S., & Hameurlaine, A. (2014).** Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans la région de Djelfa (Algérie). *Phytothérapie*, 12(3), 158-166.
- **Ghazghazi, H., Aouadhi, C., Riahi, L., Maaroufi, A., & Hasnaoui, B. (2014).** Fatty acids composition of Tunisian *Zizyphus lotus L.*(Desf.) fruits and variation in biological activities between leaf and fruit extracts. *Natural product research*, 28(14), 1106-1110.
- **Ghedira, K. (2013).** *Zizyphus lotus (L.) Desf. (Rhamnaceae): jujubier sauvage.* *Phytothérapie*, 11(3), 149-153.
- **Gledhill, D. (2008).** *The names of plants.* Cambridge University Press.

- **Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., ... & Finglas, P. (2018).** Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. *Food chemistry*, 264, 471-475.
- **Gupta, R. K., Patel, A. K., Kumari, R., & Chugh, S. N. (2018).** Reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of diseases. *Journal of Biosciences*, 43(2), 447-461.

-H-

- **Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2007).** Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*.
- **Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015).** *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- **Harbone, J. B. (1998).** Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. Londres, Angleterre: Ed chapman et hall Thomson science.
- **Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., & Williamson, E. M. (Eds.). (2020).** Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy (3rd ed.). *Elsevier*. [ISBN 9780702070084]
- **Houghton, P. J. (2000).** Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. *Phytotherapy Research*, 14(6), 419-423.
- https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/130658/tab/carte (consulté le 02/05/2023).
- <https://portal.wiktrop.org/species/show/760> (consulté le 14/05/2023).

-I-

- **Islam, M. R., Jahan, M. S., & Hasan, M. N. (2017).** Leaf anatomy and micromorphology of *Ziziphus* species in Bangladesh. *Journal of Forestry Research*, 28(4), 835-844.

-K-

- **Karagözler, A.A., Erdag, B., Emek, Y.G., Uygum, D.A. (2008).** Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chemistry*, 111, 400-407.
- **Khlifi, D., Sghaier, R. M., Mejri, H., & Ghazghazi, H. (2017).** Phytochemical content and biological activities of *Zizyphus lotus L.* root bark extracts. *Natural product research*, 31(23), 2761-2764.
- **Khouchlaa, A., Bouyahya, A., Ait Lahcen, S., Youssef, B., Dakka, N., & Tijane, M. (2017).** Phytochemical screening, evaluation of antioxidant activity and litholytic effect of *Ziziphus lotus L.* extracts. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(3), 1354-1367. ISSN 2277-7105.
- **Khouja, M. L., Chaieb, K., Jemli, M., & Maaroufi, A. (2007).** Antispasmodic and analgesic activities of aqueous extract of *Zizyphus lotus* root barks. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 278-283.

- **Kilani, S., Ledauphin, J., Bouhleb, I., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Skandrani, I., ... & Ghedira, K. (2008).** Comparative study of cytoprotective and antioxidant activities of Scleroderma and the edible mushroom, *Zizyphus lotus*. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3621-3627.
- **Kong, K. W., Ismail, A., Kadir, A. A., & Tan, C. P. (2006).** Total antioxidant capacity and phenolic content of vegetables related to their nutritional and medicinal value. *Food chemistry*, 96(3), 364-368.

-L-

- **Lamia, Z., Leila, A., Wafa, E., & Hayet, G. (2019).** Phytochemical composition and antioxidant activity of *Zizyphus lotus* L. leaves from two Tunisian localities. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12(S), 138-141
- **Liu, M. J., & Wang, M. (2009).** Germplasm resources of Chinese jujube. *China Forestry Publishing House*.

-M-

- **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- **Maraghni, M. G. M. N. M., Gorai, M., & Neffati, M. (2010).** Seed germination at different temperatures and water stress levels, and seedling emergence from different depths of *Zizyphus lotus*. *South African Journal of Botany*, 76(3), 453-459.
- **Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 20(4), 458-463.
- **Mates, J. M., Pérez-Gómez, C., & de Castro, I. N. (2018).** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 59, 27-36.
- **McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969).** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- **Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. D., Coube, C. S., & Leitão, S. G. (2001).** Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research*, 15(2), 127-130.
- **Menvielle-Bourg, F. J. (2005).** La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytothérapie*, 3(3), 118-121.
- **Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018).** Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, 63(1), 68-78.
- **Møller, I. M., & Sweetlove, L. J. (2010).** ROS signalling—specificity is required. *Trends in plant science*, 15(7), 370-374.

-N-

- **Nimse, S. B., & Pal, D. (2015).** Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35), 27986-28006.

-O-

- **OMS (Organisation mondiale de la Santé) (2013).** Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. Genève .*Organisation mondiale de la Santé*.
- **Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4619-4626.

-P-

- **Pottier, A. G. (1981).** Flora of Tunisia Angiospermes-Dicotyledones, Apetales-Dialypetales. *Programme Flore et Végétation Tunisiennes*.

-Q-

- **Quattrocchi, U. (2012).** *CRC world dictionary of medicinal and poisonous plants: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology (5 Volume Set)*. CRC press.
- **Quézel, P., & Santa, S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. p 565.

-R-

- **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- **Richardson, J. E., Chatrou, L. W., Mols, J. B., Erkens, R. H. J., & Pirie, M. D. (2004).** Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1450), 1495-1508.
- **Rizzo, G., Bilotto, S., Cafarchia, C., De Sole, P., & Tremonte, P. (2012).** Chemical composition and antioxidant activity of fruits of *Zizyphus lotus* L. from Southern Italy. *Journal of Medicinal Food*, 15(5), 420-425.

-S-

- **Saoudi, M., Khaldi, A., Bouzerna, N., Sekkal, F. Z., & Messaoudi, M. (2013).** Phytochemical screening and antioxidant activity of *Zizyphus lotus* fruits collected from Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(25), 1834-1840.
- **Sarikurkcu, C., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Harmandar, M. (2008).** Studies on the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *globosum* (lamiaceae) by three different chemical assays. *Bioresource Technology*, 99(10), 4239-4246. doi: 10.1016/j.biortech.2007.09.067.
- **Scandalios, J. G. (1993).** Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, 101(1), 7-12.

- **Sebsis, S. (2022).** Contribution à l'étude des métabolites secondaires des feuilles de la plante Jujubier *Zizyphus lotus* L. et leurs effets biologiques. *Mémoire de master, Université Larbi Ben M'hidi-Oum El Bouaghi.*
- **Sies, H. (1997).** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82(2), 291-295.
- **Sies, H., & Jones, D. P. (2020).** Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(7), 363-383.
- **Smith, J. (2018).** Les espèces réactives d'azote (ERN) et leurs effets sur les molécules biologiques. *Journal de biochimie moléculaire*, 5(2), 50-60.
- **Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A., Eldeen, I. M., Seow, E. M., & Sajak, A. A. B. (2009).** Superoxide Scavenging and Antioxidant Activities of Pre germinated Orthosiphon stamineus Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 879-884.

-T-

- **Takoua, B. (2022).** Extraction, dosage et évaluation in vitro des activités antioxydante, antidiabétique et anti-Alzheimer des extraits de la plante saharienne *Zizyphus lotus* L (Doctoral dissertation, Université Mohamed Boudiaf-M'sila).

-V-

- **Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, K. (2008).** Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *International journal of environmental research and public health*, 5(2), 81-89.
- **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- **Vermerius, W., Nicholson, R., (2006).** Isolation and Identification of Phenolic Compounds. In: Phenolic Compound Biochemistry. *Springer, Dordrecht.*
- **Vurro, M., & Badeck, F. W. (2014).** Reactive oxygen and nitrogen species and their role in crop protection. In Crop production for agricultural improvement (pp. 237-266). *Springer, Cham.*

-W-

- **Wahida, B., Abderrahman, B., & Nabil, C. (2007).** Antiulcerogenic activity of *Zizyphus lotus* (L.) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), 228-231.
- **Waterman, K. C., Adami, R. C., Alsante, K. M., Hong, J., Landis, M. S., Lombardo, F., & Roberts, C. J. (2002).** Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. *Pharmaceutical development and technology*, 7(1), 1-32.
- **Wojtunik-Kulesza, K. A. (2020).** Approach to optimization of FRAP methodology for studies based on selected monoterpenes. *Molecules*, 25(22), 5267.

-Z-

Références bibliographiques

- **Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.