

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILALI LIABES

FACULTE DES SCIENCES

DE LA NATURE ET DE LA VIE

SIDI BEL ABBES

THESE

DE DOCTORAT de TROISIEME CYCLE

Présentée par :Mme MANSOUR Insaf Fatima Zohra

Spécialité : Sciences biologiques

Option : Immunochimie alimentaire et santé

Intitulé

***Détermination des principes nutritionnels et fonctionnels
de la pulpe du fruit du jujubier. Etude de son potentiel
antioxydant et anti-inflammatoire***

Soutenue en 2016

Devant le jury composé de :

Président :	Pr ABBOUNI Bouziane	Université de Sidi Bel-Abbès
Examineurs :	Pr RIAZI Ali	Université de Mostaganem
	Dr BENALI Fouzia	Université de Sidi Bel Abbès
	Dr BEREKSI Karima	Université de Sidi Bel Abbès
Rapporteur	Pr BENALI Mohammed	Université de Sidi Bel-Abbès

Dédicaces

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

A mon mari Mr Karar fakhreddine

A ma fille Karar Assil Miral

A mes chères sœurs (Hydayate, Rihaab).

A mon frère Ibrahim

A mes beaux-parents

A tous mes beaux frères

A ma belle sœur Fatima Zohra

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

Remerciements

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

Avant tout, je remercie Dieu tout puissant pour m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail. Je tiens tout d'abord à remercier *Mr Benali mohammed*, Professeur à l'université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbes faculté SNV et Directeur du laboratoire de recherche de biotoxicologie pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et de son efficacité certaine que je n'oublierai jamais. Soyez assuré de mon attachement et de ma profonde gratitude.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur Abbouni Bouziane, Professeur à l'université de Sidi Bel Abbés, qui a bien voulu accepter de présider ce jury. *Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude et mon profond respect.*

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur RIAZI Ali, Professeur à l'université de Mostaganem, en acceptant de juger ce travail. *Qu'il trouve ici, le témoignage de mon profond remerciement.*

Madame BEREKSI Karima, Professeur à l'université de Sidi Bel-Abbes, me fait l'honneur d'examiner ce travail et de siéger dans ce jury. *Qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.*

Mes remerciements sont aussi adressés à Mme le Docteur TOUMI Fouzia, enseignante à l'université de Sidi Bel-Abbés, qui a bien voulu faire partie de notre jury et examiner ce travail. *Je lui présente mes remerciements et ma grande reconnaissance.*

Je remercie également tous les membres du laboratoire de biotoxicologie, notamment ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et les autres simplement pour les bons moments partagés.

Enfin ; Je voudrais tout particulièrement exprimer ma reconnaissance à mes parents, MANSOUR Hamza et MAZARI Malika, qui ont été pour moi un modèle et n'ont cessé de m'encourager. Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à mon cher époux KARAR Fakhreddine. Sa patience, son réconfort et son affectueux soutien tout au long de ce

Résumé

L'objectif de ce travail consiste à évaluer les principes nutritionnels conventionnels de la pulpe du fruit du jujubier (PFJ) écotype "Zfisef" produit dans l'ouest algérien et à déterminer les composés du métabolisme secondaire ainsi que l'activité antioxydante. Cette dernière ainsi que le potentiel anti-inflammatoire sont mis en évidence in vivo. La PFJ montre un taux d'humidité de 19%, un taux de cendre de 6.1%, un taux de protéines de 2,88 %, une teneur en lipides, en sucres totaux et en vitamine C sont respectivement de 0.28%, 23,20% et 0,194%. Les composés du métabolisme secondaires révèlent un taux de polyphénols totaux important au niveau de l'extrait ethanologique de *Ziziphus* (EEZ) de la PFJ (7.80 ± 0.40 mg EAG /g). Les flavonoïdes représentent 25.58 ± 16.6 mg EQ/gr. Quant la fraction des tanins condensés, elle semble plus importante comparée à celle hydrolysable ($P < 0,05$). Le taux d'anthocyanes de la PFJ est de $4,81 \pm 0,44$ mg équivalent cyanidine 3-glucoside pour 100 g de PFJ tandis que le bêta carotène représente $5,02 \pm 0,19$ mg pour 100g. Le pourcentage d'inhibition par le DPPH est de $56,60 \pm 3,99\%$ à la concentration de l'EEZ de PFJ de $0,25 \pm 0,062$ mg/ml. Le pouvoir réducteur de l'EEZ et celui de l'acide ascorbique sont déterminé par la méthode FRAP et exprimés en densité optique. Il est de $0,533 \pm 0,035$ et $1,16 \pm 0,020$ DO à la concentration de 0,1 mg/ml et $1,87 \pm 0,044$ et $3,22 \pm 0,044$ à la concentration de 0,5 mg/ml respectivement pour l'EEZ et l'acide ascorbique. Les composés phénoliques identifiés dans la PFJ par LC-MS/MS sont variés et nombreux en comparaison avec ceux des espèces étrangères. L'effet de l'EEZ sur le taux de survie de *Saccharomyces cerevisiae* a montré qu'à la concentration de 176 mM de peroxyde d'hydrogène sans l'extrait de PFJ la somme des colonies est estimée à 221UFC/ml soit une diminution de 50% correspondant à la DL 50 alors qu'elle atteint le chiffre de 344 ($\approx 78\%$) soit une augmentation de 28% par rapport au nombre de colonies à la DL50. Notre EEZ a un effet palliatif par son potentiel antioxydant appréciable face à l'effet létal du peroxyde d'hydrogène. L'étude in vivo de l'induction d'œdème par injection de carragénine chez le rat Wistar démontre l'effet anti-œdémateux de l'EEZ comparé au Diclofénac. Dans les mêmes conditions expérimentales, la détermination immunoturbidimétrique du CRP_r et l'étude de la formule leucocytaire confirment l'effet anti-inflammatoire de ce fruit.

Mots clés : Pulpe du fruit du jujubier, métabolites secondaires, activité antioxydante, rats Wistar, potentiel antioxydant, potentiel anti-inflammatoire

Abstract

The objective of this work is to assess the conventional nutritional principles of the pulp of the fruit of the jujube (PFJ) ecotype "Zfisef" product in western Algeria and identify compounds of secondary metabolism and antioxidant activity. The latter and the anti-inflammatory potential are demonstrated in vivo. The PFJ shows a humidity of 19%, an ash content of 6.1%, a protein content of 2.88%, a lipid content, total sugars and vitamin C are 0.28%, 23, 20% and 0.194% respectively. Secondary metabolism of compounds show a significant rate of total polyphenols in the ethanolic extract of *Zizyphus* (EEZ) of the PFJ (7.80 ± 0.40 mg EAG / g). Flavonoids are 25.58 ± 16.6 mg EQ/gr. As the fraction of the condensed tannins seems more important compared to that hydrolyzable ($P < 0.05$). The anthocyanin content of the PFJ is 4.81 ± 0.44 mg equivalent cyanidin 3-glucoside per 100 g of PFJ while the beta carotene is 5.02 ± 0.19 mg per 100g. The percent inhibition by DPPH is $56.60 \pm 3.99\%$ at the concentration of EEZ PFJ 0.25 ± 0.062 mg/ml. The reducing power of the EEZ and the ascorbic acid are determined by the FRAP method and expressed as optical density. It is of 0.533 ± 0.035 and 1.16 ± 0.020 OD at a concentration of 0.1 mg/ml and 1.87 ± 0.044 and 3.22 ± 0.044 at the concentration of 0.5 mg/ml respectively for the EEZ and ascorbic acid. Phenolic compounds identified in the PFJ by LC-MS/MS are varied and numerous in comparison with those of the foreign species. The effect of EEZ on *Saccharomyces cerevisiae* survival rate shows that at the concentration of 176 mM hydrogen peroxide, without the extract PFJ, the sum of colonies is estimated 221UFC/ml with 50% reduction corresponding to the LD50, whereas it is 344 CFU/ml ($\approx 78\%$) a 28% increase relative to the number of colonies to the LD50. Our EEZ has a palliative effect by its appreciable antioxidant potential against the lethal effect of hydrogen peroxide. The in vivo study of the induction of edema by carrageenan injection in Wistar rats demonstrates the anti-edematous effect of EEZ compared to Diclofenac. In the same experimental conditions, the determination of Immunoturbidimetric CRP_r and the study of leukocyte count confirms the anti-inflammatory effect of this fruit.

Keywords: pulp of the fruit of the jujube, secondary metabolites, antioxydante activity, Wistar rats ,potential antioxidant, anti-inflammatory potential.

ملخص

الهدف من هذا العمل يتجلى في ابراز القيمة الغذائية لفاكهة السدر (بدون نواة)- المعروف بالزفيزف - الذي ينمو في الغرب الجزائري- و تحديد نتائج الايض الثانوية و كذا النشاط المضاد للاكسدة. هذا الاخير و النشاط المضاد للالتهاب شكلا محور بحث حي . اظهرت نتائج البحث المخبري ان ثمار نبات السدر المنزوعة النواة تحتوي على نسبة رطوبة مقدرة ب 19 % ,رماد ب 6.1% ,بروتينات 2.88% اما نسب الدهون ,السكريات و الفيتامين ج فهي : 0.28%, 23.20%, 0.194% على التوالي.دراسة نتائج الايض الثانوية تكشف عن معدل مهم للمركبات الفينولية.قدر ب 7.80 ± 0.40 مغ / غ و مركبات الفلافونويد المقدر ب 16.6 ± 25.58 ملغ / غرام. بينما جزء من العفص المختصرة ، يبدو أكثر أهمية من تلك المميهة . معدل الانثوسيانين هو 0.44 ± 4.81 ملغ سيانيدين3غليكوسيدي لكل 100 غ من المادة .في حين ان بيتا كاروتين هي 0.19 ± 5.02 ملغ في 100 غ .نسبة التثبيط ل: 56.60 ± 3.99 % بتركيز 0.062 ± 0.25 مل/مغ . نسبة ارجاع السدر و الفيتامين ج حددت باستعمال طريقة ارجاع الحديد و المعبر عنه بالكثافة الضوئية التي كانت 0.035 ± 0.533 و 0.02 ± 1.16 في تركيز 0.1 مل/مغ و 0.044 ± 1.87 و 0.044 ± 3.22 في تركيز 0.5 مل/مغ/مل بالنسبة للسدر و حمض الاسكوربيك على التوالي. المركبات الفينولية التي تم تحديدها في المادة التي حللناها (السدر) كانت عديدة و متنوعة مقارنة مع الانواع الاجنبية الاخرى. اظهر .تأثير مستخلص غلاف ثمرة السدر الايثانولي على معدل البقاء على قيد الحياة للخميرة انه بتركيز 176 ميلي مول من بيروكسيد الهيدروجين و بدون مستخلص السدر كان مجموع المستعمرات 221 بانخفاض نسبته 50% بينما وصل عدد هذه المستعمرات الى 344 (78%) اي ارتفاع بنسبة 28% مقارنة مع نسبة 50%. ان المستخلص الايثانولي للسدر له دور مهم بسبب امكانيته المضادة للاكسدة الملموسة ضد التأثير المميت ل بيروكسيد الهيدروجين . الدراسة الحية للتحريض وذمة عن طريق حقن الكاراجينين عند جردان من فصيلة ويستار يدل على تأثير مضاد للدمى مقارنة مع الديكلوفيناك. في الظروف التجريبية نفسها , تحديد البروتين التفاعلي ج بطريقة العكر المناعي و دراسة عدد الكريات البيضاء التأثير المضاد للالتهاب لهذه الفاكهة.

الكلمات المفتاحية: غلاف ثمرة السدر , نتائج الايض الثانوية ,النشاط المضاد للاكسدة , الجردان من فصيلة ويستار , التأثير المضاد للالتهاب.

Sommaire

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

Chapitre I : Généralités sur le *Zizyphus jujuba*

I.1. Description taxonomique04

I.2. Classification botanique.....05

I.3. Composition biochimique du fruit *zyziphus jujuba*05

I.3.1. Métabolites primaires.....05

I.4.2. Métabolites secondaires.....06

I.4. Activités biologiques et thérapeutiques du *zyziphus jujuba*06

I.4.1.Effet hypnotique sédatif et anxiolytique06

I.4.2. Inhibiteur de sensibilité gustative.....06

I.4.3.activité anticancéreuse (chimiothérapie).....07

I.4.4. Activité antimicrobienne.....07

I.4.5.Activité anti ulcéreuse.....08

I.4.6.Effet anti-inflammatoire et anti spasmodique.....08

I.4.7. Anti-allergiques.....08

I.4.8.Activité de rehaussement de la perméabilité.....08

I.4.9.Activités cognitives.....08

I.4.10. Anti fertilité/ propriétés contraceptives.....09

I.4.11. Effet hypotenseur et antinephretique.....09

I.4.12.Activité cardiovasculaire.....09

I.4.13.Effet immunostimulants.....09

I.4.14.Effet antioxydant.....09

I.4.15. Activités de cicatrisation des plaies09

Chapitre II : Les espèces réactives oxygénées et stresse oxydant

II.1. Les espèces réactives oxygénées.....12

II.2. Sources des espèces réactives oxygénées.....13

II.2.1.Sources exogènes.....13

II.2.2.Sources endogènes.....	14
II.3.Stress oxydant.....	15
II.4.Les anti oxydants	16
II.4.1. Les antioxydants enzymatiques.....	16
II.4.2.Les antioxydants non enzymatiques.....	16

Chapitre III : Les composés phénoliques

III.1. les composés phénoliques.....	19
III.2. classification des polyphénols.....	19
III.2.1.les non flavonoides	20
III.2.1.1.acides phénoliques.....	20
III.2.1.2stilibènes.....	20
III.2.1.3.lignines.....	20
III.2.1.4.lignanes	21
III.2.1.5. coumarines	21
III.2.2. les flavonoïdes.....	21
III.2.3.les tanins	22
III.2.3.1. les tanins hydrolysables	22
III.2.3.2.les tanins condensés	23
III. 2.4. les carotenoides	23

Chapitre IV : inflammation

IV.1.inflammation	27
IV.1.1.inflammation aigue.....	27
IV.1.1.1.phase vasculaire	27
IV.1.1.2.phase cellulaire.....	28
IV.1.1.3.la phase de résolution	29
IV.1.2.inflammation chronique	30
IV.1.3.cellules impliquées dans la réaction inflammatoire	30
IV.1.4.médiateurs de la réaction inflammatoire.....	31
IV.1.5.implication pathologique de l'inflammation.....	33
IV.1.6.anti-inflammatoires	35
IV.1.6.1.anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	35
IV.1.6.2.anti-inflammatoire stéroïdiens	36
IV.1.6.3.anti-inflammatoire d'origine végétale.....	37

Chapitre V : Matériels et méthodes.

Première partie :

Analyse des métabolites primaires et secondaires et évaluation de l'activité antioxydante de la pulpe du fruit du jujubier

V.1. Matériel végétal	42
V.2. Extraction	42
V.3. dosage des composés du métabolisme primaire.....	42
V.3.1.Taux d'humidité.....	42
V.3.2 Taux de cendres.....	43
V.3.3. Dosage des protéines.....	43
V.3.4.. Teneur en matière grasse.....	44
V.3.5. Dosage des sucres totaux.....	44
V.3.6. Détermination de la teneur en acide ascorbique.....	45
V.4. Dosage des composés du métabolismes secondaire.....	45
V.4.1. Dosage des composés phénoliques.....	45
V.4.2. Dosage des flavonoides totaux.....	46
V.4.3.Dosage des tanins condensés.....	46
V.4.4.Dosage des tanins hydrolysables.....	46
V.4.5. Détermination de la teneur en anthocyanes totaux	47
V.4.6.Dosage des carotenoides	47
V.5.Activité anti-oxydante	47
V.5.1 Mesure du pouvoir antioxydant de l'extrait de jujube par le test du DPPH.....	47
V.5.2. Mesure du pouvoir antioxydant de l'extrait de jujube par le test de FRAP.....	48
V.6.Identification chimique des polyphénols par Lc-Ms/Ms.....	48
V.6.1.Extraction des composés phénoliques.....	48
V.6.2.Identification des composés phénoliques par Lc-Ms.....	48
V. 7.Statistiques.....	49

Deuxième partie :

Implication des extraits éthanoliques dans la résistance de *Saccharomyces cerevisiae* face à un stress H_2O_2 à la DL50

V.8.1. Isolement des levures et préparation des milieux Sabouraud.....	51
V.8.2. Mise en culture.....	51
V.8.3. Préparation de la gamme de peroxyde d'hydrogène	51
V.8.4. Préparation des dilutions.....	52
V.8.5. Traitement de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> par le peroxyde d'hydrogène.....	52
V.8.6. Résistance de <i>S. cerevisiae</i> au stress du peroxyde d'hydrogène en présence d'extrait éthanolique de <i>Ziziphus</i>	53

Troisième partie :

Effets de l'extrait éthanolique de la pulpe du fruit du jujubier sur la réaction inflammatoire chez le rat Wistar

V.9.1. Conditions d'élevage des rats Wistar.....	56
V.9.2. Induction de l'inflammation par la carragénine et activité anti-inflammatoire	56
V.9.3. Mesure des œdèmes des pattes inflammées.....	57
V.9.4. Sacrifice et prélèvement du sang	58
V.9.5. Dosage des protéines de l'inflammation ou "profil protéique".....	59
V.9.5.1. La protéine C-réactive (CRP).....	59
V.9.5.2. Dénombrement des globules blancs.....	59

Chapitre VI : Résultats et discussion

VI.1. Détermination du rendement de l'extrait brut éthanolique.....	62
VI.2. les métabolites primaires	62
VI.2.1. Taux d'humidité.....	62
VI.2.2. Taux de cendres.....	62
VI.2.3. Dosage des protéines.....	62
VI.2.4. Teneur en matière grasse.....	63
VI.2.5. Dosage des sucres totaux.....	64
VI.2.6. Teneur en acide ascorbique.....	65
VI.3. Dosage des composés du métabolisme secondaires.....	66

VI.3.1. Dosage des composés phénoliques.....	66
VI.3.2. Dosage des flavonoïdes... ..	67
VI.3.3. Les tanins.....	67
VI.3.4. Les anthocyanes.....	68
VI.3.5 Les caroténoïdes (β -carotène).....	68
VI.4. Mesure du pouvoir antioxydant de l'extrait de jujube par le test du DPPH	69
VI.5. Mesure du pouvoir antioxydant de l'extrait de jujube par le test de FRAP	71
VI.6. Détermination des composés polyphénoliques par LC-MS/MS.....	71

Potentiel antioxydant de l'extrait de pulpe du fruit du jujubier
Étude sur modèle *Saccharomyces cerevisiae*

VI.7. Etude de la viabilité de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
VI.7.1. Comptage de colonies de <i>S. cerevisiae</i> après traitement avec H ₂ O ₂	75
VI.7.2. Adaptation de <i>S. cerevisiae</i> à H ₂ O ₂ en présence d'extrait brut de PFJ.....	76

Potentiel anti-inflammatoire de l'extrait de pulpe du fruit du jujubier
Étude sur modèle *Rat Wistar*

VII.8. Etude de la réaction inflammatoire	81
VII.8.1 Effet de l'EEZ sur la réaction inflammatoire de la patte de rat.....	82
VI.8.2 Effet de l'EEZ sur la C-réactive protéine (CRP)	84
VI.8.3. Effet de l'EEZ sur la Formule numéraire sanguine du rat (FNS _r).....	86

Conclusion.....	92
Références bibliographique.....	95

Liste des abréviations

RL :radicaux libres

ROS : réctive oxygen species

Z. :Zizyphus

μ: micro

CO :cyclooxygénase

LO: lipooxygénase

AMPc : adenosine monophosphate cyclique

LDL: low density lipoprotein

SIDA: syndrome d'immunodefficiency aqoise

HIV : virus de l'immunodefficiency humaine

ADN : acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

O₂⁻ : superoxide

NADPH : nicotinamide adenine dinucléotide phosphate

P₄₅₀ : cytochrome

NO : nitric oxyd

HCLO : acide hypochloreux

H₂O₂ : peroxide d'hydrogène

MG : matière grasse

V: volume

P : poids

EEZ : extrait éthanolique de zizyphus

Liste des figures

- Figure 01 : Arbre de jujubier (*Zizyphus jujuba*)
- figure 02 : fruit du jujubier (*Zizyphus jujuba*)
- Figure 03 : Les différentes espèces réactives oxygénées
- Figure 04 : Origine et réponse cellulaire aux ROS
- Figure 05. Quelques structures de composants phénoliques.
- Figure 06 : Squelette de base des flavonoides .
- Figure07 : Les caroténoïdes
- Figure 08 : Les phases de l'inflammation aigue
- Figure09 : Biosynthèse des eicosanoïdes
- Figure 10: Rats de souche Wistar et aliments
- Figure11 : Injection intra péritonéale des solutions étudiées
- Figure12 : Injection au niveau de la région sub-plantaire de la patte
- Figure13 : Mesure de l'épaisseur de l'inflammation avec le pied à coulisse
- Figure14 : Prélèvement de sang par ponction dans l'aorte abdominale
- Figure 15 : Droite d'étalonnage de la Sérum Albumine Bovine
- Figure16 : droite d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux
- Figure17 : Droite d'étalonnage pour le dosage de l'acide ascorbique
- Figure 18: Droite d'étalonnage pour le dosage des caroténoïdes
- Figure19 : Réaction d'un antioxydant avec le DPPH
- Figure20: Evaluation by DPPH method of IC50 of the PFJ extract and standard ascorbic acid.
- Figure 21: Total reductive potential of different concentrations of PFJ extract and reference antioxidant ascorbic acid by FRAP method.
- Figure 22 : Viabilité de *S. cerevisiae* face à un stress par H₂O₂ à différentes concentrations pendant 01 heure.
- Figure 23 : Evolution des colonies de *S. cerevisiae* (A)et (B) et de leur survie (C) en présence de peroxyde d'hydrogène (DL50) et d'extrait brut de pulpe de fruit du jujubier.
- Figure24 : Effet de l'extrait éthanolique de *Z. jujuba* sur l'épaisseur de l'œdème de la patte de rat Wistar induit par injection de carragénine (mm).
- Figure25 : C-Réactive Protéine chez les rats Wistar traités par différents produits et injectés de carragénine inflammatoire à 1%.
- Figure26 : Détermination des leucocytes de rats au cours de la réaction inflammatoire

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification botanique de *Zizyphus jujuba*

Tableau 02 : Teneur de la pulpe du jujubier frais en métabolites primaires

Tableau 03 : Principales espèces réactives oxygénées

Tableau04 : Exemples de maladies liées à l'inflammation

Tableau 05 : origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires

Tableau 06. Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Tableau 07 : Principaux glucocorticoïdes

Tableau 08 : Exemples de plantes médicinales anti-inflammatoires

Tableau 09 : calcul de concentration de peroxyde d'hydrogène

Tableau 10 : Gamme de dilutions de H₂O₂ (mM)

Tableau 11 : Dilutions décimales de la solution mère

Tableau 12 : Rendement de l'extraction éthanolique de la pulpe du fruit du jujubier

Tableau 13 : Composition nutritionnelle de la pulpe du fruit du jujubier

Tableau 14 : Composés phénoliques et activité antioxydante de l'extrait éthanolique de la pulpe du fruit du jujubier écotype « Zfisef » de la région ouest d'Algérie.

Tableau 15 : Identification par LC-MS/MS des composés phénoliques de l'extrait d'acétate d'éthyle de la PFJ

Tableau 16 : Dénombrement et calculs des colonies après traitement par le peroxyde d'hydrogène

Tableau 17: dénombrement des colonies de *S. cerevisiae* et détermination de leur survie

Tableau18: Effet de l'extrait éthanolique de *Z. jujuba* sur l'épaisseur de l'œdème (mm) de la patte de rat Wistar.

du transport et ils seront vulnérables aux différents parasites et champignons. Une amélioration des connaissances de la morphologie, la phénologie et la composition chimique de *Z. jujuba* est nécessaire pour sa réintroduction et sa valorisation en Algérie. Dans notre pays ce fruit apparaît en septembre octobre et vu sa rareté, est convoité par les consommateurs. Des travaux récents ont concerné les fruits de diverses espèces du jujubier pour rapporter leurs vertus thérapeutique et nutritionnelle. [Elaloui et al, 2014](#) ont étudié la composition en acides aminés, en polyphénols et en sucres des pâtes de fruits de quatre écotypes de *Ziziphus jujuba* cultivés en Tunisie, appréciées par les habitants et exportées. [Fahim et al, 2014](#) ont rapporté les effets antimicrobiens de miel de *Zizyphus jujube* (Siddar honey) testés sur une panoplie de germes responsables de toxi-infections. Aussi d'autres travaux rapportent l'intérêt de ce fruit dans le traitement du déclin cognitif ([Jazayeri et al, 2014](#)), du cancer ([Huang, 2007](#); [Plastina, 2012](#)), de l'inflammation ([Sharif et al, 2009](#)) et dans l'immunostimulation ([Zhang et al, 1998](#), [Zhang et al, 2001](#)).

L'objectif de ce travail consiste à évaluer les principes nutritionnels conventionnels de la pulpe du fruit du jujubier (PFJ) écotype "Zfifef" produit dans l'ouest algérien et à déterminer les composés du métabolisme secondaire ainsi que l'activité antioxydante par le diphenyl picryl-hydrazyl et par le pouvoir réducteur du fer d'un extrait éthanolique de la pulpe de ce fruit. Un extrait de polyphénols selon [Yang, 2011](#) est lyophilisé ensuite analysé par chromatographie liquide à haute pression couplée à la spectroscopie de masse (HPLC/MS). Dans une seconde partie, nous déterminerons le potentiel antioxydant de la pulpe de ce fruit comme source potentielle de molécules naturelles bioactives, permettant une protection contre les effets du stress oxydant et le développement de la toxicité des antioxydants synthétiques. Une dernière partie in vivo permettra de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de la pulpe de *Ziziphus* chez des rats Wistar.

I.1. Description taxonomique

Le jujubier est une espèce du genre *zizyphus* appartenant à la famille des Rhamnacées. le nom *zizyphus* est lié à un mot arabe et les anciens grecs utilisaient le mot *ziziphon* pour le jujube. Il existe deux grands jujubes domestiques : *Zizyphus mauritiana lamk* le jujubier indien et *Zizyphus jujuba miller* le jujubier commun. Ces deux espèces ont été cultivées sur de vastes régions du monde. Ces espèces ont une large gamme de morphologies, des arbustes à petites ou moyennes dimensions et arbres qui pourraient être dressés, semi-dressés ou étalés. La hauteur peut varier de 3-4 à 10-16 m ou plus. Les arbres sont demi caduques et très ramifiés. L'écorce a des sillons profonds longitudinaux et de couleur grisâtre ou brun rougeâtre. Habituellement, l'arbuste ou l'arbre est épineux, mais parfois désormais. Les rameaux sont densément blancs, pubescents surtout quand il est jeune et a tendance à être en zigzag.

Les feuilles sont des lames elliptiques à ovales ou presque orbiculaires, elles sont pétiolées et les stipules sont des épines. Les fleurs ont tendance d'avoir une odeur acre de couleur jaune et réuni en cyme. Le fruit ovoïde, le jujube a la forme et les dimensions d'une belle olive. C'est une drupe d'abord jaune, la pulpe est sucrée, gélatineuse, à saveur fade, puis rouge à maturité, le fruit se flétrit pour atteindre la consistance et le goût d'une datte, d'où son surnom de datte chinoise (Mahajan et al , 2010). (Figure : 01)



Figure 01 : Arbre de jujubier (*Zizyphus jujuba*)



figure 02 :fruit du jujubier (*Zizyphus jujuba*)

I.2. Classification botanique

Connu sous le nom botanique de *Zizyphus Jujuba*, le Jujubier est classé dans la famille des Rhamnacées. Il se présente sous forme d'un arbre épineux de six à huit mètres de hauteur et se caractérise par des petites feuilles de couleur vert pâle. Les fruits ressemblent trait pour trait à une olive, à la différence de sa couleur qui est d'un rouge vif. Sa classification botanique figure dans le **tableau 01**.

Tableau 01 : Classification botanique de *Zizyphus jujuba* (Mahajan et Chopda, 2009)

Classification botanique	
Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes (phanérogame)
Sous- embranchement	anthophytina
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Rosales (rhamnales)
Famille	Rhamnaceae
Genre	<i>Zizyphus</i>
Espèces	<i>jujuba</i>

I.3. Composition biochimique de *Zizyphus jujuba*

Les études phytochimiques menée sur le *Zizyphus jujuba* montrent la présence de métabolites primaires et secondaires.

I.3.1 Métabolites primaires

Ces métabolites sont rassemblés dans le **tableau 02**. Les sucres représentent une proportion importante suivis des protides ensuite des lipides.

Tableau 02. Teneur de la pulpe du jujubier frais en métabolites primaires (Catoire et al, 1999)

Fractions de la pulpe du fruit	(g/100g)
sucres	20% à 32%
lipides	0,1% à 0,3%
protides	0,8% à 2,1%

I.3.2 Métabolites secondaires

Des études sur les différentes espèces du genre *Zizyphus* conduisent à l'isolement et la caractérisation des alcaloïdes cyclopeptides, flavonoïdes, des stérols, des tanins et des saponines triterpéniques (Ikram,Ogihara, et Yamasaki, 1981 ; Nawwar, et al,1984).

I.4. Activités biologiques et thérapeutiques du *Zizyphus jujuba*

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

I.4.1 Effet hypnotique sédatif et anxiolytique

Les graines et les feuilles de plusieurs espèces de *Zizyphus* sont connues pour avoir des effets anxiolytiques et hypnotiques-sédatifs. Elles sont connues pour leur effet sur la réduction de l'activité du système nerveux central qui se traduit par une baisse de l'anxiété en favorisant le sommeil (Jiang et al, 2007). L'effet inhibiteur du Jujuboside A sur l'hippocampe de rat est rapporté par Shou et al , (2002). Des effets anxiolytiques, chez les souris, d'une substance polyherbale contenant l'extrait de pépins de *Z. jujuba*, sont rapportés par Lin et al, (2003). Les deux alcaloïdes, sanjoinine A et nuciferine obtenus à partir des fruits du jujubier prolongent le temps de sommeil produit par l'hexobarbital. Lorsque la sanjoinine est chauffée elle produit un isomère qui a un grand effet sédatif (Han et al, 1986).

I.4.2. Effet inhibiteur de la sensibilité gustative

Des triterpénoïdes inhibiteurs de saveur sucrée ont été isolés à partir de *Z. jujuba*. Les extraits de feuilles de *Z. jujuba* suppriment la sensation de goût sucré chez la mouche

(*Pharma regina*), le rat et le hamster. Les substances anti gustatives isolées à partir de *Z. jujuba* incluent les jujubasaponines II, III, IV, V, VI et le jujuboside B à partir des feuilles et des graines et les saponines ainsi que la Ziziphine I à III à partir des fruits secs. La Ziziphine, et les jujubasaponines II et III sont les trois seules saponines anti gustatives de cette plante présentant des groupes acyl. Elles sont jusqu'à 4 fois plus actives dans la suppression de la saveur sucrée du saccharose que les autres constituants anti-gustatifs permettant ainsi de réduire l'obésité chez les diabétiques et les personnes en surpoids (Suttisri et al, 1995). La saponine ziziphine supprime la sensibilité gustative induite par le D-glucose, le D-fructose, le stéviolside, la glycine, la saccharine sodique, l'aspartame et la naringine dihydrochalcone (Kurihara et al, 1988). Il n'a cependant montré aucun effet inhibiteur du goût amer de l'acide chlorhydrique et le goût amer de la quinine indiquant que la ziziphine est très spécifique au goût sucré (Kurihara et al, 1992). La Ziziphine s'est avérée inhiber les récepteurs du goût sucré chez l'homme (Smith et Halpern, 1983).

I.4.3. Activité anticancéreuse (chimiothérapie)

Des acides triterpénoïques extraits de *Z. jujuba* ont été testés in vitro contre des lignées cellulaires tumorales. Les triterpènes de type lupane ont montré une forte activité cytotoxique. Les activités cytotoxiques des acides 3-Op-coumaroylalphitolic ont été jugées meilleures que celles des non-coumaroïc triterpénénoids. Ces résultats suggèrent que la fraction coumaroyl à la position C-3 du triterpène type lupane peut jouer un rôle important dans l'amélioration de l'activité cytotoxique (Lee et al, 2003). L'acide triterponic et l'acide bétulinique, extrait de *Z. jujuba* et *Z. mauritiana*, ont montré une toxicité sélective contre les cultures de cellules de mélanome humain (Kim et al, 1998). L'acide bétulinique est actuellement en cours de développement préclinique (Pisha et al, 1995). On pense que l'acide bétulinique peut aussi être efficace contre d'autres types de cancer. Récemment, de nombreux travaux scientifiques in vitro ont montré que l'acide bétulinique est efficace contre le cancer des poumons, de l'ovaire, du col de l'utérus, de la tête et du cou (Pisha et al, 1998). Les données publiées suggèrent que l'acide bétulinique induit l'apoptose des cellules sensibles de façon indépendante (Kim et al, 1998 ; Liu et al, 2004 ; Eiznhamer et Xu, 2004).

I.4.4 L'activité antimicrobienne

Sarfaraz et al, (2002) ont rapporté des effets antifongiques de *Z. jujuba* extrait à l'éthanol à partir de la racine et ont montré aussi une activité inhibitrice significative sur les champignons *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus flavus*, *A. Niger* et *Malassezia furfur* (souches 1374 et 1765). En outre, l'extrait d'écorce de racine de *Z. jujuba* montre une activité antibactérienne contre 20 bactéries selon les travaux d'Elmahi et al, (1997). Des

extraits au méthanol et à l'acétone de feuilles de *Z. mauritiana* exercent des effets antibactériens contre *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus vulgaris* et *Bacillus subtilis* (Chowdary et Padashetty, 2000). L'acide bétulinique isolé de l'écorce de la tige de *Z. jujuba* présente une activité antivirale en retardant la progression du VIH 1 (Mukharjee et al, 2003).

I.4.5 L'activité anti-ulcéreuse

Une propriété antiulcéreuse de l'extrait de feuilles de *Z. mauritiana* et *Z. jujuba* est rapportée par Ganachari et Shiv (2004) chez le rat. Cet extrait possède une activité anti-ulcéreuse significative et dose-dépendante. Selon ces mêmes auteurs, l'activité anti-ulcéreuse de *Z. jujuba* peut être attribuée à son action cytoprotectrice et anti sécrétoire.

I.4.6 Effet anti-inflammatoire et antispasmodique

La prescription de composé contenant le fruit de *Z. jujuba* a montré un effet marqué anti-inflammatoire et antispasmodique significatif (Huang et al, 1990). Les extraits de feuilles de *Z. mauritiana* possèdent une importante activité anti-inflammatoire contre l'œdème induit par la carragénine au niveau de la patte de rat (Shiv et al, 2004).

I.4.7 Effets Antiallergiques

L'activité antiallergique des extraits aqueux de feuilles de *Z. jujuba* a été étudiée en mesurant son effet inhibiteur sur la hyaluronidase de testicules bovins. L'activation in vitro des extraits de *Z. jujuba* a montré qu'ils ont une forte activité anti-allergique (Su et al, 2002).

I.4.8 Activité de rehaussement de la perméabilité

Certaines classes de médicaments tels que les peptides créent des problèmes de transport à travers les membranes cellulaires et par conséquent leur biodisponibilité diminue. Pour surmonter cet obstacle, des exhausteurs de perméabilité peuvent être utilisés pour faciliter le passage des médicaments à travers les membranes cellulaires. Pour évaluer l'amélioration de la perméabilité, l'extrait aqueux de graines de *Z. jujuba* a été comparé à deux membres d'une série connue d'agents d'amélioration de la perméabilité appartenant aux alkylglycosides (Eley et al, 2002).

I.4.9 Activités cognitives

Heo et al, (2003) ont suggéré que l'oléamide, un élément extrait de *Z. jujuba*, pourrait être un agent chimio-préventif utile contre la maladie d'Alzheimer. Ils ont constaté que l'extrait méthanolique de *Z. jujuba* a présenté un effet d'activation de 34,1% sur la choline acétyltransférase in vitro, une enzyme qui contrôle la production d'acétylcholine qui semble être épuisé dans les cerveaux des patients atteints d'Alzheimer. L'utilisation d'une fraction

séquentielle de l'ingrédient actif cis-9-octadécénoamide (oléamide), a présenté un effet d'activation de 65%.

I.4.10 Les activités anti-fertilité ou propriété contraceptive

L'extrait d'acétate d'éthyle de l'écorce de *Z. jujuba* a montré une activité antistéroïdogénique affectant la fertilité chez les souris femelles adultes. Il inhibe le cycle normal de l'utérus chez les femelles adultes au stade diestrus et réduit le poids humide des ovaires de manière significative. Le cycle de reproduction normal et stéroïdogénétique de l'ovaire sont restaurés après l'arrêt du traitement. Les activités anti-fertilité des extraits bruts sont réversibles chez le rat (Gupta et al, 2004).

I.4.11 Effet hypotenseur et Anti néphrétique

Ziziphus jujuba stimule la libération d'oxyde nitrique in vitro, sur des cultures de cellules endothéliales et in vivo dans les tissus rénaux de rats (Kim et Han ,1996). Ces derniers chercheurs rapportent que *Z. jujuba* peut avoir un effet hypotenseur (réduction de la pression artérielle) et antinéphrétique (réduction de l'inflammation du rein) probablement en augmentant le flux sanguin rénal.

I.4.12 L'activité cardiovasculaire

Un néo-lignane (substance polyphénolique) isolé à partir de feuilles de *Zizyphus* augmente la libération endogène de prostaglandine I₂ (puissant inhibiteur naturel de l'agrégation plaquettaire et puissant vasodilatateur). Cette augmentation décelée au niveau de l'aorte de rat atteint 25,3% de plus que la normale à 3 µg/ml (Fukuyama et al, 1986).

I.4.13.Effets immunostimulants

L'extrait de feuilles de *Z. jujuba* (5 à 50 µg/ml) stimule la phagocytose chimiotactique et la puissance de destruction intracellulaire des neutrophiles humains (cellules de lutte contre l'infection ou globules blancs) (Ganachari et al, 2004).

I.4.14 Effets antioxydants

Récemment, une approche globale et un compte rendu exhaustif sur les antioxydants de 70 plantes médicinales sont rapportés par Seong et al, (2008) et confirment l'effet antioxydant de *Z. jujuba* (in vitro) tel que rapporté par Na et al, (2001).

I.4.15 Activité de cicatrisation des plaies

Récemment, Ansari et al,(2006), dans leur livre intitulé « les médicaments à base de plantes », ont affirmé que la racine de *Z. jujuba* permet la cicatrisation des plaies. Les données expérimentales sur l'activité de cicatrisation de la racine de *Z. jujuba* chez les animaux de laboratoire ne sont pas disponibles dans la littérature (Preeti et Tripathi S., 2014). Aussi,

[Chopda et Mahajan \(2009\)](#), ont confirmé l'activité de cicatrisation de la racine de *Z. jujuba* chez le rat, utilisée sous forme d'onguent à une dose de 0,5% et 1% en application topique.

II.1. Les espèces réactives oxygénées

La vie en aérobie se traduit au niveau cellulaire par l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale (Curtay et Robin ,2000) ; au niveau de laquelle l'oxygène est normalement transformé en eau .Cette réaction de réduction implique quatre électrons, et est rendue grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes). Elle permet d'apporter à la cellule toute l'énergie nécessaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses fonctions vitales .Ce processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait, car 2 à 5% de l'oxygène est transformé en espèces réactives oxygénées (ERO) ou reactive oxygen species (ROS) (Gueye, 2007) ; qui sont des formes variées de l'oxygène active, elles incluent les radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$), et les espèces non radicalaires qui sont des oxydants et/ou facilement transformées en radicaux comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Halliwell et Whiteman, 2004) (tableau 03).

Tableau 03. Principales espèces réactives oxygénées (Antwerpen, 2006).

Espèces réactives oxygénées (ROS) radicalaires	Espèces réactives oxygénées (ROS) non radicalaires
$\cdot OH$ Radical hydroxyle $RO\cdot$ Radical alkoxyl $ROO\cdot$ Radical peroxy $O_2\cdot$ Anion superoxyde $NO\cdot$ Radical oxynitrique	H_2O_2 Peroxyde d'hydrogène $ROOH$ Peroxyde organique $HOCl$ Acide hypochloreux 1O_2 Oxygène singulet $ONOO\cdot$ Peroxynitrite

Les radicaux libres oxygénés sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe (Gueye, 2007). Cela leur confère une grande réactivité chimique (Dacosta, 2003). Leur hyperréactivité les engage dans des réactions de dénaturation des constituants cellulaires de type peroxydation avec les glucides, les lipides, les protéines et l'ADN, formants des produits très instables .Ceux ci donnent lieu à des réactions en chaîne générant de nouveaux radicaux libres (Curtay et Robin, 2000).

L'espèce réactive primaire de l'oxygène est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) qui résulte de la réduction univalente de l'oxygène moléculaire. Une grande partie de l'anion superoxyde est transformée en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sous l'effet d'une enzyme, le superoxyde dismutase (Milane, 2004).

A son tour, le peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton peut se décomposer en présence de cuivre cuivreux ou fer ferreux pour donner une espèce hautement réactive et a durée de vie très courte, le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) (figure 03) (Nzengue,2008).

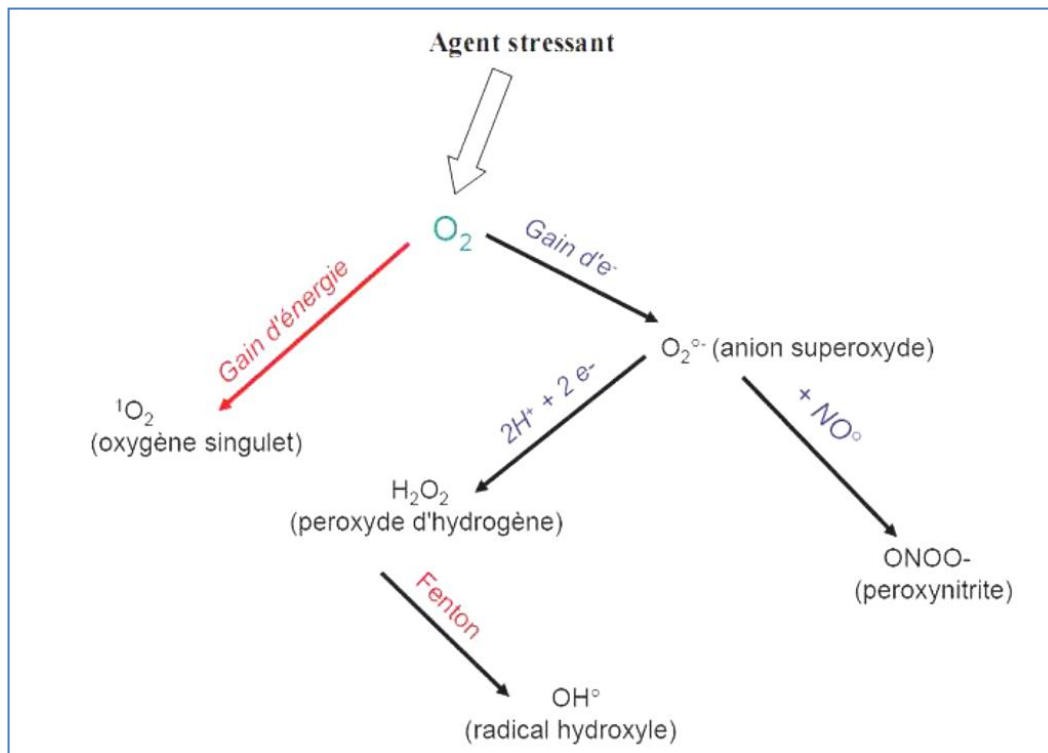


Figure 03 : Les différentes espèces réactives oxygénées (Nzengue, 2008).

II.2.Sources des espèces réactives oxygénées

Les ROS sont produits dans l'organisme par de nombreux mécanismes tant exogènes ou endogènes (Figure04).

II.2.1. Sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des espèces réactives oxygénées.

Les rayonnements UV induisent la synthèse de radicaux libres ($\text{O}_2\cdot^-$, $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$) et des molécules génératrices de radicaux libres (H_2O_2) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants.

Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation des radicaux libres selon divers mécanismes. La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d' $\text{O}_2\cdot^-$. L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH

cytochrome réductase, et du cytochrome P450. D'autre part, [Schisler et Singh , \(1989\)](#) ont montré que l'alcool pouvait diminuer l'activité des enzymes de protection (superoxyde dismutase (SOD), Glutathion peroxydase (SH-Px)). De même, les concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère.

Des toxiques tels que monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels) participent à la genèse de radicaux libres, ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires. NO, NO₂ peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux •OH.

La fumée de cigarette joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires, elle contient NO, NO₂ et des fortes concentrations en composés insaturés, et stimule par son action irritante les macrophages des alvéoles pulmonaires ([Milane, 2004](#)).

D'autres facteurs peuvent conduire à la formation des ROS : les xénobiotiques (toxines, pesticides, herbicides) et médicaments, en plus des aliments qui peuvent contenir des oxydants ([Curtay et Robin, 2000](#) ; [Diallo, 2005](#)).

III.2.2. Sources endogènes

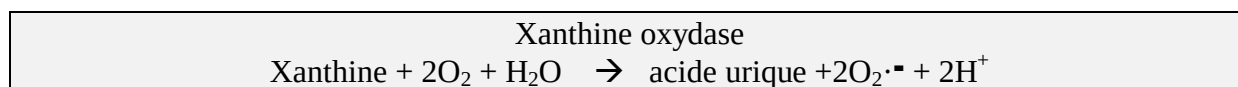
L'une des sources majeures des ROS est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$) ([Marfak, 2003](#)).

Autres chaînes du transport d'électrons (ex : peroxysomes et microsomes) contribuent également à la production du O₂•⁻ dans la cellule aérobie. Les cytochromes P450 et b5 de la chaîne du transport d'électron des microsomes peuvent produire des ROS quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers l'O₂ ([Sevanian et al ,1990](#)).

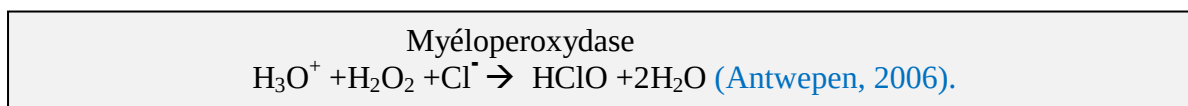
D'autre part les ROS peuvent se produire au cours des processus pathologiques où la production du radical répond à une stimulation et intervient dans le processus inflammatoire (NADPH oxydase et xanthine oxydase) ([Antwerpen, 2006](#)).

Les cellules phagocytaires activées sont le siège d'un phénomène appelé "explosion oxydative", consistant en l'activation du complexe NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme lorsqu'il est contrôlé est capital dans la lutte infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers ([Favier, 2003](#)).

D'ailleurs le système xanthine/xanthine oxydase permet aussi la production de l'anion superoxyde ([Marfak, 2003](#)):



Une autre espèce réactive oxygénée produite au cours de l'inflammation est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; en vue de réagir directement ou de produire l'acide hypochloreux par l'intervention de myéloperoxydase. Cette espèce (HClO) est caractérisée par un pouvoir oxydant nettement plus élevé que le H_2O_2 .



Le monoxyde d'azote est produit aussi par un système enzymatique NO synthétase (NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages ([Favier, 2003](#)). D'autres systèmes sont capables de produire les ROS, citons par exemple : les réactions catalysées par les lipooxygénases et cyclooxygénases dans la voie de synthèse des leucotriènes, thromboxanes et prostaglandines ([Babior et al ., 2002](#)) ; les aldéhydes oxydases ou les protéines hémiques qui peuvent oxyder leur fer (I) en fer (III) avec production du radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ ([Antwerpen, 2006](#)).

C'est ainsi que l'autooxydation des monoamines (dopamine, épinéphrine, norépinéphrine) et l'hémoglobine en présence de traces de métaux peut également être à l'origine de la production des ROS ([Gueye, 2007](#)).

II.3. Stress oxydant

Dans les circonstances normales, les ROS sont produites en faible quantité comme médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptifs par rapport au niveau de radicaux présents.

Dans ce cas, la balance antioxydant/prooxydant est en équilibre. Si tel n'est pas le cas que ce soit par déficit en antioxydants ou par la suite d'une surproduction énormes de radicaux, l'excès de ces radicaux conduit au stress oxydant ([Favier, 2003](#) ; [Haliwell et Whiteman , 2004](#)). La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérées notamment lors de l'oxydation des lipides.

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, maladies cardiovasculaires...etc. (Favier, 2003).

II. 4. Les antioxydants

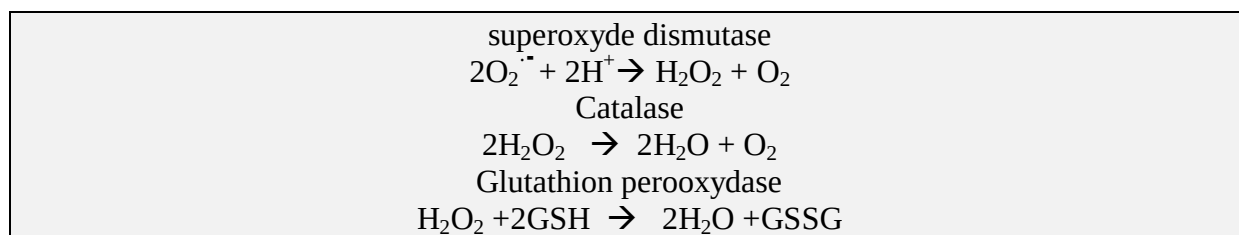
Les antioxydants sont l'ensemble de molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former des composés stables, en séquestrant le fer libre, ou en générant du glutathion (Favier, 2003 ; Dan, 2008).

De nombreux antioxydants interviennent, il s'agit principalement des systèmes enzymatiques et non enzymatiques (Figure04) (Souley Amadou, 2004 ; Yoo et al ., 2008)

II.4.1. Les antioxydants enzymatiques

Cette ligne de défense est constituée principalement de trois enzymes. Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase et de glutathion peroxydase (GPx).

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Lehucher-Michel et al ., 2001).



II.4.2. Les antioxydants non enzymatiques

Ce groupe des antioxydants renferme les protéines de séquestration des métaux, qui agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro oxydants, comme $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ou $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ (ex : la transferrine, la ferritine, l'albumine, caeruloplasmine...etc.).

D'autre part, il y a des molécules à faible poids moléculaire qui agissent soit comme cofacteurs des enzymes citées soit comme antioxydant propre (Antwerpen, 2006).

Les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, l'empêcher ainsi d'attaquer les structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs capables de passer leurs électrons aux ROS et les éliminer (Kohen et Nyska, 2002). Ces molécules proviennent soit de sources endogènes (glutathion, mélatonine, acideurique, la mélanine...), soit de sources exogènes

apportés par l'alimentation (ex : les caroténoïdes, la vitamine E, la vitamine C (Curtay et Robin, 2000), les composés phénoliques (Yoo et al., 2008) et surtout les acides phénoliques, les flavonoides, les tanins, les coumarine (Siddhuraju, 2007). (Figure 04).

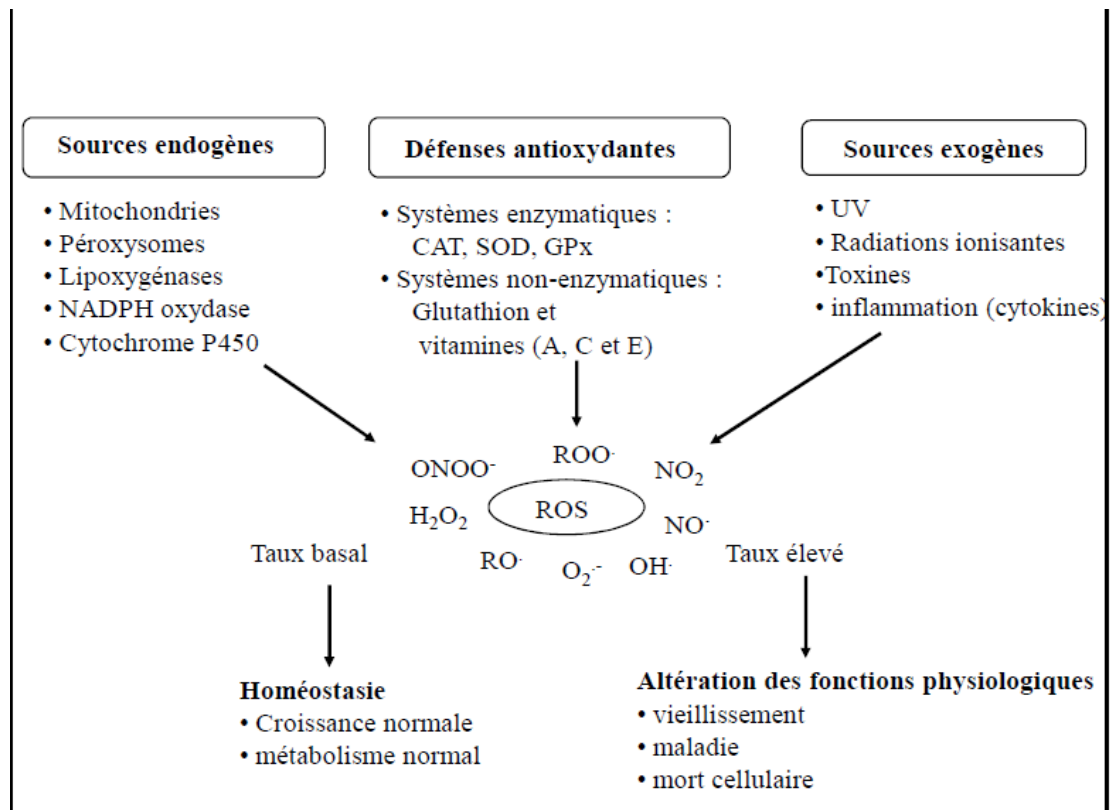


Figure 04 : Origine et réponse cellulaire aux ROS (Petropoulos, 2003)

III.1- Les composés phénoliques

Ce sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (Boizot et Charpentier, 2006).

Les principales classes des composants phénoliques sont les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide ferulique, acide chlorogénique...), les flavonoïdes, les tanins, et les coumarines (King et Young, 1999 ; Tapiero et al, 2002).

Les composés phénoliques se répartissent en 7 classes : Acides phénoliques, Flavonoïdes, Tannins, Stilbènes, Lignanes, Saponines et Phytostérols (figure 05).

Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives (King et Young, 1999). Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants, anti radicalaires et antimicrobiens (Bahorun, 1997 ; Cetkovic et al, 2008).

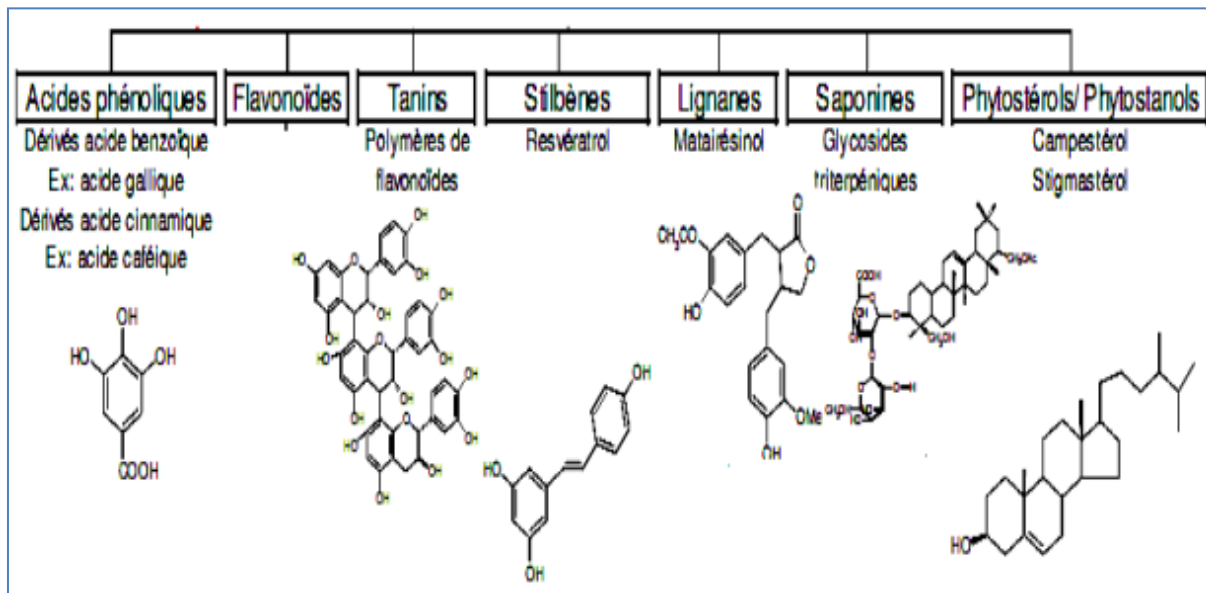


Figure 05. Quelques structures de composants phénoliques (Gervaise, 2004).

III.2 Classification des polyphénols

Les polyphénols peuvent se regrouper en deux grands groupes : Les non flavonoïdes dont les principaux composés sont : les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les

lignines et les coumarines et les flavonoïdes, dont on caractérise principalement : les flavones, flavanones, flavonols, isoflavonones, anthocyanines, proanthocyanidines et flavanols ([Hoffmann, 2003](#)).

III.2.1. Les non flavonoïdes

III.2.1.1 Acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques

III.2.1.2 Stilbènes

Les stilbènes présentent une structure en C6-C2-C6, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para, les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons π sur la totalité de la molécule, Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine. Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés, méthylés, esterifiés, glycosylés ou même prenylés, leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques.

Le resvératrol ou le 3,5,4'-trihydroxystilbène est un polyphénol non flavonoïde et appartenant à la classe des stilbènes. Il est surtout présent dans la pellicule du grain de raisin, Seul son isomère *trans* est actif, il possède de nombreuses propriétés biologiques; cependant, son pouvoir anticancéreux a suscité un grand intérêt ([Belkheri, 2010](#)).

III.2.1.3 Lignines

La lignine est un polymère fortement ramifié, formés par trois alcools phénoliques simples, les alcools sont oxydés en RL par une enzyme ubiquiste chez les plantes ; Les radicaux libres réagissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine. La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées, malgré son abondance (elle n'est dépassée que par celle de la cellulose), sa structure n'est pas bien comprise. La lignine est un très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations. De plus les trois monomères de bases peuvent s'assembler de multiples façon formant une structure tridimensionnelle très ramifiée.

III.2.1.4 Lignanes

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C6-C3)₂ l'unité (C6 - C3) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes. Ils ont été définis comme étant les dimères des phénylpropanoïdes où deux unités de phénylpropane C6-C3 sont liés par leur carbone 8. Ils proviennent de la condensation initiale de deux molécules phénoliques de type monolignol comme l'alcool coniférylique, Ce sont des substances phénoliques apparentées aux lignines, ils n'ont guère de valeur alimentaire humaine, ils sont présents dans la plante sous forme de glucosides (Peterson et al ; 2010).

III.2.1.5 Coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ce sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux. Cependant, leur voie de biosynthèse peut varier d'une espèce à l'autre. En effet, la scopolétine de tabac dérive de l'acide férulique, tandis que des expériences d'apport de précurseurs marqués semblent montrer que ce n'est pas le cas chez le tournesol. Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée, Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance.

Elles sont considérées comme des phytoalexines. Celles-ci sont des molécules de faible masse moléculaire provenant de voies métaboliques variées comme celle des phénylpropanoïdes ou des sesquiterpènes (Hoffmann, 2003).

III.2.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Marfak, 2003). Ces molécules sont considérées comme des pigments quasiment universels des végétaux ; ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Bruneton, 1999). Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides (Ghestem et al, 2001).

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyran (Skerget et al, 2005). Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (figure 06) (Dacosta, 2003).

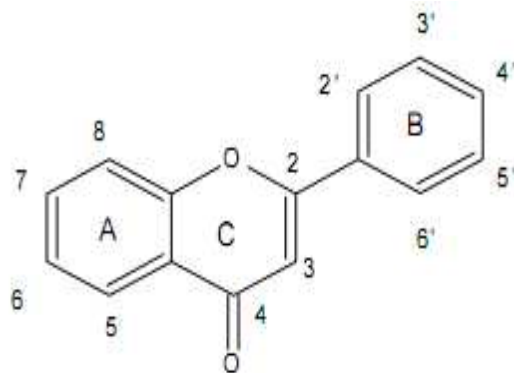


Figure 06 : Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu, 2006).

La classe des flavonoïdes comporte à elle seule plus de 4000 substances qui ont été isolées et identifiées à partir de milliers de plantes (Forkmann et Martens, 2001). Ces composés se subdivisent en plusieurs catégories : Les flavones, les flavonols, les dihydroflavonols, les isoflavonoïdes, les biflavonoïdes, les flavanones, les flavanols, les flavanediols (leucocyanidines), les anthocyanidines, les chalcones, les dihydrochalcones et les aurones (Dacosta, 2003).

III.2.3 Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandus dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Roux et al ; 2007).

III.2.3.1 Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables ou acides tanniques sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation ; l'acide éllagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Ils peuvent diminuer la dégradation des parois dans le rumen et être hydrolysés dans l'intestin en libérant des produits toxiques pour le foie et le rein. Ils sont divisés en éllagitannins et gallotannins. Les gallotannins libèrent par hydrolyse acide, hydrolyse basique, à l'eau chaude ou par action enzymatique de l'acide gallique (Roux et al ; 2007).

III.2.3.2 Tanins condensés

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines. Les tanins condensés sont des

polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B.

Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A ([Roux et al ; 2007](#)).

III.2.4 Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont une classe de pigments liposolubles naturels présents principalement dans les plantes, les algues et les bactéries photosynthétiques. Ils sont responsables de la plupart des nuances de rouge, orange et jaune des feuilles, fruits et fleurs des plantes, ainsi que de la couleur de la peau des poissons et des crustacés. Des exemples familiers de l'activité de coloration des caroténoïdes sont l'orange des carottes et des agrumes, le rouge des poivrons et des tomates et le rose des saumons.

La couleur est l'élément caractéristique de ces molécules, elle peut varier du jaune au rouge. Ces molécules doivent leur couleur à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 nm et 500 nm. Le degré de conjugaison du chromophore détermine les caractéristiques d'absorption du caroténoïde ([Britton et al, 1995](#)). Il faut un minimum de 7 doubles liaisons conjuguées à un composé pour absorber la lumière visible (cas du ζ -carotène). Au delà de 7, plus le nombre de double liaison conjugué est important plus le λ_{max} (longueur d'onde d'absorbance maximale) du caroténoïde est grand et plus sa couleur tend vers le rouge foncé.

Dans l'alimentation humaine, les caroténoïdes sont importants par leur contribution au métabolisme de l'organisme. L'un de leurs rôles, le plus largement étudié, est celui de provitamine A. Ils agissent comme des antioxydants naturels, protégeant les cellules et les tissus des effets nuisibles des radicaux libres. Ils améliorent l'efficacité du système immunitaire, protègent la peau des coups de soleil et peuvent également inhiber le développement de certains types de cancers. Les caroténoïdes sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire, par exemple dans les aliments destinés aux poules pondeuses, aux truites et aux saumons d'élevage. Les xanthophylles (lutéines), la zéaxanthine et la cantaxanthine, présentes dans les jaunes d'œufs, ont des propriétés intéressantes. La lutéine et la zéaxanthine donnent une couleur jaune aux aliments. Elles proviennent habituellement des ingrédients de l'alimentation animale, tels que le maïs et les luzernes. La cantaxanthine (E161) est utilisée pour donner une couleur rougeâtre aux aliments. Elle est souvent d'origine synthétique. L'astaxanthine est principalement utilisée comme colorant pour les truites et les saumons

d'élevage, donnant une couleur orangée à leur chair. Elle peut être d'origine naturelle ou synthétique. Les caroténoïdes sont des composés très instables en raison de leur action antioxydante. Leur teneur dans les aliments doit être surveillée afin de garantir la conformité aux informations de l'étiquetage **.(figure 07)**

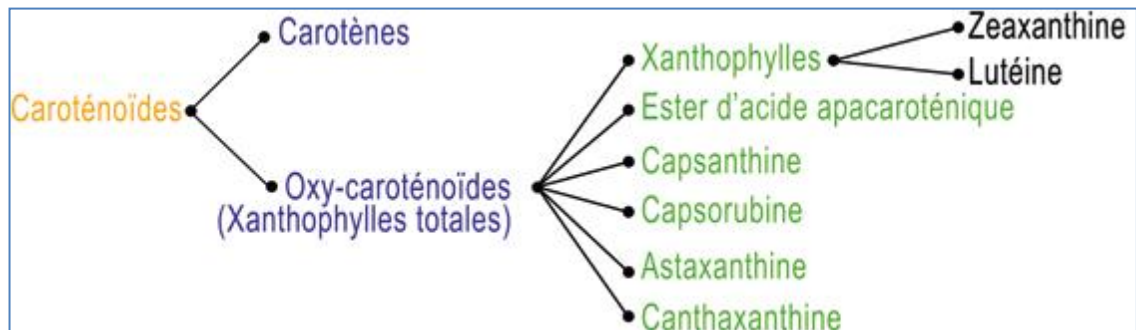


Figure07 : Les caroténoïdes

Chez les organismes photosynthétiques, les caroténoïdes interviennent au niveau de l'antenne photo-collectrice qui permet le transfert de l'énergie lumineuse à la chlorophylle. La photosynthèse est alors efficace sur un plus large éventail de longueurs d'onde. Pour expliquer leur biosynthèse par des organismes non photosynthétiques, on suggère un rôle de régulation de la fluidité membranaire. Mais l'intérêt de ces pigments tient également à leurs propriétés anti-oxydantes (Bast et al 1998). Leur structure permet de piéger les espèces réactives de l'oxygène protégeant ainsi la cellule. Cet effet antioxydant présente un avantage pour toutes les espèces aérobies qu'elles soient ou non photosynthétiques. Certains caroténoïdes sont des éléments nutritifs importants pour l'homme et les animaux puisqu'ils servent de précurseurs à la vitamine A, le rétinol. En effet, la première étape dans la formation du rétinol est le clivage de la double liaison centrale du β -carotène, ce qui permet l'obtention de deux molécules de rétinol qui, après réduction, donneront la vitamine A (Armstrong 1999, Bauernfeind 1981). En outre, les caroténoïdes seraient également impliqués dans la prévention de certaines maladies. Leur effet bénéfique a été montré dans les maladies de l'œil dont la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age), les maladies cardiovasculaires, certains cancers et l'érythème induit par la lumière. L'action des caroténoïdes dans la prévention de ces maladies serait liée à leur pouvoir anti-oxydant. Enfin les caroténoïdes auraient un rôle dans la régulation du système immunitaire et dans la protection de la stabilité génomique (Fraser et Bramley, 2004).

IV.1. Inflammation

L'inflammation est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression qui entraîne une altération tissulaire. Elle peut être déclenchée par un traumatisme, une brûlure, une irradiation ou par la pénétration d'agents pathogènes extérieurs (virus, bactérie, parasite, antigènes) (Schoroderet, 1992). La fonction principale de l'inflammation est d'éliminer l'agent agresseur et de permettre la réparation des tissus (Weill *et al.*, 2003). L'inflammation de courte durée dite inflammation aiguë est un phénomène bénéfique pour l'organisme qui lui permet de retrouver son intégrité physiologique. Alors que l'aspect négatif de l'inflammation intervient quand cette dernière se pérennise et devient une inflammation chronique. Dans ce cas la réaction inflammatoire doit être contrôlée par les médicaments (Weill *et al.*, 2003).

IV.1.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est caractérisée par quatre phénomènes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Botting et Botting, 2000). Elle dure de quelques jours à quelques semaines. L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire immédiate (quelques minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale ; une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus (Weill *et al.*, 2003) (figure 08).

IV.1.1.1. La phase vasculaire

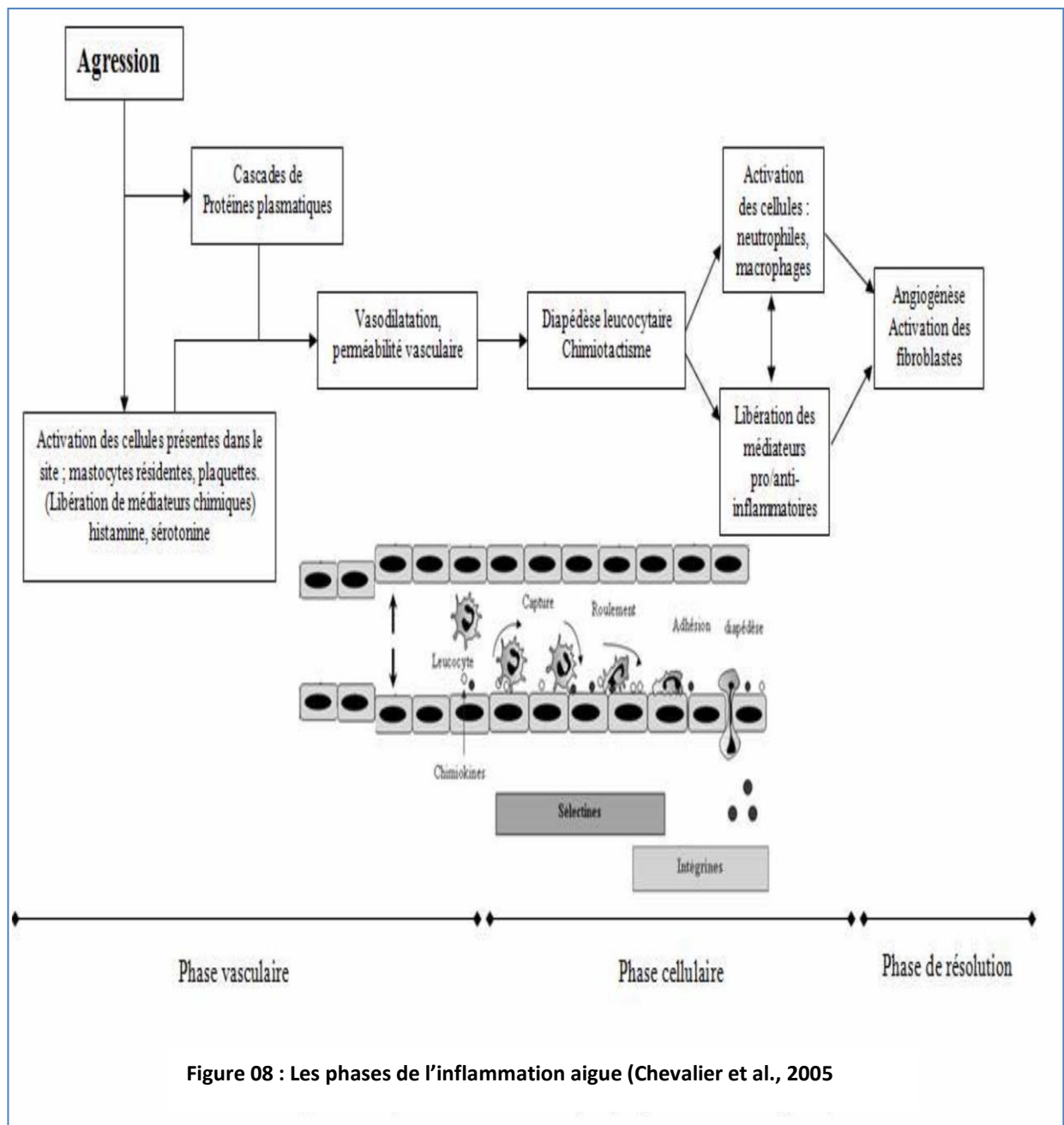
L'activation des plaquettes qui survient suite à une lésion tissulaire touchant ou pas les veinules ou les artérioles, constitue la première étape de la phase vasculaire (Steinhubl, 2007). Les mastocytes résidents qui peuvent aussi être activés par un très grand nombre de stimuli, sont également susceptibles d'initier la réaction inflammatoire (Botting et Botting, 2000). Une fois ces deux types de cellules activés, plusieurs médiateurs tels que la sérotonine, l'histamine et des dérivés de l'acide arachidonique sont libérés. D'autre part, l'activation de la cascade de coagulation et du système du complément qui surviennent suite à une agression externe conduisent à la génération de divers médiateurs doués d'activités vasodilatatrices et chimio attractantes comme le facteur XII, la fibrine, la bradykinine, C3a et C5a (Fauve et Hevin, 1998). Ceci induit une vasodilatation des vaisseaux sanguins avec une augmentation du débit local et une modification de la perméabilité vasculaire. Cette dernière est due à l'augmentation des fenêtres intercellulaires, ce qui permet l'extravasation des protéines

plasmatiques vers les tissus (exsudation plasmatique). Les neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine sont également susceptibles de déclencher les événements de la phase vasculaire de l'inflammation. Ce phénomène est connu sous le nom de l'inflammation neurogénique (Börzsei et al., 2008). Suite à une stimulation, ces neurones libèrent principalement deux médiateurs ; la substance P et le peptide lié au gène de la calcitonine. Ces derniers induisent une vasodilatation et une exsudation plasmatique en agissant sur les cellules endothéliales et les muscles lisses des vaisseaux sanguins (Birklein et Schmelz, 2008), comme ils peuvent activer directement les mastocytes et les autres cellules immunitaires. Il est également admis que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénases capables de synthétiser les prostaglandines pro-inflammatoires (Richardson et Vasko, 2002). L'augmentation du débit micro-circulatoire au niveau du site enflammé explique partiellement l'apparition de chaleur et de rougeur. L'exsudation plasmatique induit un œdème par distension des tissus et provoque une hyperpression sur les terminaisons nerveuse locales, ce qui explique les sensations de tuméfaction et de douleur (Weill et al., 2003).

IV.1.1.2. La phase cellulaire

L'exsudation plasmatique permet l'apparition de plusieurs substances dans les espaces extravasculaires : anticorps, substances bactéricides, facteurs de coagulation, composants du complément, kininogènes, interleukines, interférons et des dérivées de l'acide arachidonique. Ceci conduit à un afflux extravasculaire des leucocytes attirés par les chimioattractants existants dans l'exsudat et ceux libérés au niveau du site enflammé (Schoroderet, 1992). La première étape de cet afflux consiste en une marginalisation des leucocytes grâce à l'expression d'adésines (intégrines, sélectines, membres de la superfamille des immunoglobulines) au niveau des cellules endothéliales et des leucocytes activés (Fauve et Hevin, 1998). Ceci permet l'interaction entre l'endothélium et les phagocytes du sang, principalement les polynucléaires neutrophiles (PMNs) et les monocytes, et leur passage à travers les cellules endothéliales contractées sous l'effet de certains médiateurs inflammatoires tel que la bradykinine et certains dérivés de l'acide arachidonique (Schoroderet, 1992). Guidées par le gradient de concentration des chimioattractants, les leucocytes parviennent au tissu lésé (Weill et al., 2003). Les monocytes achèvent leur différenciation en macrophages et amorcent avec les PMNs la phagocytose des agents extérieurs et/ou des débris cellulaires. De nombreuses protéases (collagénase, élastase) et des radicaux libres dérivés du métabolisme de l'oxygène et du monoxyde d'azote sont produits au cours de la phagocytose. Les effets cytotoxiques locaux de ces produits sont très importants

(Fauve et Hevin, 1998).



IV.1.1.3. La phase de résolution

Le rétablissement de l'homéostasie tissulaire après une agression nécessite d'abord l'arrêt de la réponse inflammatoire et ensuite la réparation des tissus lésés. L'arrêt de la réponse inflammatoire fait intervenir plusieurs médiateurs tel que les cytokines anti- inflammatoires (IL-10 et TGF- β 1), l'expression des récepteurs solubles comme TNF- α et l'apoptose des cellules inflammatoires. La réparation des tissus fait intervenir les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Eming et al., 2007). Dans les

conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles. Les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps à la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes (Weill et al., 2003). Si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction tissulaire, ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui produisent les protéines de la matrice intercellulaires comme le collagène, la fibronectine et la laminine, pour permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogénèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Weill et al., 2003).

IV.1.2. Inflammation chronique

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

IV.1.3. Cellules impliquées dans la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire fait intervenir plusieurs types cellulaires :

Les polynucléaires neutrophiles représentent le composant cellulaire majeur de l'inflammation aiguë (40–75 % des cellules inflammatoires). Ils migrent sous l'effet des chimioattractants vers le site inflammatoire où ils phagocytent l'agent agresseur ou les débris cellulaires (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1999). Les neutrophiles libèrent différentes molécules tel que les protéinases, les radicaux libres, les chimokines et des cytokines pro-inflammatoires (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1996). Les polynucléaires neutrophiles sont également impliqués dans la réparation tissulaire (Eming et al., 2007).

Les mastocytes sont des cellules résidentes des tissus conjonctifs. Ils jouent un rôle très important dans le déclenchement de la réaction inflammatoire (Weill et al., 2003). Ils se caractérisent par la présence dans leur cytoplasme de très nombreuses granulations contenant

des médiateurs inflammatoires comme la sérotonine, l'histamine, l'héparine et des cytokines (Williams et Galli, 2000). Ils sont aussi impliquées dans la réparation tissulaire (Eming et al., 2007).

Les monocytes sont des cellules mononuclées circulantes qui migrent vers le site inflammatoire et se différencient en macrophages. Ils ont pour rôle de phagocyter l'agent agresseur ou les fragments de tissus altérés (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1999). Ils interviennent aussi dans l'amplification de la réaction inflammatoire en libérant des médiateurs stimulant d'autres cellules inflammatoires. Les monocytes interviennent également dans la phase de réparation tissulaire (Eming et al., 2007).

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

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

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

IV.1.4. Médiateurs de la réaction inflammatoire

Les changements locaux qui surviennent au niveau du site inflammatoire sont le résultat de la formation et/ou la libération séquentielle de médiateurs pro et anti-inflammatoires de nature divers ; amine (histamine et sérotonine), médiateurs lipidiques (prostaglandines et leukotriènes), et des cytokines de nature peptidique, protéique ou glycoprotéique (Botting et Botting, 2000). (**Tableau 05**)

Les médiateurs lipidiques de l'inflammation Sous ce terme sont regroupés tous les produits terminaux du métabolisme de l'acide arachidonique, principalement les prostaglandines, les leucotriènes et le PAF. Cette voie métabolique est essentiellement catalysée par la phospholipase A2 (PLA2) de type IV, une enzyme permettant la libération de l'acide arachidonique à partir des lipides membranaires. Deux voies enzymatiques principales divergent ensuite pour conduire, à partir de l'acide arachidonique, à la formation de

médiateurs lipidiques de l'inflammation biologiquement actifs : la voie des cyclooxygénases (COX) et celles des lipoxygénases (figure 3). - 20 - L'activité COX conduit à la formation de prostaglandine (PG) et thromboxane (TX).

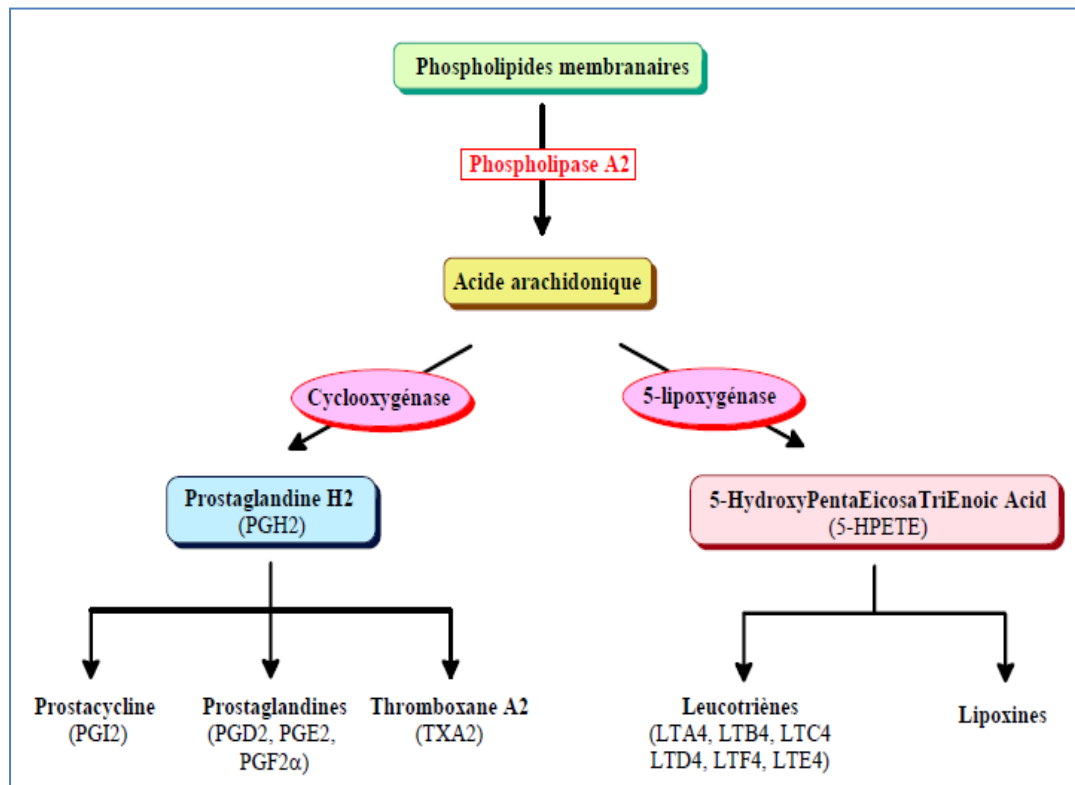


Figure09 : Biosynthèse des eicosanoïdes (Russo-Marie et al., 1998)

Ces médiateurs sont essentiellement libérés, à des niveaux variables selon l'appareil enzymatique disponible, par les cellules endothéliales, les macrophages, les mastocytes, les plaquettes et les fibroblastes. Les leucotriènes (LT) sont synthétisés par des réactions catalysées par les lipoxygénases. La 5-lipoxygénase est une enzyme dont la distribution est limitée à certaines cellules d'origine médullaire, aux PNN, éosinophiles, basophiles, aux monocytes / macrophages, mastocytes et lymphocytes B. Phospholipides membranaires Acide arachidonique Prostaglandine H2 (PGH2) 5-HydroxyPentaEicosaTriEnoic Acid (5-HPETE) Cyclooxygénase 5-lipoxygénase Leucotriènes (LTA4, LTB4, LTC4 LTD4, LTF4, LTE4) Lipoxines Prostacycline (PGI2) Prostaglandines (PGD2, PGE2, PGF2α) Thromboxane A2 (TXA2) Phospholipase A2 (**Figure 09**). Biosynthèse des eicosanoïdes.1 Les médiateurs inflammatoires lipidiques les plus puissants sont sans conteste la PGE2, la PGI2, et le LTB4 qui contribuent au recrutement des cellules immunitaires sur le site inflammatoire

IV.1.5. Implications pathologiques de l'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme. Cependant, l'implication de l'inflammation dans plusieurs pathologies humaines

est bien évidente. Le tableau 04 cite quelques exemples.

Tableau04 : Exemples de maladies liées à l'inflammation (Nathan, 2002).

*Désordres dans lesquels le rôle pathogénique principal revient à l'inflammation	
Asthme	Polyarthrite rhumatoïde
Artériosclérose	Arthrose
Goutte	Thyroïdite d'Hashimoto
Maladie d'Alzheimer	Lupus érythémateux disséminé
Eczéma	Maladie de Crohn
Spondylarthrite ankylosante	Rectocolite hémorragique
Broncho-pneumopathie chronique obstructive	
*Maladies d'origine infectieuses dans lesquelles l'inflammation contribue dans la pathologie	
Hépatite C	
Tuberculose	
Gastrite induite par Helicobacter pilory	
Tuberculose	
Dysenterie bactérienne	
*Maladies d'origines diverses dans lesquelles la fibrose post-inflammatoire est la cause principale de la pathologie	
Fibrose pulmonaire idiopathique	
Cirrhose hépatique poste virale ou alcoolique	
Bilharziose	

Tableau 05 : origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires
(Rankin 2004 , Male et al, 2007)

Médiateurs	Origine	Actions
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes.	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine	Mastocytes et plaquettes.	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur activateur des plaquette (PAF)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales.	Assure la vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule la bronchoconstriction, l'aggrégation des plaquettes et la libération des médiateurs qu'elles renferment, induit la production des EOR et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages.
Kalicroïne	Présente dans le plasma	Transforme et active le système des Kinines
Plasmine	Présente dans le plasma	Clive le composant du complément C ₃ pour générer le C3a et le C3b
Leucotriènes : -LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄	Essentiellement par les leucocytes	Augmentent la perméabilité des micro- vaisseaux.
-LTB ₄	Essentiellement par les leucocytes	Augmente la perméabilité vasculaire et le flux sanguin local, induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR et attire et active les cellules inflammatoires.
Prostaglandine E2	Essentiellement par les leucocytes	Provoque la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.
Bradykinine	Présente dans le plasma sous forme de kininogènes.	Accroît la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur de Hagman (XII)	Présent dans le plasma et est activé par l'adhésion des plaquettes.	Impliqué dans la cascade de coagulation.
Thrombine	Présente dans le plasma	Catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine et induit la libération de la sérotonine des plaquette.
Fibrine	Présente dans le plasma, formée à partir du finbrinogène	Intervient dans la formation du caillot sanguin.
IL-8	Monocytes, macrophages, plaquettes et lymphocytes.	Active le chimiotactisme des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR. Intervient dans la réparation tissulaire
C3a	Fraction C3 du complément inactif.	Provoque la dégranulation des mastocytes.
C5a	Fraction C5 du complément inactif	Provoque la dégranulation des mastocytes et des neutrophile, exerce un effet chimiotactique en vers les phagocytes et stimule la contraction du muscle lisse.

IV.1.6. Anti-inflammatoires

IV.1.6.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur, la fièvre et l'inflammation depuis plus de 3000 ans et ils sont toujours utilisés quotidiennement par des millions de patients à travers le monde. Ce sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique (tableau 06) mais ils ont en commun l'inhibition non-sélective de l'enzyme cyclooxygénase (Bidaut-Russel, 2008).

Tableau 06. Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. (Wallace et Staats, 2004).

Classe structurale	Nom scientifique	Nom commercial
salicylates	Acétyle salicylique Salsalate (sodium salicylates) Diflusal	Aspirine / dolobid
Dérivés d'acide propionique	Ibuprofene Fenoprofene calcium Flubiprofen Ketoprofen	Ibuprofene Nalfon Ansaid Nalfon
Dérivés d'acide acetique	Diclofenac	Voltarene
indoles	Indométacine Tolmetin Sulindac	Indocine Tolectine cliniril

Cependant, l'usage des AINS est associé à de nombreux effets indésirables avec une prévalence considérable de nouvelles maladies et de mortalité (Bidaut-Russell, 2001). Les effets secondaires du traitement par les AINS sont attribués à leur inhibition non sélective des isoformes de la cyclooxygénase dont la COX-1 qui est présente de façon constitutive dans la plupart des tissus humains. Celle-ci a pour rôle la régulation d'un nombre de processus physiologiques tel que la maintenance de l'intégrité de la muqueuse gastrique, la fonction rénale, et l'agrégation plaquettaire (Vonkeman et al., 2008) Pour cette raison, les laboratoires de l'industrie pharmaceutique ont essayé de développer des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 qui est une enzyme induite après l'exposition de l'organisme aux stimuli inflammatoires. Celle ci induit (avec d'autres médiateurs) une réponse inflammatoire subséquente (Vonkeman et al., 2008).

De nouveaux médicaments ont été mis sur le marché depuis l'an 2000 tel que le rofecoxib (Vioxx[®]) et le célécoxib (Celebrex[®]), avec une efficacité comparable et une meilleur tolérance gastro-intestinale (Weir et al., 2003). Mais en 2004, le rofécoxib a été retiré du marché à la demande de la firme qui le commercialisait car son utilisation à long terme

semble avoir entraîné de très nombreux accidents cardiovasculaires et décès ([Jüni et al., 2004](#)).

IV.1.6.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol ([tableau 07](#)). Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immunes ([Payne et Adcock., 2001](#)). Leur mécanisme d'action est le même que celui des glucocorticoïdes endogènes. Ils se lient au récepteur des glucocorticoïdes dans le cytoplasme induisant ainsi sa dimérisation et sa translocation vers le noyau où il se lie à son élément de réponse sur les gènes appropriés. Ceci conduit à une élévation de la transcription des gènes codants pour les protéines anti-inflammatoires tel que la lipocortine-1 et l'interleukine 10, avec une inhibition de l'expression de plusieurs gènes codants pour des protéines pro-inflammatoires incluant des cytokines, des enzymes, des récepteurs et des molécules d'adhésion ([Barnes., 1998](#)).

Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets indésirables s'accroît avec le prolongement de la durée du traitement et l'augmentation de la posologie. Divers troubles peuvent être observés. Ces troubles peuvent être aigus tel que l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes à la fin du traitement, l'euphorie avec insomnie allant jusqu'à une psychose aiguë et l'apparition d'ulcères gastroduodénaux. Des troubles chroniques peuvent aussi se manifester tels que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids ([Henzen, 2003](#)).

Tableau 07 : Principaux glucocorticoïdes ([Henzen, 2003](#))

Glucocorticoïde	Nom commercial
Cortisol (Hydrocortisone)	Hydrocortone, Solu-Cortef
Cortisone	Cortison CIBA
Prednisone	Prednison Streuli
Prednisolone	Spiricort, Ultracorten
Methylprednisolone	Urbason, Solu-Medrol
Triamcinolone	Kenacort, Ledercort
Bétaméthasone	Celestene, Diprostene
Dexaméthasone	Fortecortin, Decadron

IV.1.6.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes médicinales sont très utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde pour le soulagement des maladies inflammatoires tel que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, la bronchite l'eczéma, l'arthrose, la goutte, la rhinite allergique, les ulcères gastriques et duodénaux (Setty et Sigal, 2005 ; Wiart, 2006). Le **tableau 08** montre quelques plantes médicinales traditionnelles avec leurs usages.

L'activité anti-inflammatoire de ces plantes revient à leur contenu en métabolites secondaires doués d'activités biologiques; polyphénols, stérols, alcaloïdes, saponines, coumarines, terpènes, polysaccharides ect.

Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'effet anti-inflammatoire d'un grand nombre de ces plantes ainsi que le mécanisme d'action de plusieurs d'entre elles. Les substances actives des plantes peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, l'activation du facteur nucléaire kappa-B et la production des espèces oxygénées réactives (Dowiejua et Zeitlin, 1993).

Dans ce contexte, plusieurs exemples de plantes peuvent être cités : *Curcuma longa* (curcuma) contient un pigment jaune appelé curcumine, un polyphénol qui inhibe la production de la prostaglandine E2 et l'expression de la cyclooxygenase 2 (Madden et al., 2009). En revanche, il n'exerce aucun effet sur l'expression de la cyclooxygenase 1. La curcumine inhibe aussi l'expression des gènes de L'IL-6 et de L'IL-8 et diminue de manière dose dépendante la production de NO et l'expression de l'enzyme NO Synthase (NOS) inducible (Mathy et al, 2007). La curcumine inhibe également le facteur nucleaire kappa-B (Aggarwal et Sung, 2008).

Le gingembre (*Zingiber officinale*) est utilisé en médecine asiatique pour traiter les inflammations et les rhumatismes. Il contient un grand nombre de constituants; gingerol, beta-carotène, capsaïcine, acide caféique et curcumine, dont l'activité anti-inflammatoire est bien évidente. Les extraits de rhizome du gingembre sont de puissants inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines et des leucotrienes, comme ils inhibent la production du TNF- α en agissant sur l'expression des gènes (Setty et Sigal, 2005). *Baccharis trimera* est une plante médicinale utilisée pour le traitement du rhumatisme. Elle contient un diterpénoïde qui montre une inhibition importante de la phospholipase A2 (Januario et al, 2004). *Arnica montana* est également très utilisée par les occidentaux pour le traitement des œdèmes et des meurtrissures. Son effet anti-inflammatoire revient à ses sesquiterpènes lactones tel que

l'hélénaline et la dihydrohélénaline qui inhibent le facteur de transcription NF- κ B, facteur crucial du processus inflammatoire (Wiar, 2006 et Lyss G et al., 1997). *Harpagophytum procumbens* ou griffe du diable, est une plante issue de la médecine traditionnelle africaine. Son activité anti-inflammatoire a été largement investiguée in vivo et in vitro. Cette plante réduit significativement l'œdème de la patte induit par la Carragénine (Catelan et al., 2006). Elle inhibe la synthèse des eicosanoides, comme elle inhibe la production du TNF- α par les monocytes humains. Elle réduit également la production de la myeloperoxydase par les neutrophiles et bloque la synthèse de la prostaglandine E2 (Setty et Sigal, 2005).

Tableau 08 : Exemples de plantes médicinales antiinflammatoires (Erdemoglu et al., 2003)

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Nom commun	Utilisation
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Rhizome	gingembre	arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
<i>Helleborus orientalis L.</i>	Ranunculaceae	Racines	Lenten-rose	Œdèmes, douleurs rhumatismales
<i>Urtica dioica</i>	urticaceae	Feuilles, racines	ortie	Rhinite allergique, eczéma goutte, douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis R.</i>	rosaceae	Feuilles, graines	laurier	Fièvre, pharyngites, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Curcuma longa</i>	zingiberaceae	rhizomes	curcuma	douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales.
<i>Ocimum basilicum</i>	lamiacées	feuilles	basilic	Lombalgie, arthrose
<i>Rubus sanctus schreber</i>	rosaceae	racines	ronces	douleurs rhumatismales, infection rénales, hémorroïdes
<i>Oenothera biennis</i>	onagraceae	graines	Onagre bisannuelle	douleurs rhumatismales, syndrome sjogren
<i>Nerium oleander L.</i>	apocynaceae	fleurs	Laurier rose	Douleurs, maux de tête
<i>Harpagophytum procumbens</i>	pédaliacées	tubercule	Griffe du diable	Lombalgie, arthrose Douleurs, maux de tête, névralgie
<i>Rhododendron ponticum L.</i>	ericaceae	feuilles	Rhododendron pontique	Œdèmes, états grippaux, mal de dents
<i>Juglans regia L.</i>	juglandaceae	Feuilles , fruits	Noyer commun	Douleurs rhumatismale, malaria, fièvre, eczéma

Matériels et méthodes

Première partie :

*Analyse des métabolites primaires et secondaires et
évaluation de l'activité antioxydante de la pulpe du fruit
du jujubier*

V.1. Matériel végétal

Il est constitué des fruits de Zizyphus, cueilli à maturité en septembre 2011 dans la région de Sidi Bel Abbès. .

Les fruits sont identifiés par les botanistes du département des sciences de l'environnement et un échantillon est conservé au laboratoire de biotoxicologie sous le code [FJ SBA 2012](#). Les pulpes du fruit sont séparées du noyau et laissées à l'ombre, à l'abri de la lumière et à température ambiante. La partie comestible est ensuite malaxée pour obtenir une pâte, qui a servi pour les analyses et la préparation des différents extraits.

V.2. Extraction

Les composés phénoliques ont été extraits de la PFJ fraîchement préparée selon le procédé modifié de [Dewanto et al., 2002](#). Un échantillon de PFJ (50 g) est mélangé à 150 ml d'éthanol à 80% pendant 05 minutes en utilisant un mixeur de cuisine. Le mélange est homogénéisé dans un récipient et extrait par traitement aux ultrasons pendant 20 min. Le surnageant est séparé et le résidu est soumis à une double réextraction en répétant les étapes ci-dessus dans les mêmes conditions. Les trois filtrats sont combinés et filtrés sous Büchner puis rincés avec de l'éthanol pur. La phase alcoolique est évaporée sous pression réduite par le rotavapor type [Laborota 4000](#) à 45°C. L'extrait éthanolique du Zizyphus (EEZ) est conservé à -20°C à l'obscurité jusqu'à son utilisation pour la quantification des composés fonctionnels.

V.3. Dosage des composés du métabolisme primaire

V.3.1. Taux d'humidité

Pour déterminer la teneur en eau, la matière fraîche subit une dessiccation à une température de 103±2°C dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique ([Memmert UF 110](#)) jusqu'à une mesure pratiquement constante ([Audigié et al, 1984](#)).

La teneur en eau est la différence entre le poids de l'échantillon avant et après la dessiccation jusqu'à poids constant.

$$H\% = \frac{M_1 - M_2}{P} \times 100$$

H% : taux d'humidité ou teneur en eau

M₁ : masse en gr de la capsule avec l'échantillon avant déshydratation

M₂ : masse en gr de la capsule après déshydratation.

P : masse en gr de la prise d'essai.

V.3.2. Taux de cendre

La teneur en matière minérale est conventionnellement le résidu de la substance après minéralisation de la matière sèche des échantillons dans un four à moufle ([Heraeus Instruments](#)). Elle est obtenue par incinération à 500-600°C ([Pinta, 1980](#) ; [AOAC, 1980](#)).

$$\text{Mo \%} = \frac{M_1 - M_2}{P} \times 100$$

Mo : matière organique

M₁ : masse en g de la capsule et la matière sèche avant incinération.

M₂ : masse en g de la capsule avec les cendres.

P : masse en g de la prise d'essai.

La teneur en cendre est déterminée comme suit : cendre%=100-Mo%

V.3.3. Dosage des protéines

V.3.3.1 Extraction des protéines

L'extrait protéique est obtenu en ajoutant 0,226 g de sulfate d'ammonium à 1mL de l'extrait aqueux de l'échantillon. Après une incubation à froid pendant 12 h, la solution est centrifugée à 13 400 g à 4 °C pendant 20 min. Le surnageant obtenu est éliminé et le culot repris dans du tampon phosphate salin pH 7,4 ensuite conservé à -20°C jusqu'au dosage ([Englard et al, 1990](#)).

V.3.3.2 Dosage des protéines

Une méthode colorimétrique est utilisée pour effectuer ce dosage. Elle est développée par [Lowry et al, \(1951\)](#) qui ont combiné une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. La grande sensibilité de la méthode de Lowry est sa principale qualité. Elle peut atteindre 5-10 µg. La zone de linéarité de la réaction est cependant étroite et il faut utiliser la portion linéaire de la courbe qui correspond à l'absorption de la sérum albumine bovine (SAB).

Mode opératoire

Dans un tube à essai 1 ml de l'extrait et ajouté à 5ml de réactif de Lowry. Après agitation, 0.5 ml de Folin Ciocalteu dilué extemporanément au 1/2 est ajouté au mélange (une agitation est nécessaire après l'ajout du Folin).

Après 30 min une lecture est effectuée à 660nm.

La droite d'étalonnage a été préparée à partir de sérum albumine bovine (5g/l) à différentes concentrations suivant les mêmes étapes de notre échantillon.

Réactif de Lowry:

50 ml de solution de Lowry A est additionnée à 1 ml de solution de Lowry B.

Solution de Lowry A:

Na ₂ CO ₃	1 g
NaOH (0.1 mol.L ⁻¹)	50 ml

Solution de Lowry B:

CuSO ₄ 5H ₂ O	25 mg
Tartrate de K et Na	50 mg
H ₂ O	5 ml

V.3.4. Teneur en matière grasse

En utilisant l'extracteur de SOXHLET le jujube est pesé et placé dans une capsule. L'échantillon est extrait en continu par de l'éther de pétrole à l'ébullition qui dissout graduellement la matière grasse (Penchev, 2010). Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral du dispositif de distillation. Comme seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète.

Une fois l'extraction terminée l'éther est évaporé par Rotavapor et la MG est pesée.

I.3.5. Dosage des sucres totaux

Les sucres sont dosés par une méthode spectrophotométrique de Dubois et al,(1956). Les glucides en milieu acide sulfurique et à chaud sont déshydratés en dérivés du furfural qui se combine facilement avec le phénol et donnent une coloration jaune (le glucose fournit de l'hydroxyfurfural). La coloration est permanente.

Cette méthode est très sensible puisqu'elle permet de détecter des quantités de glucides de l'ordre de 1µg.

Mode opératoire

La solution à doser (1ml de l'extrait hydrique du fruit de jujube) est mise dans un tube à essai avec 1 ml de phénol à 5% dans l'eau. 5 ml de H₂SO₄ sont ajoutés rapidement sans les faire couler le long des parois et le mélange est agité immédiatement. Une coloration jaune se développe, stable durant plusieurs heures. Les tubes sont placés au bain-marie à 25°C pendant 15 minutes puis refroidis sous eau à 20°C.

L'absorbance est mesurée à 492 nm.

Les teneurs sont déterminées en référence à une gamme étalon de glucose.

V.3.6. Détermination de la teneur en acide ascorbique

La quantification de la vitamine C (acide ascorbique) est réalisée par la méthode de 2,6 dichlorophénolindophénol (DIP) décrite par [Klein et Perry, \(1982\)](#) avec quelques modifications ([Yen et al, 2008](#))

Equations du dosage

Acide ascorbique $\rightarrow 2H^+ + 2e^-$ + acide déhydroascorbique

Dichlorophénol-indophénol + $2H^+ + 2e^- \rightarrow$ leucodérivé réduit

Equation-Bilan

Acide ascorbique + 2,6-DCPIP $\rightarrow$ A. déhydroascorbique + dérivé réduit

Mode opératoire

- 0,5 g de fruit sec (jujube) coupé en petits morceaux est extraite avec 10 ml d'acide oxalique (1%) ;
- L'extrait est centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes ;
- On mélange 5 ml de surnageant avec 9 ml de DIP à 0,2mM, bien mélanger pendant 15 secondes, puis l'absorbance est mesurée à 515nm.
- La courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant l'acide ascorbique comme standard avec une gamme de concentration allant de 0 à 500 µg pratiqué dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.
- Les résultats obtenues de la teneur en acide ascorbique sont exprimés µg/g de Zizyphus brut.

V.4. dosage des composés du métabolisme secondaire

V.4.1. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques de l'extrait EEZ du fruit de *Zizyphus jujuba* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon [Singleton et al,\(1999\)](#). Cette technique est basée sur la réduction en milieu alcalin du mélange phosphotungstique - phosphomolybdique et réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm et dont

l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (George *et al*, 2005).

0.5 ml de l'extrait EEZ est ajouté à 5 ml d'eau distillée. 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu sont additionnés. Après 3 min, 0.5 ml d'une solution de carbonate de sodium 100mg/ml sont ajoutés. Après mélange initial, les flacons opaques sont laissés au repos pendant 2 h. La densité optique des échantillons de couleur bleue est mesurée à 765 nm. Les concentrations en polyphénols sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec différentes concentrations d'acide gallique (15,6 µg/ml à 2 mg/ml) et sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par 100 g de matière sèche (mg EAG/100g MS).

V.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes totaux de l'EEZ sont évalués à l'aide d'un test colorimétrique légèrement modifié selon Zhishen *et al*, 1999. Dans un tube sont introduits successivement 25 mL de l'extrait EEZ et 100 µL d'eau distillée. Au temps initial (0 minute), 7,5 mL d'une solution de NaNO₂ (5 %) sont ajoutés. Après cinq minutes 7,5 mL d'AlCl₃ (10 %) sont additionnés. A six minutes, 50 mL de NaOH (1 N) et 0,25 ml d'eau distillée sont ajoutés successivement au mélange. L'absorbance de ce dernier dans l'UV-visible est mesurée à 510 nm contre un témoin. Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

I.4.3. Dosage des tanins condensés (tanins catéchiques)

Le dosage des tanins condensés dans l'extrait EEZ est effectué selon la méthode de Broadhurst *et Jones*, 1978, modifiée par Heimler *et al*, 2006. Le principe de ce dosage est basé sur la fixation du groupement aldéhydique de vanilline sur le carbone 6 du cycle A de la catéchine pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500 nm (Schofield *et al*, 2001). Pour 400µl de chaque échantillon ou standard, on ajoute 3ml d'une solution de vanilline (4% dans le méthanol), et 1,5 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange est incubé durant 15 min et l'absorbance est lue à 500nm. Les concentrations en tanins condensés sont déduites à partir d'une gamme d'étalonnage de catéchine (0 – 300µg/ml) et exprimées en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait (µg E CT/mg).

I.4.4. Dosage des tanins hydrolysables (au chlorure ferrique) (tanins galliques)

La méthode de Mole *et Waterman*, 1987 est basée sur une réaction avec le chlorure ferrique. Le mélange de l'extrait tannique avec le réactif chlorure ferrique provoque la coloration rouge violette du complexe, d'où la formation des ions (Fe³⁺) (Bate-Smith, 1973).

Une solution de FeCl_3 0.01M est mélangée avec une solution d'HCl 0.001M (V/V). Ajouter 3,5ml de ce réactif à 1 ml de l'extrait éthanolique de PFJ. Après 15 secondes, lire l'absorbance à 660nm. Les tanins hydrolysables sont exprimés par la relation : $T\% = DO (M.V/E_{\text{moles}}P)$ avec DO : densité optique, E_{moles} : 2169 de l'acide gallique, M : 300, V : volume d'extrait utilisé, P : poids de l'échantillon, T% : pourcentage des tannins hydrolysables.

I.4.5. Détermination de la teneur en anthocyanes totaux

Les anthocyanes totaux sont déterminés selon la méthode du pH différentiel de [Lee et al, 2005](#). Dans une fiole jaugée de 25 ml on met 1 ml de l'EEZ et l'on ajuste avec le tampon pH 1,0 (14,9 mg de KCl/ml d'eau et HCl 0,2 M dans les proportions en volume 25/67). L'ensemble est mélangé. Aussi, 1 ml de l'EEZ est mis dans une fiole jaugée de 25 ml et complété avec un tampon pH 4,5 (16,4 mg d'acétate de sodium/ml d'eau) et on mélange. La concentration d'anthocyanines totale est calculée en utilisant l'équation suivante et enfin exprimée en milligrammes d'équivalents cyanidine 3-glucoside (Ec-3-G)/100g.

Anthocyanes totaux (mg/l) = $A * PM * FD * 1000 / (e * L)$ Où : A est l'absorbance = $(A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})$ à pH 1,0 - $(A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})$ à pH 4,5 ; PM est le poids moléculaire du cyanidine-3-glucoside = (433,2) ; FD est un facteur de dilution ; e est le coefficient d'extinction pour la cyanidine 3-glucoside de 31 600 et l est la longueur du trajet de la cellule (1 cm).

I.4.6. Dosage des caroténoïdes

L'estimation de la teneur en caroténoïdes totaux dans la pâte du fruit du jujubier est réalisée selon la méthode de [Yolanda et al, 2007](#). Ainsi 2 g de PFJ sont homogénéisés avec 20 mL du mélange de solvants (hexane/acétone/éthanol, 2:1:1). Après agitation pendant 30 min, la phase supérieure est récupérée et protégée de la lumière par du papier aluminium, 10 mL d'hexane sont ajoutés et une deuxième extraction est réalisée. Le mélange des deux extractions est centrifugé pendant 5 min à 6500 rpm. La teneur en caroténoïdes est déterminée par la mesure de l'absorbance de l'extrait hexanique à 420 nm. Les concentrations des caroténoïdes sont estimées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant le β - carotène comme standard d'étalonnage. Les concentrations sont exprimées en mg équivalent de β -carotène par 100 g de PFJ (mg Eq β -carotène /100 g).

V.5. Activité antioxydante

V.5.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

L'évaluation de l'activité antioxydante est effectuée par le test au diphényle-picrylhydrazyl, phosphomolybdate (DPPH) selon le protocole décrit par [Wang et al, 1998](#). Pour cela, 0,5 mL de l'extrait EEZ à tester sont ajoutés à 1,25 ml de solution méthanolique de DPPH (4 %) et 0,5 mL de méthanol. Après agitation sur vortex, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la densité optique (DO) est mesurée à 517 nm. Le contrôle contient uniquement la solution de DPPH. L'activité antioxydante est évaluée à 517 nm en pourcentage d'inhibition ou pourcentage d'activité antioxydante, selon la formule suivante : $\% \text{ d'activité antioxydante} = (\text{DO contrôle} - \text{DO test}) / (\text{DO contrôle} * 100)$. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration le test est répété 3 fois. On calcule graphiquement par la régression linéaire la concentration effective 50 (CE50) qui correspond à celle en antioxydants nécessaires pour réduire la moitié de la quantité en DPPH initialement présente dans le milieu ([Blois, 1958](#) ; [Brand-Williams et al., 1995](#)).

V.5.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric *reducing* antioxidant power)

Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par [Oyaizu, 1986](#). Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,007 à 2,5 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2.5ml d'acide trichlororacétique (TCA) à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Une aliquote (2,5ml) de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de trichlorure de fer (FeCl_3) à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre Shimadzu Scientific Instruments). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée, dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés ([Singleton et Rossi, 1965](#)).

V.6. Identification chimique des polyphénols par LC-MS/MS

V.6.1. Extraction des composés polyphénoliques

L'extrait éthanolique de la PFJ est mis en suspension dans 200 mL d'eau distillée et extrait avec 200 mL de chloroforme. La couche organique est éliminée et la phase aqueuse est extraite avec 200 mL d'acétate d'éthyle (EtOAc) trois fois. La phase organique d'EtOAc est recueillie après évaporation complète du solvant. L'extrait d'EtOAc est ensuite lyophilisé et conservé à -18°C jusqu'à utilisation pour la LC/MS MS (Yang, 2011).

V.6.2. Identification par LC-MS des composés polyphénoliques

Les spectres de masse de l'extrait EEZ sont obtenus avec un système LC-MS/MS QTOF6520 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) en utilisant une colonne C18 (Zorbax Eclipse XDB) résolution rapide (HT 4,6 x 50 mm, 1,8 µm), en mode positif- ESI, avec un débit de 0.4 mL/min, en phase mobile comportant de l'acétate d'ammonium 10 mM (solution A)/méthanol CH₃OH (solution B) en mode dégradé pour le solvant B comme suit (% B, le temps) : (10% à 0 min, 95% à 10 min et 10 % à 15 min), (VCAP 3500 eV ; Source T°, 350 °C ; fragmenteur, 110 V ; écumeiro, 65 V) (Gülçin et al., 2010).

V.7 Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne suivie de l'erreur standard. La comparaison des résultats utilise le test Anova et la probabilité P <0,05 est considérée comme significative.

Deuxième partie :

Implication des extraits éthanoliques dans la résistance de

Saccharomyces cerevisiae face à un stress H_2O_2 à la

DL50

V. 8. Effet des composés polyphénoliques sur la viabilité de *Saccharomyces cerevisiae*

V.8.1. Isolement des levures et préparation des milieux Sabouraud

Dans un verre de montre, on place quelques gouttes d'eau distillée et une miette de levure de bière

On mélange pour obtenir une solution légèrement laiteuse.

Pour la mise en culture des souches et leur isolement, la gélose de Sabouraud est utilisée. Cette dernière est mise dans des tubes à essai à raison de 15 ml par tube et le pH est ajusté à 6. Les tubes sont ensuite stérilisés à l'autoclave 20 min à 120°C.

Au moment de l'utilisation, les tubes du milieu Sabouraud sont mis à fondre au bain bouillant (100°C), puis maintenus en surfusion dans un bain thermostaté à 50°C. Le milieu est coulé stérilement à raison d'un tube par boîte de Pétri stérile. Ces boîtes sont maintenues pour solidification et refroidissement dans un environnement stérile, entrouvertes, autour d'un bec bunsen. Elles sont ensuite stockées couvercle en bas avant d'être utilisées.

V.8.2. Mise en culture

Après avoir stérilisé l'anse en la portant au rouge dans la flamme du bec bunsen et attendu qu'elle refroidisse dans la zone stérile, sans l'agiter ni la poser sur la paillasse, on prélève une anse d'échantillon stérilement et on ensemence par stries sans entamer la gélose, une boîte de Pétri contenant le milieu de Sabouraud gélosé, par la technique suivante :

- * A l'aide d'un crayon feutre partager la boîte en deux moitiés, en faisant un trait sur le fond

- * déposer le contenu de l'anse (l'inoculum) sur le milieu gélosé, puis l'étaler en faisant une strie en zig-zag, sans revenir en arrière jusqu'au trait de séparation, retirer l'anse mais la garder dans la zone stérile.

- * tourner la boîte d'un demi tour et recommencer à strier avec l'anse à partir de la deuxième moitié

- * retirer l'anse, la flamber soigneusement, refermer la boîte, la retourner, la placer à l'étuve à 30°C pour une durée minimale de 48h.

V.8.3. Préparation de la gamme de peroxyde d'hydrogène

Calcul de la concentration de H₂O₂

La gamme est préparée à partir d'une solution d'H₂O₂ de :

1- pourcentage massique 6% (6 g H₂O₂ dans 100 mL de solution)

2- Concentration molaire : $C = n/V$

3- n = nombre de moles = masse / masse molaire

A.N : $6 / 34.01 = 0,176$ moles contenues dans 100 mL = 0,1 L de solution. Soit 1,76 moles dans 1L ou $M = 1,76$ mol/L. La solution est 1,76 Molaire.

Ces résultats figurent dans le **tableau 09**.

Tableau 09 : calcul de concentration de peroxyde d'hydrogène

Titre volumique	Titre massique (g/L)	Masse molaire (mol/L)	Concentration (mol/L = M)	Concentration (mol/L)
20 V	6%	34.01	1,76	1760mM

V.8.4. Préparation des dilutions

Une solution de concentration inférieure C_{fille} est préparée partir d'une solution de concentration plus élevée $C_{\text{mère}}$. Le volume V_{fille} à prélever à partir de la solution mère (la plus concentrée) se fait selon la loi de dilution comme suit :

$$C_{\text{mère}}V_{\text{mère}} = C_{\text{fille}}V_{\text{fille}}$$

Les dilutions décimales à partir des concentrations en mM donnent :

H₂O₂.10⁻¹ (mM), H₂O₂.10⁻² (mM) et H₂O₂.10⁻³(mM) : 1760/10=176 (Tableau 10)

Tableau 10 : Gamme de dilutions de H₂O₂ (mM)

Solution d'H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ (mM)	H ₂ O ₂ .10 ⁻¹ (mM)	H ₂ O ₂ .10 ⁻² (mM)	H ₂ O ₂ .10 ⁻³ (mM)
20Volumes	1760	176	17,6	1,76

V.8.5.Traitement de *Saccharomyces cerevisiae* par le peroxyde d'hydrogène

Après repiquage de *Saccharomyces cerevisiae*, un ensemencement de quelques colonies est effectué dans un tube à essai stérile qui contient un milieu YPD (1% extrait de levure, 1% peptone, 2% glucose) ensuite mis sous agitation 12 rpm à 30°C pendant 24h.

- Faire un prélèvement jusqu'à obtenir une DO₆₀₀ de 0.1 ; qui correspond à 1.3 10⁶ UFC/ml et qui représente 100% de viabilité.

- Prélever 1.5mL et centrifuger à 4000g (Rotofix 32A) pendant 5min pour remplacer le milieu de culture par l'eau distillée stérile. Procéder à un lavage à la même

vitesse dans un volume de 1.5mL d'eau distillée stérile, dans le but d'éliminer le maximum de milieu de culture.

- Remplacer par 1.5ml de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) aux différentes concentrations testées. A $DO_{600nm}=0,1$; la concentration de $1.3 \cdot 10^6$ UFC /ml correspond à 100% de viabilité (Lyndsay et al, 1992).

- Après 1 heure de stress le milieu est remplacé par l'eau distillée stérile (lavage) à 4000g pendant 5min, et puis remplacé à nouveau par 1,5 mL d'eau physiologique, la DO étant toujours à 0.1.

- On procède ensuite à des dilutions décimales en cascade permettant d'obtenir entre 30 et 300 cellules comptées à partir de la DO de 0,1 correspondant au départ $1,3 \cdot 10^6$ UFC/ml (**tableau 11**).

Tableau 11 : Dilutions décimales de la solution mère

Solution Mère	$D_f 10^{-1}$	$D_f 10^{-2}$	$D_f 10^{-3}$
$1.3 \cdot 10^6$ UFC/ml	$1.3 \cdot 10^5$ UFC/ml	$1.3 \cdot 10^4$ UFC/ml	130 UFC/ml

La suspension (1ml) à laquelle sont ajoutées 9 ml d'eau physiologique correspond à D_f^{-1} donc: $1.3 \cdot 10^5$ UFC/mL. Cette dernière dilution (1ml) est reprise avec 9 ml d'eau physiologique pour obtenir $D_f 10^{-2}$ et ainsi de suite jusqu'à la concentration $D_f 10^{-3} = 1,3 \cdot 10^3$ UFC/ml.

On étale 100 μ L sur une boîte de pétri contenant le milieu YPD à 1.5% Agar à 30°C.

Les colonies sont comptées au bout de 48h (Shingo et al, 1995).

V.8.6. Résistance de *S. cerevisiae* au stress du peroxyde d'hydrogène en présence d'extrait éthanolique de Ziziphus

Pour tester l'implication des extraits bruts obtenus dans la réponse au stress causé par H_2O_2 nous avons utilisé la même souche *Saccharomyces cerevisiae* isolée précédemment.

Avec la DL50 déterminée précédemment, nous avons stressé nos levures dans les mêmes conditions à partir d'une suspension levurienne dans un milieu YPD et à une DO de 0.1 correspondant à une concentration de $1.3 \cdot 10^6$ UFC/ml et une viabilité de 100%.

A cet effet trois préparations sont effectuées comme suit:

- Un tube témoin renfermant 1,5 ml d'une suspension levurienne dans de l'eau physiologique stérile (DO de 0.1)
- Un deuxième tube renfermant la suspension levurienne dans 1.5 ml d'H₂O₂ (Témoin de la DL 50).
- Un troisième tube renfermant la suspension levurienne dans 1ml d'extrait brut de *Zizyphus jujuba* et 0.5ml d'H₂O₂ à la DL50.

Après une heure de stress les milieux sont remplacés par de l'eau physiologique.

Différentes dilutions sont effectuées permettant d'obtenir entre 30 et 300 cellules et à partir de chaque tube 100µl de chaque suspension sont étalées sur boîte de Pétri contenant un milieu YPG complet (glucose à 2%, peptone à 1%, extrait de levure à 1% et Agar à 1.5%).

Les colonies sont comptées au bout de 48h.

Troisième partie :

*Effets de l'extrait éthanolique de la pulpe du fruit du
jujubier sur la réaction inflammatoire chez le rat Wistar*

V.9.1. Conditions d'élevage des rats Wistar

Pour étudier l'activité anti-inflammatoire, des rats adultes Wistar (150-200 g) ont été obtenus à partir de l'Institut Pasteur (Alger, Algérie). Ils sont hébergés dans une pièce convenablement aérée, à température contrôlée ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) et une bonne ventilation. Les rats sont logés dans des cages en plastique transparentes d'une longueur de 55 cm, d'une largeur de 33 cm et d'une hauteur de 19 cm. Ces dimensions ainsi que la structure répondent aux lignes de bons usages (**figure10**).

Tous les animaux ont été nourris avec un régime ad libitum standard sous forme de bâtonnets (**figure10**) et un libre accès à l'eau potable. Les rats sont privés de nourriture une nuit avant le début de l'expérimentation. A la fin de cette dernière, les rats sont sacrifiés en conformité avec les lignes directrices établies par l'Union Européenne sur la protection des animaux ([CEE Conseil 86/609](#)).



Figure 10: Rats de souche Wistar et aliments

V.9.2. Induction de l'inflammation par la carragénine et activité anti-inflammatoire

L'induction de l'inflammation chez les rats se fait selon le protocole préconisé par [Winter et al., 1962](#). Les mesures de l'œdème se font par l'utilisation d'un pied à coulisse digital (Caliber Mitutoyo). Aussi des analyses de paramètres inflammatoires sériques sont effectuées. Les 18 rats utilisés pour cette expérimentation sont mis à jeun pendant 16 heures avant l'expérimentation.

Lot 1:

Les rats (n=06) qui reçoivent une injection intra péritonéale de 2,5 ml/kg d'eau physiologique (NaCl à 0,9%) et 15 minutes après une injection sous cutanée au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat, de l'extrémité vers l'articulation sans dépasser celle-ci, de 0,05 ml d'une solution de carragénine à 1% dans l'eau physiologique.

Lot 2 :

Les rats (n=06) reçoivent une injection intra péritonéale de 500 mg/kg d'extrait éthanolique de pulpe de *Ziziphus jujuba* (**figure 11**).et 15 minutes après une injection sous cutanée au niveau de la région sub-plantaire de la patte arrière gauche de 0,05 ml d'une solution de carragénine à 1%



Figure11 : Injection intra péritonéale des solutions étudiées

Lot 3 :

Les rats (n=06) reçoivent une injection intra péritonéale de 300 mg/kg de Diclofénac et 15 minutes après une injection sous cutanée au niveau de la région sub-plantaire de la patte arrière gauche de 0,05 ml d'une solution de carragénine à 1% dans l'eau physiologique (**figure12**).



Figure12 : Injection au niveau de la région sub-plantaire de la patte

V.9.3. Mesure des œdèmes des pattes inflammées

Les mesures de l'œdème se font avec un pied à coulisse digital à 0 h avant l'injection de carragénine et à 3, ensuite 6 h après l'injection (**figure13**).

Le pourcentage d'augmentation (% Aug) du volume de la patte est déterminé par la mesure des épaisseurs de l'œdème au centre de la région sub-plantaire comme suit :

$$\% \text{ Aug} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

V_0 = Volume de la patte du rat témoin

V_t = Volume après injection de carragénine et traitement (Diclofénac ou EEZ)

Le pourcentage d'inhibition (% inh) de l'inflammation par les différents traitements est calculé comme suit :

$$\% inh = \frac{P_0 - P_t}{P_0} \times 100$$

P_0 = % d'augmentation de la patte du témoin

P_t = % d'augmentation de la patte du lot traité



Figure13 : Mesure de l'épaisseur de l'inflammation avec le pied à coulisse

V.9.4. Sacrifice et prélèvement du sang

Après 03 heures et à la fin de l'expérimentation (après 06 heures) les rats sont anesthésiés à l'éther dans une cloche en verre. Le sang est prélevé par ponction dans l'aorte abdominale (**figure14**). L'avantage de cette technique est la possibilité de collecter du sang stérile et la capacité à réaliser une exsanguination complète ([Weiss et al, 2000](#) ; [Elkadi et al, 2014](#)).



Figure14 : Prélèvement de sang par ponction dans l'aorte abdominale

Pour le dosage immunochimique le sang est centrifugé à 2500 tr/mn à une température de 4°C pendant 15 minutes. Le sérum obtenu peut être congelé jusqu'à 48 heures à -20°C avant utilisation.

V.9.5. Dosage des protéines de l'inflammation ou "profil protéique"

V.9.5.1. La protéine C-réactive (CRP)

La protéine C-réactive est une protéine de la phase aigue qui apparaît dans le sang lors des processus inflammatoires. Les modifications du taux des protéines de la réponse inflammatoire peuvent être dosées en immuno-néphélométrie et l'évaluation dans le temps des taux sériques peut avoir une grande valeur indicative. la CRP est une protéine à variation élevée (jusqu'à 1000 fois la norme), ayant une demi-vie courte (un jour) et dont le délai de réponse est court (6 à 12 heures). Le dosage de la CRP se fait par la technique immunoturbidimétrique ([Marrack et Richards 1971](#) ; [Ritchie, 1967](#)).

Principe

Le trouble formé par la réaction antigène (CRP)-anticorps (polyclonal de chèvre anti CRP) est apprécié par spectrophotométrie à 340 nm ([Marrack et richards 1971](#) ; [Ritchie, 1967](#)).

Réactifs

R1 : Tampon phosphate NaCl pH 7,43

Polyéthylène glycol 40g/l

Azide de sodium 0,95g/l

R2 : Antisérum polyclonal de chèvre anti CRP

Tampon phosphate NaCl pH 7,43

Azide de sodium 0,95g/l

Mode opératoire

60µl de sérum sont additionnés de 1 ml de tampon R1 et l'absorbance est lue à 340 nm contre un blanc contenant du NaCl 0,9% +1ml de tampon R1. Les absorbances sont lues avant et après addition dans les tubes de 100 µl d'antisérum anti-CRP.

La différence d'absorbances est évaluée en utilisant la courbe de calibration réalisée avec cinq concentrations de CRP selon un kit de calibration prêt à l'emploi ([Biolabo, Maizy-France](#)).

V.9.5.2.Dénombrement des globules blancs

Prélèvement

Le prélèvement, ou ponction, est effectuée sur l'aorte selon les procédures terminales pratiquées sur des animaux anesthésiés, permettant de réaliser une exsanguination avant

l'euthanasie. Il faut pratiquer une laparotomie, puis ponctionner le vaisseau avec une aiguille de diamètre maximum et de longueur minimale pour éviter la coagulation. Les avantages de ces techniques, par rapport à la décapitation, sont la possibilité de collecter du sang stérile et la capacité à réaliser une exsanguination complète (Archer 1977, kraus 1980, Laroche et Rousselet 1990, Weiss et al ,2000). Il existe aussi des techniques de cathétérisation permanente permettant des prélèvements répétés sans anesthésie (kraus 1980).

La numération des trois lignées GR, GB, PLT, utilise deux principes très différents:

- **La Variation d'impédance**

Principe Coulter du nom des inventeurs (Wallace et Coulter- 1953), Méthode de référence, la plus répandue. Utilisée pour les numérations, et la formule leucocytaire approchée. Le principe de la mesure par impédance est le passage de cellules en suspension dans un liquide conducteur à travers un orifice qui modifie la résistance électrique entre deux électrodes (principe Coulter). Cette variation d'impédance est enregistrée sous forme d'impulsions. Le nombre d'impulsions enregistré correspond au passage des cellules.

- **La mesure optique**

Associe les principes de bases de la Cytométrie en Flux (1977):

-focalisation hydrodynamique

-diffraction lumineuse recueillie à différents angles /incidence

Elle est utilisée surtout pour la numération des GB associée à la FL, cependant quelques automates utilisent la mesure optique pour les numérations des 3 lignées GR, GB, PLT (Bayer automate ADVIA 120, Sysmex automate XT2000).

VI. Résultats et discussion

VI.1. Détermination du rendement de l'extrait brut éthanolique

Le poids de l'extrait est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein P_1 (après élimination du solvant par évaporation rotative) et le poids du ballon vide P_0 .

Le rendement sera exprimé en pourcentage et sera le rapport de la masse en gramme de l'extrait brut (m) sur la masse en gramme de la matière végétale étudiée (m_0). Les résultats de ce rendement figurent dans le [tableau 12](#).

Tableau 12 : Rendement de l'extraction éthanolique de la pulpe du fruit du jujubier

P_0 (g)	63.22
P_1 (g)	64.61
m (g)	1.39
m_0 (g)	50
Rendement (%)	2.78

Le rendement de l'extrait éthanolique de la pulpe du fruit du jujubier (PFJ) est de $2,78 \pm 0,31\%$ correspondant à 1,39 g de résidu obtenu à partir de la macération éthanolique de 50g de PFJ. Ce rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes et l'activité antioxydante ([Lee et al, 2003](#)).

VI.2. les metabolites primaires :

VI.2.1. Taux d'humidité

Afin de déterminer la teneur en eau dans les fruits de *zizyphus jujuba* nous avons utilisé la méthode d'[Audigié et al, \(1984\)](#) dont le but est d'exprimer les résultats des constituants par rapport à la matière sèche.

Le taux d'humidité de notre échantillon PFJ de *Zizyphus jujuba* est de 19%, ce qui se rapproche des résultats obtenus par [Jin-Wei Li et al, \(2007\)](#) qui ont travaillé sur cinq variétés du même genre en l'occurrence, le *zizyphus jujuba* cv *Jinsixiaozao*, *zizyphus jujuba* cv *Yazao*, *zizyphus jujuba* *Jianzao*, *zizyphus jujuba* *Junzao* et *zizyphus jujuba* *Sanbianhong* et ont rapporté, respectivement, 18.99%, 20.98%, 17.38%, 21.09% et 22.52% d'humidité.

Selon [Talukdar, 2014](#) cinq variétés de fruits du jujubier de l'espèce *mauritiana*, présentent des taux de matière sèche qui varient de 84,18 à 89,23% respectivement.

VI.2.2. Taux de cendres

La teneur en cendre du *Zizyphus jujuba* a été déterminée après incinération et la cendre grisâtre obtenue représente les diverses substances minérales.

Nos résultats révèlent un taux de cendre de 6.1%, supérieur aux résultats de [Jin-Wei Li et al, \(2007\)](#). Ces derniers ont rapporté des teneurs en éléments minéraux de 5 variétés de *zizyphus* variant de 2.26% à 3.01%.

Selon [Talukdar, 2014](#) cinq variétés de fruits du jujubier de l'espèce *mauritanica*, présentent des taux de cendre variant de 2,85 à 3,23%.

Selon [Murdock, 2002](#), la teneur en éléments minéraux du *Zizyphus lotus*, une autre espèce, est de 0,82%. Selon [Boudraa et al, 2010](#), la pulpe de cinq fruits étudiés, parmi lesquels *Zizyphus lotus* L, s'est révélée plus riche en minéraux (calcium, magnésium, potassium, fer, manganèse) que certains fruits plus largement consommés. Ces résultats témoignent des légères variations liées à l'influence probable de l'environnement abiotique et à la différence des conditions climatiques et la répartition géographique.

VI.2.3. Dosage des protéines

Selon la méthode de [Lowry, 1951](#) le taux de protéines dans notre échantillon est de 28.83 mg EQ SAB/g de substrat ou 2.88 g EQ SAB/100g). La quantification s'est faite contre un étalonnage utilisant la sérum albumine bovine (**figure 15**).

[Li et al, 2007](#) ont rapporté que les cultivars semblent affecter de manière significative les teneurs en protéines de cinq variétés de jujubes chinois qui varient de 4,75 à 6,86%.

Ces derniers résultats sont obtenus par la microméthode de [Kjeldahl](#) qui utilise un coefficient de conversion de l'azote en protéines de 6,25. Dans notre cas la méthode de [Lowry](#) utilisée semble plus rationnelle.

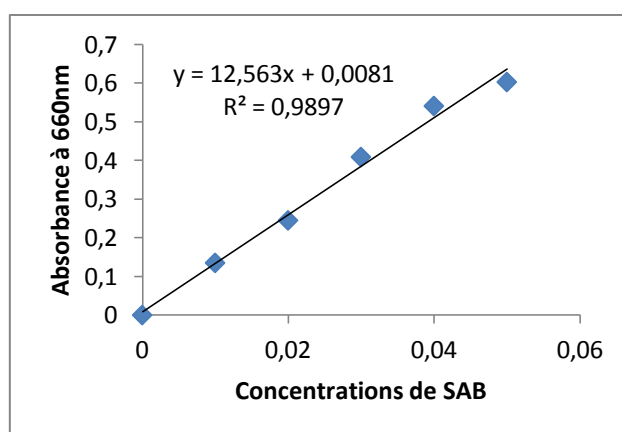


Figure 15 : Droite d'étalonnage de la Sérum Albumine Bovine

VI.2.4. Teneur en matière grasse

La teneur en lipides du fruit de *zizyphus jujuba* obtenue par la méthode de Soxhlet est de 0.28%. Ce résultat est corroboré par les valeurs rapportées par [Jin-Wei Li et al, 2007](#) et qui

varient de 0.37 à 1.02%. Notre valeur est approximativement proche de celle de la première variété *zizyphus jujuba* cv *Jinsixiaozao* qui renferme 0.37% de lipides.

La matière grasse présente dans ce produit est donc réduite (0,28%). [Tonelli et Gallouin, 2013](#), rapportent des taux de 0,3% de lipides totaux dans le jujube commun et celui de chine frais et 1,3% dans ces fruits secs. Nos résultats sont donc faibles par rapport à ceux d'autres auteurs ([Danthu et al, 2002](#); [Kwon et al, 1997](#)) et cela peut être dû à une extraction insuffisante de ces composés par l'éther de pétrole ([Ranhotra, Gelroth, & Vetter, 1996](#)).

VI.2.5. La teneur en sucres totaux

Les sucres totaux déterminés par la technique phénol- acide sulfurique constituent 23,20% de la matière sèche de la PFJ. Cette détermination utilise un étalonnage avec du glucose (**figure 16**).

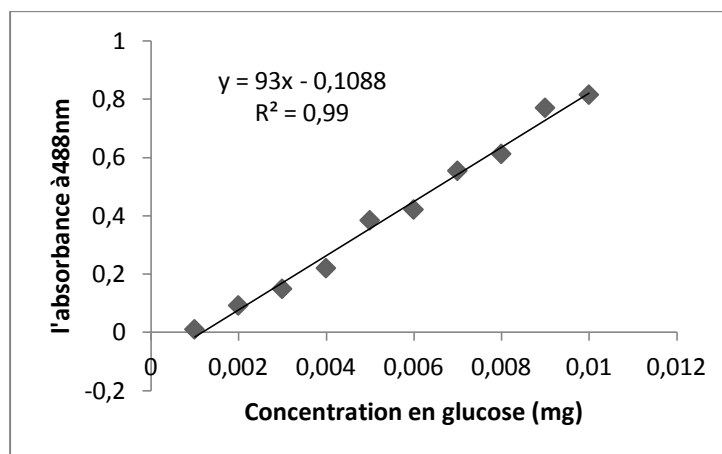


Figure16 : droite d'étalonnage pour le dosage des sucres totaux

La période de récolte des fruits du jujubier a un effet significatif sur le taux des sucres totaux ([Kudachikar et al, 2000](#)). Plus la cueillette est retardée plus le taux de sucres est élevé ([Bal, 1986](#)). Notre valeur se rapproche à celles rapportées par [Li et al, 2007](#) et qui varient de 19.2 à 27.2%. Il est cependant intéressant de signaler que selon [Jin-Wei Li et al, 2007](#), les hydrates de carbone contenus dans cinq cultivars de jujube chinois sont quantitativement similaires et varient de 80,86 à 85,63% de la matière sèche des fruits entiers sans aucune différence significative. Une étude comparative sur la qualité nutritionnelle de 5 (cinq) variétés de jujubes du Bangladesh (*Zizyphus mauritiana*) a rapporté des taux variant de 4,70 à 10,01% de la partie comestible tandis que le répertoire général des aliments rapporte pour la pulpe fraîche du fruit du Jujubier commun et le Jujubier de Chine un taux de sucres disponibles de 19% ([Ciquial, Cneva, 1993](#)).

Gao et al, 2011 ont rapporté des valeurs inférieures à celle de notre échantillon et qui oscillent entre 9.8 et 14.9 gr/100g.

VI.2.6. Teneur en acide ascorbique

Une étude réalisée sur le jujube (*zizyphus jujuba*) cultivé en Chine indique des teneurs en acide ascorbique allant de 376 à 757 mg/100g (Sun et al, 2010). Une autre étude menée sur 5 variétés de jujube Junzao, Lingbaozao, Jinzao, Zanhuangzao et Lizao montre des teneurs qui oscillent entre 77.2 et 102.3mg/100g (Gao et al, 2011). Selon Koley et al, 2011, 12 génotypes du jujube indien ont montré des teneurs en acide ascorbique qui varient entre 19.54 et 99.49 mg/100g.

Dans notre cas la valeur de 194 mg de vitamine C pour 100g de la PFJ est appréciable et témoigne d'une richesse en vitamine C qui est fonction de la maturité du fruit (tableau13). Cette détermination utilise un étalonnage avec de l'acide ascorbique (figure17).

Tableau 13 : Composition nutritionnelle de la pulpe du fruit du jujubier

Paramètres	*Pâte de pulpe fruit du jujubier (PFJ) (pulpe avec peau) (% de MS)
Matière sèche (%)	81±0,21
Cendres (%)	6,1±0,16
Matière grasse (%)	0,28±0,03
Protéines (% équivalent sérum albumine)	2,88±0,32
Sucres totaux (%)	23,20±0,32
Acide ascorbique (µg/g)	0,194±0,04

*Moyenne ±SD de trois déterminations

Selon Jin-Wei Li et al, 2007 la teneur en vitamine C, mesurée par la méthode de réduction du 2,6- dichlorophénol-indophénol (DIP) varie de 192 à 359 mg/100 g de fruit entier pour cinq variétés de fruits de Jujubier étudiées. Quand aux variétés du Bangladesh, la partie comestible du fruit de la même espèce renferme de 32,98 à 42,91 mg de vitamine C pour 100 g (Talukdar, 2014).

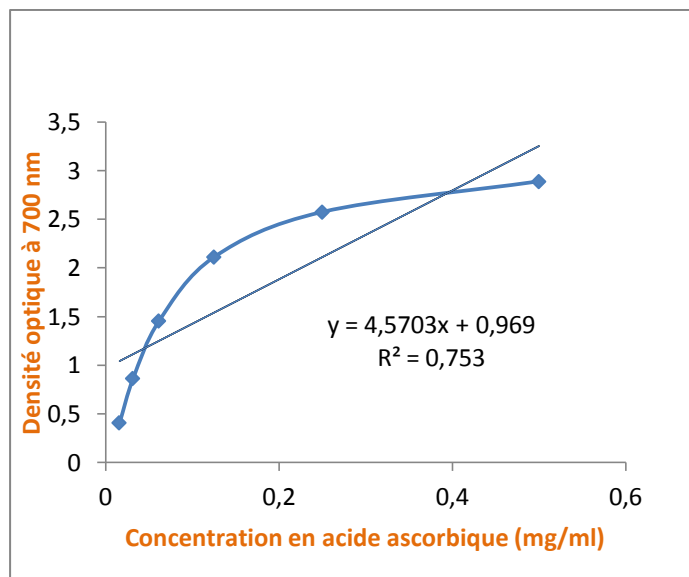


Figure 17: Droite d'étalonnage pour le dosage de l'acide ascorbique

En effet selon [Wu, 2012](#) la vitamine C varie de 310 à 200 mg/100 g de poids frais de jujube au cours de la maturation. Aussi, les travaux de [Zhang et al, 2010](#) rapportent de grandes variations de vitamine C (534,94 ; 58,22 et 32,48 mg d'acide ascorbique pour 100g de poids sec) dans les extraits éthanoliques des pulpes de trois cultivars de jujube étudiées. Selon [Li et al, 2007](#) il semble que le jujube chinois étudié est une bonne source de vitamine C dans l'alimentation. En moyenne, une portion de 20 g de jujube chinois offrirait tous les besoins quotidiens d'un adulte en vitamine C recommandée par la Food and Nutrition Board ([National Research Council, 1989](#)). Il est aussi important de signaler que le contenu en vitamine C du jujube frais diminue fortement lors du stockage en raison de la détérioration et de l'oxydation. De ce fait la perte de vitamine C constitue un facteur critique pour la durée de vie de certains produits ([Wang, 2000 ; Burdurlu, 2006, Hu, 2013](#)). La prise quotidienne de 100mg de jujube en saison tropicale peut éradiquer la maladie du scorbut ([Talukdar, 2014](#)).

VI.3. dosage des composés du métabolisme secondaire

Afin de caractériser l'extrait éthanolique préparé à partir des fruits du *Zizyphus jujuba*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué.

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

VI.3.1 Dosage des composés phénoliques

Le dosage des composés phénoliques dans l'extrait EEZ a donné des teneurs de 7.80 ±0.40 mg EAG /g de *Zizyphus*.

Les travaux de [Zhang et al, 2010](#) rapportent des quantités de polyphénols totaux qui varient de 557 à 813 mg EAG/100 g de matière sèche de pulpe de trois cultivars de jujube. Les cinq cultivars de jujubes chinois étudiés par [Li et al, 2007](#) et cités par [Pareek, 2013](#) présentent des quantités de polyphénols totaux variant de 5,18 à 8,53 mg EAG/g de matière sèche. Les cinq variétés de fruits de jujubiers étudiées par [Gao et al, 2011](#) montrent des quantités de polyphénols qui varient de 428,5 à 600,4 mg EAG/100g de fruit.

Dans une étude faite sur les différents tissus de 3 variétés de jujube chinois (*zizyphus jujuba*), [Zhang et al, \(2009\)](#) ont dosé les polyphénols totaux par la méthode de Folin ciocalteu dans l'extrait éthanolique, le résultat obtenu est de 32.80 mg EAG/g pour l'une des variétés (*Dongzao*).

L'étude réalisée sur les 12 génotypes du jujube indien montre des valeurs qui oscillent de 1.72 à 3.28 mg EAG/g ([Koley et al ,2011](#)).

Le jujube chinois a montré une teneur en composés phénoliques de l'ordre de 7.42, 8.53, 8.36, 7.01 et 5.18 mg EAG/g respectivement pour *Jinsixiaozao* ,*Yazao* ,*Jianzao* ,*Junzao* et *Sanbianhong* ([Jin-Wei Li, 2007](#)). Cette différence est probablement due aux origines des variétés étudiées.

Tableau 14 : Composés phénoliques et activité antioxydante de l'extrait éthanolique de la pulpe du fruit du jujubier écotype « Zfisef » de la région ouest d'Algérie.

Rendement de l'extrait éthanolique (%)	2,78±0,31
Polyphénols totaux (EAG/g)	7,80±0,40
Flavonoïdes (mg EQ/gr)	25,58±16,6
Tanins galliques (µg EAG/mg)	0,15±0,025
Tanins catéchiques (µg ECT/mg)	3,48±0,28
Anthocyanes totaux (ECy3g/100 g)	4,81±0,44
Caroténoïdes totaux (mg E β-carotène /100 g)	5,02±0,19

VI.3.2. Dosage des flavonoïdes

En utilisant la méthode de [Zhishen et al, 1999](#) on a déterminé les flavonoïdes et la valeur de 25.58±16.6 mg EQ/gr pour l'extrait éthanolique est obtenue.

Cette teneur est supérieure aux valeurs rapportées par [Koley et al, 2011](#) chez les 12 génotypes du jujube indien et qui sont comprises entre 8.36 et 21.97mg équivalent quercétine par gramme de substrat (EQ/g). Il s'agit de métabolites secondaires regroupés selon leur structure dérivée de celle du phénylbenzopyrone ou flavone. L'étude menée par [Sun et al, 2010](#) sur 10 lots différents de jujube, rapporte des quantités de flavonoïdes variant de 5.57 à

9.40 mg EQ/g qui sont inférieures à celles de notre produit. Quand aux travaux de [Zhang et al, 2010](#) l'extrait éthanolique de la chair de *Zizyphus jujuba* renferme 18.51 mg EQ/gr. [Gao et al 2011](#) rapportent des quantités de flavonoïdes qui varient de 159,3 à 230,3 mg équivalent rutin pour 100 g de poids frais chez cinq variétés de fruits de jujubier étudiées.

VI.3.3. Les tanins

Les tanins totaux représentent ceux hydrolysables et condensés. La fraction condensée semble plus importante comparée à celle hydrolysable ($P < 0,05$) (**tableau 14**). Les gallotanins et les polymères de flavanols sont connus pour leur aptitude à piéger les radicaux libres et réduire les risques de maladies cardiovasculaires et de cancer comme tous les polyphénols (propriétés antioxydantes) ([Santos-Buelga, 2000](#)). Selon [Diallo, 2004](#) La présence de tanins, doués de propriétés de renouvellement des tissus, est importante dans le processus de guérison des plaies dues au diabète.

VI.3.4. Les anthocyanes

Selon [Zhang Qiong et al, 2010](#), il n'y a pas d'anthocyanes dans la peau de quatre variétés de fruit du jujubier analysées par chromatographie liquide de haute performance. [Zhang Hao et al, 2010](#) ont montré que ces composés sont présents dans la pulpe et la peau mais pas dans la graine des fruits de trois cultivars de fruit de jujubier de Chine. Ces anthocyanes déterminés par spectrophotométrie sont exprimés en mg de cyanidine 3-glucoside par 100 g de matière sèche et varient en fonction des variétés de 29,79 à 42,91 dans la peau, de 1,38 à 10,59 dans la pulpe et ne sont pas détectés dans les graines. Dans notre cas le taux d'anthocyanes de la PFJ est de $4,81 \pm 0,44$ mg équivalent cyanidine 3-glucoside pour 100 g de PFJ.

VI.3.5 Les caroténoïdes (β -carotène)

Le taux de bêta carotène contenu dans 100g de PFJ correspond à $5,02 \pm 0,19$ mg (**tableau 14**). L'étalonnage est effectué avec différentes concentrations de bêta-carotène (**figure18**). Selon [Kassem, 2011](#), lors de l'étude des effets des substances vaporisées sur les caractéristiques chimiques des fruits de jujubiers au cours des deux saisons, ces derniers montrent un taux de caroténoïdes de 6,2 mg/100g de fruit. Les travaux de [Talukdar, 2014](#), sur les parties comestibles de cinq variétés de jujubes rapportent des valeurs qui varient de 246,77 à 459,20 μ g pour 100 g de substrat. Ces valeurs sont largement supérieures à celles rapportées par [Bekir San, 2010](#) et qui concernent le contenu en β -carotène de trois sélections de fruits du jujubier qui varie de 7 à 35 μ g/100g. En définitive, le bêta-carotène contenu dans les fruits du jujubier est faible comparé à d'autres fruits tels que l'abricot à haute teneur en bêta-carotène ([Munzuroglu et al., 2003](#)).

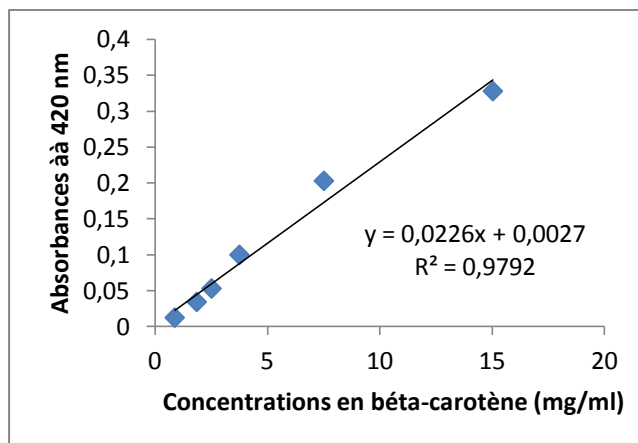
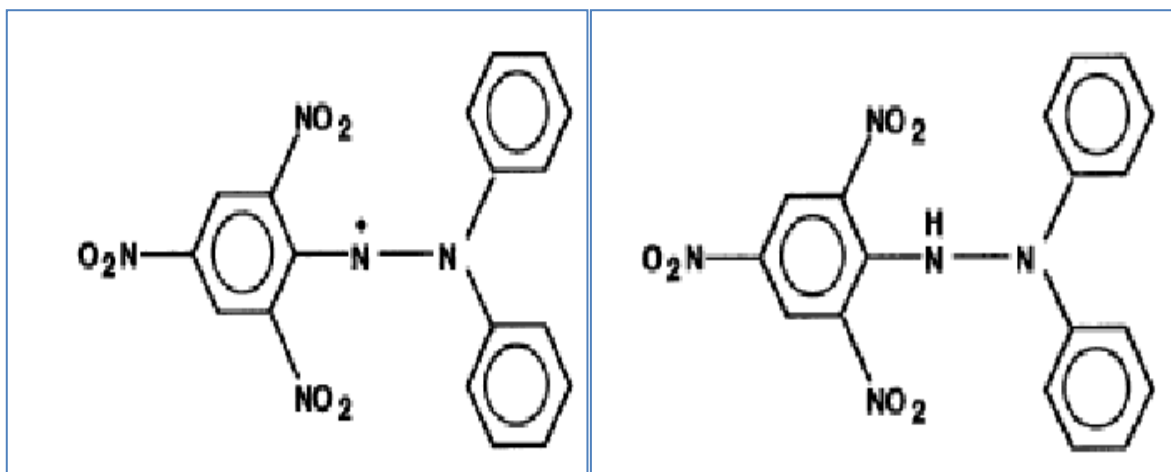


Figure 18: Droite d'étalonnage pour le dosage des caroténoïdes

VI.4.Mesure du pouvoir antioxydant de l'extrait de jujube par le test du DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits du *Zizyphus jujuba* vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm (**Figure19**).



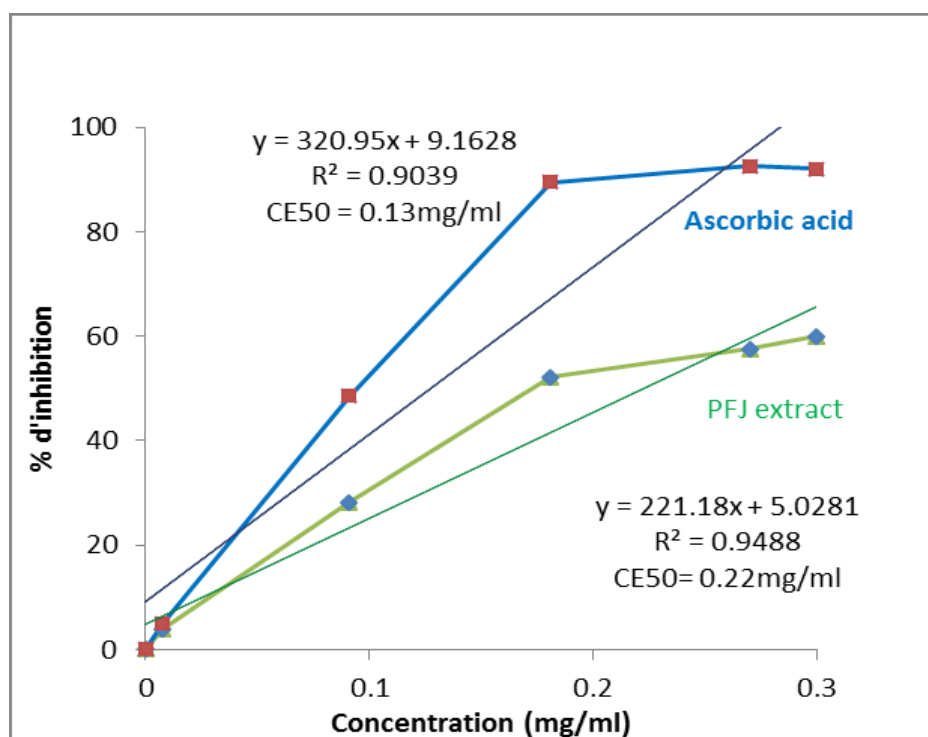
Diphenylpicrylhydrazyl + Antioxydant-OH → Diphenylpicrylhydrazine + Antioxydant-O.
(Couleur violet) (Couleur jaune)

Figure19 : Réaction d'un antioxydant avec le DPPH (Molineux ,2004)

Le DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) est un radical libre organique, toujours utilisé comme un réactif pour évaluer l'activité antiradicalaire des antioxydants (Oyaizu, 1996).

Le DPPH est caractérisé par son adaptation à plusieurs échantillons dans une courte durée, aussi il est assez sensible pour détecter les ingrédients actifs à des basses concentrations. A cet effet, il a été employé pour le criblage des activités anti radicalaires des extraits végétaux (Yi et al, 2008).

Le modèle de piégeage des radicaux DPPH stables est donc un procédé largement utilisé pour évaluer l'activité anti-oxydante dans un temps relativement court. Sur la base de ce principe, les caractéristiques de piégeage des radicaux DPPH d'extraits de quinze génotypes de jujube ont été mesurées (Kamiloglu *et al*, 2009). Le pourcentage d'inhibition varie de 80 à 99%. Selon ces auteurs il n'existe pas de corrélation entre cette activité et le contenu phénolique de jujubes. Li *et al*, 2005 ont aussi indiqué que l'activité antioxydante totale n'est pas due uniquement au contenu phénolique de ces fruits mais probablement à la présence d'autres composés phytochimiques tels que l'acide ascorbique, le tocophérol et des pigments, ainsi que la présence d'effets de synergie entre ces composés. Dans notre cas le pourcentage d'inhibition par le DPPH est de $56,60 \pm 3,99\%$ à la concentration de l'extrait éthanolique de PFJ de $0,25 \pm 0,062$ mg/ml. Ce résultat est important et témoigne d'une grande capacité de la PFJ, renfermant des antioxydants naturels à atténuer les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres. La CI50 qui est la concentration d'extrait de PFJ responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH représente 34 µg/ml comparativement à celle de l'acide ascorbique (10µg/ml).



Moyenne $\pm$ SD de trois déterminations, CI_{50} : concentration d'extrait éthanolique de PFJ responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH.

Figure 20: évaluation de CI_{50} de l'extrait PFJ et le standard acide ascorbique par la méthode DPPH.

VI.5. Mesure du pouvoir antioxydant de l'extrait de jujube par le test de FRAP

L'activité antioxydante de quelques cultivars de jujubes de Chine évaluée par la méthode de FRAP donne des valeurs de 342 à 1173 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ (Li et al, 2005). Les travaux de Gao et al, 2011 rapportent en utilisant la même méthode des valeurs moyennes pour cinq cultivars de jujube qui varient de 626 à 1126,9 mg équivalent vitamine C par 100 g de substrat. Zhang et al, 2010 ont évalué la capacité antioxydante de trois cultivars de jujubes par la méthode de FRAP de 252,43 à 982,31 mg équivalent vitamine C pour 100 g de substrat.

Dans notre cas, le pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de *Ziziphus* (EEZ) et d'acide ascorbique déterminé par la méthode FRAP et exprimé en densité optique est de $0,533 \pm 0,035$ et $1,16 \pm 0,020$ DO pour l'acide ascorbique à la concentration de 0,1 mg/ml et $1,87 \pm 0,044$ et $3,22 \pm 0,044$ à la concentration de 0,5 mg/ml (Figure 21). Nos résultats sont donc en accord avec les données rapportées par plusieurs auteurs, qui ont constaté que les fruits de jujube présentait une bonne activité antioxydante dans différents systèmes (Kamiloglu et al, 2009; Cheng et al, 2012; Zhang et al, 2010).

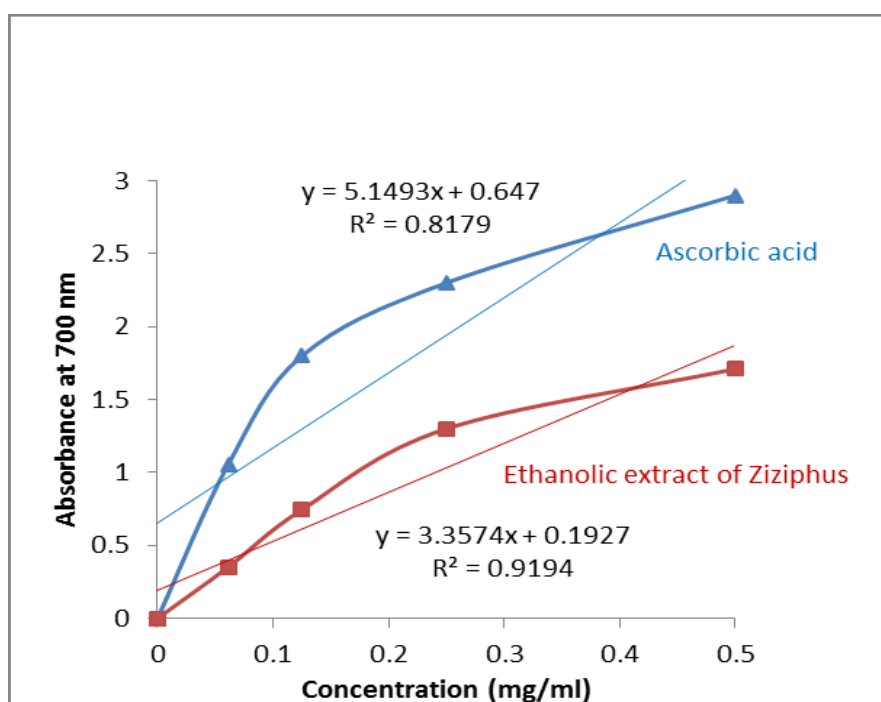


Figure 21: potentiel réducteur total de différentes concentrations de l'extrait PFJ et l'antioxydant de référence acide ascorbique par la méthode FRAP.

VI.6. Détermination des composés polyphénoliques par LC-MS/MS

L'HPLC représente une technique d'analyse fiable pour séparer les composés phénoliques (Gómez-Caravaca et al., 2006). L'identification des pics chromatographiques est effectuée en combinant les informations obtenues à partir de différentes sources. Quand un étalon de référence est disponible, l'identification des composés est confirmée par une

comparaison directe des temps de rétention et des spectres de masse acquis dans les mêmes conditions analytiques. Pour les autres composés (pour lesquels on ne dispose pas d'étalon), la masse exacte mesurée (ou formule chimique la plus probable qui peut être calculée à partir de cette masse) est comparée avec celle de composés de référence disponibles en ligne dans différents sites Web de base de données de produits chimiques (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) Les composés phénoliques identifiés dans la PFJ par LC-MS/MS sont présentés dans le **tableau 15**.

Tableau 15 : Identification par LC-MS/MS des composés phénoliques de l'extrait d'acétate d'éthyle de la PFJ

Name	Mass	m/z	RT
cinnamic acid	148,0528	166,0866	1,31
Coumaric acid methyl ester	178,0633	196,0971	5,808
3,4-dihydroxyphenylacetic acid	168,0415	169,0488	7,122
homovanillic acid	182,0574	183,0647	7,193
Ferulic methyl ester acid	208,0735	226,1073	7,426
Prenyl caffeate	248,1051	266,1389	7,641
caffeic acid	180,0422	181,0495	7,984
Pinobanksin-3-acetate	314,0798	332,1136	8,148
Genistein	270,0537	293,043	8,325
Coumaric acid	164,0475	165,0547	8,779
Quercetin	302,0425	325,0317	9,759
Naringenin	272,0684	273,0754	9,766
Hesperetin	302,0792	303,0864	9,835
Pinocembrin	256,0744	257,0817	9,841
3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid	194,058	195,0649	10,168
Benzoic acid	122,037	123,0443	10,217
Methoxy-pinobanksin	286,0843	287,0916	10,568
Artepillin C	300,1708	318,207	11,031
Chrysin	254,0577	255,065	11,255
Pinobanksin-3-propionate	328,0961	329,1034	11,46
Myricetin	318,0376	319,0449	11,878
Kaempferol	286,0486	287,0559	12,039
Tectochrysin	268,0735	269,0807	12,054
Isopentyl caffeate	250,1215	251,1288	12,261
Isoprenyl ferulate	262,1207	263,1279	12,69
Acacetin	284,0686	285,0759	13,132
Bis-methylated quercetin	330,0742	331,0815	15,256
methyl quercetin	316,0585	317,0658	15,843
Tyrosol	138,0676	139,0749	16,496
Hexadecanoic acid	256,2402	274,2741	16,792
Isoprenyl coumarate	232,1107	255,0999	17,171
9-Octadecanoic acid	282,2561	300,2899	17,471
Pimaric acid	302,2254	303,232	17,594

Les résultats montrent la présence de nombreux composés polyphénoliques ([Tableau 15](#)). [San et Yildirim, 2010](#) ont montré la présence de tocophérol et de β -carotène ainsi que de nombreux composés phénoliques tels que la catechine, l'acide caffeique, l'epicatechine, l'acide férulique, la rutine, l'acide p-hydroxybenzoïque et chlorogénique dans les fruits de quatre sélections de jujubes. L'acide férulique n'était pas présent dans toutes les sélections alors que la quercétine était absente. Selon ces auteurs les fruits du jujubier sont une bonne source de composés phénoliques particulièrement de catéchine et de rutine. Les travaux de [Gao et al, 2011](#) sur cinq cultivars de fruits de jujubier ont identifié par HPLC la présence de catéchine, d'acide protocatéchuïque d'épicatéchine et de rutine. Nos résultats ne sont pas en totale conformité avec ceux d'autres chercheurs comme [Zhang et al, 2010](#) qui ont identifié l'acide procatéchuïque, gallique, chlorogénique et caféique tandis que [Hudina et al, 2008](#) ils n'ont identifié que deux acides phénoliques (acide chlorogénique et caféique) et trois flavonoïdes (catéchine, épicatechine et rutine) dans des extraits de fruits de jujubiers chinois. Il est probable que malgré les similitudes géographiques et de pratiques culturelles les différences de synthèse de composés phénoliques sont dues à la variabilité génétique.

Deuxième partie :

*Potentiel antioxydant de l'extrait de pulpe du fruit du
jujubier*

*Étude sur modèle *Saccharomyces cerevisiae**

VI.7. Etude de la viabilité de *Saccharomyces cerevisiae*

VI.7.1. Comptage de colonies de *S. cerevisiae* après traitement avec H₂O₂

Après 48h d'incubation sur milieu YPD complet avec 1,5% Agar à 30°C, on a compté nos colonies selon la formule [N]:

$$[N] = \frac{\Sigma c}{(N1 + 0.1 N2) dv}$$

Avec :

Σc : nombre de toutes les colonies calculées sur les boîtes retenues

V : volume d'inoculum appliqué à chaque boîte ; 100 μ L = 10⁻³ml

N1 : nombre de boîtes retenues à la première dilution N1=3

N2 : le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution N2= 3

d : taux de dilution de la première dilution retenue pour le comptage sur boîte ; d = 10⁻¹

Le calcul de pourcentage de survie à partir de la DO₆₀₀=0.1 correspond à 1.3 10⁶ UFC/ml et représente 100% de survie. Les résultats obtenus figurent dans le **tableau x**.

Tableau 16 : Dénombrement et calculs des colonies après traitement par le peroxyde d'hydrogène

H ₂ O ₂ (mM)	0	1.760	17.6	176	1760
Σc	442	432	309	221	130
UFC/ml	134 .10 ⁴	130.10 ⁴	93.10 ⁴	67.10 ⁴	39.10 ⁴
Survie %	100%	97%	69%	50%	29%

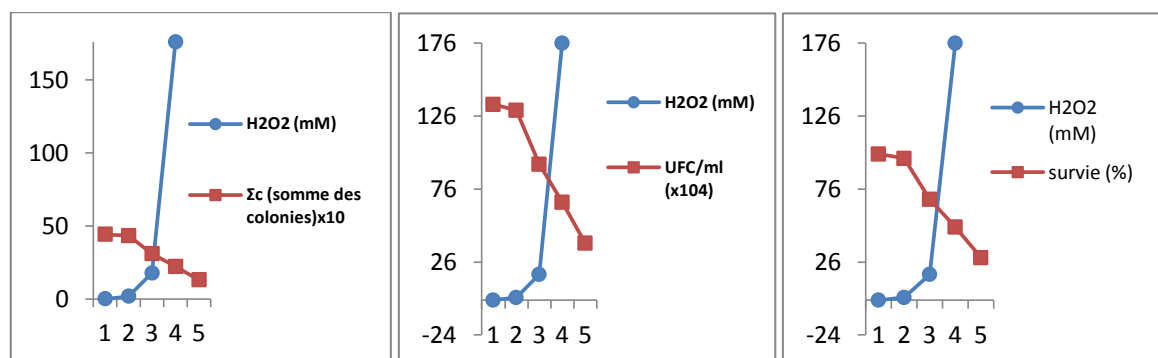


Figure 22 : Viabilité de *S. cerevisiae* face à un stress par H₂O₂ à différentes concentrations pendant 01 heure.

La **figure22** montre le taux de survie de *S. cerevisiae* par rapport au changement des concentrations de peroxyde d'hydrogène.

- A de petite concentrations de l'ordre de $\leq 17,6$ mM la toxicité n'est pas importante, et est sans grande influence sur notre souche.

- A une concentration de 176 mM le dénombrement révèle une diminution considérable avec moins de 50% de survie ; c'est la DL_{50} . C'est la concentration retenue pour la deuxième partie de notre travail.

- Au-delà de 176 mM le taux de mortalité est très important et le peroxyde d'hydrogène élimine la totalité de *S. cerevisiae*.

VI.7.2. Adaptation de *S. cerevisiae* à H_2O_2 en présence d'extrait brut de PFJ

La 2^{ème} partie de notre travail se limite à tester la viabilité de notre souche à la concentration induisant la mortalité de 50% de nos levures à savoir la DL_{50} retenue (176 mM).

Après 48h d'incubation sur milieu YPD complet avec 1,5% Agar à 30°C. Les colonies sont comptées selon la formule indiquée précédemment [N].

Le calcul du pourcentage de survie à partir de la $DO_{600}=0.1$ qui signifie $1,3 \cdot 10^4$ UFC /ml et représentant 100% de survie donne les résultats regroupés dans le [tableau 17](#).

Tableau 17 : dénombrement des colonies de *S. cerevisiae* et détermination de leur survie

	Témoin	DL_{50} (à 176 mM de H_2O_2)	DL_{50} + Extrait de PFJ (à 176 mM + E PFJ, 1ml à 2,78%)
Σc	442	221	344
UFC/ml ($\times 10^4$)	134	67	104
Survie (%)	100	50	≈ 78

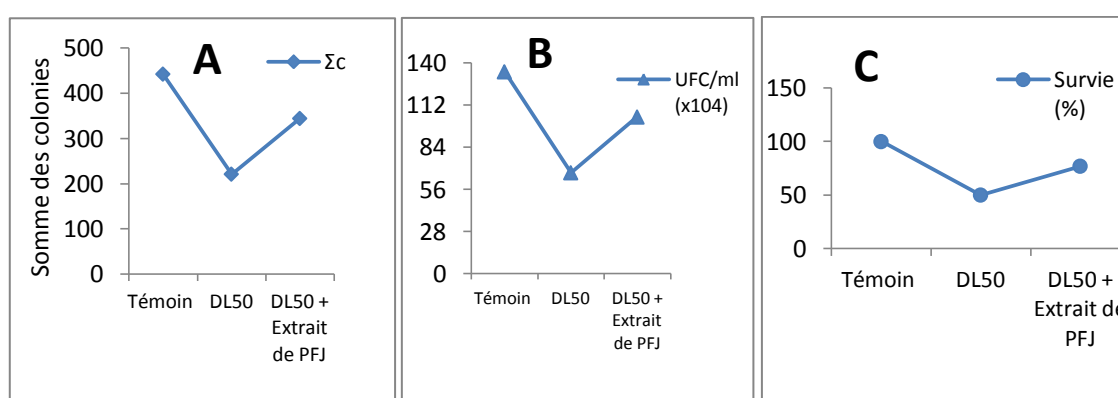


Figure 23 : Evolution des colonies de *S. cerevisiae* (A) et (B) et de leur survie (C) en présence de peroxyde d'hydrogène (DL_{50}) et d'extrait brut de pulpe de fruit du jujubier.

la **figure 23** illustre l'effet de l'extrait éthanolique de *Zizyphus jujuba* sur le taux de survie de *Saccharomyces cerevisiae*. A la concentration de 176 mM sans l'extrait de PFJ la somme des colonies est estimée à 221 soit une diminution de 50% correspondant à la DL_{50}

alors qu'elle atteint le chiffre de 344 ($\approx 78\%$) soit une augmentation de 28% par rapport au nombre de colonies à la DL50.

Ces résultats montrent que notre extrait éthanolique de *Zizyphus jujuba* a un effet palliatif face à l'effet létal du peroxyde d'hydrogène. Le pouvoir antioxydant de l'extrait de PFJ sur l'effet oxydant du peroxyde d'hydrogène est important.

La levure, étant une cellule au fonctionnement et au métabolisme comparable à celui des cellules humaines (tel un véritable modèle représentatif des organismes eucaryotes), a toujours été au cœur de la recherche fondamentale afin de mieux comprendre les phénomènes cellulaires et génétiques (humains, animaux et végétaux). En outre, les connaissances déjà acquises sur la levure (qualités intrinsèques, résistance à des environnements difficiles, besoins nutritifs...) semblent offrir des perspectives intéressantes dans les domaines de la nutrition, de la santé humaine ou animale et de l'énergie (Nève, 2002).

Partant du constat que des ROS (H_2O_2 et $O_2^{\bullet-}$) peuvent être impliquées dans la régulation de certaines fonctions cellulaires, la cellule doit détecter la concentration seuil à partir de laquelle ces espèces peuvent devenir toxiques. La détection est effectuée par le biais de protéines senseurs spécifiques d'un ROS. Le dépassement du seuil se traduit le plus souvent par une réaction directe du ROS sur la protéine senseur. Dans la suite du processus, ces protéines convertissent alors ce signal en une réponse transcriptionnelle (Traore, 2008).

Selon Gilbert, 1990 l' H_2O_2 ayant une réactivité limitée présente une caractéristique essentielle qui est celle de réagir avec les résidus cystéine ou méthionine des protéines.

L'oxydation d'une cystéine par H_2O_2 entraîne la formation d'un acide sulfénique (Cys-SOH). Celui-ci peut réagir avec une autre cystéine pour former un pont disulfure, ou s'oxyder en acide sulfonique (Cys-SO₂H) ou sulfinique (Cys-SO₃H). Le peroxyde d'hydrogène est aussi responsable de certains dommages : pontages ADN/protéines ou lésions de l'ADN provoqués par les radicaux formés par la réaction de Fenton (Imlay et al., 1988; Imlay et Linn, 1988).

Les ROS étant capables de réagir à différents niveaux dans les cellules, les conséquences liées à leur accumulation peuvent être très graves (Berlett et Stadtman, 1997; Dean et al., 1997). Les dommages sur les lipides, principalement ciblés sur les acides gras de la bicouche membranaire, entraînent une cassure des parois cellulaires. L'oxydation d'un ou plusieurs acides aminés des protéines peut conduire d'une part à une inactivation de celles-ci et d'autre part à des pontages protéine-protéine ou ADN/protéine. Cette oxydation augmente alors la sensibilité à la protéolyse (Berlett et Stadtman, 1997; Dean et al, 1997). Les dommages oxydatifs sur les acides nucléiques entraînent des mutations et des dégradations

des bases pouvant provoquer le clivage d'un brin d'ADN. Les pontages ADN/protéine générés par oxydation de l'ADN ou de la protéine peuvent provoquer un dérèglement de la machinerie répliquative (Beckman et Ames, 1997; Burrows et Muller, 1998). Toutes les réactions engendrées par ces dommages oxydatifs peuvent être la cause de mutations, de cancers et au final provoquer la mort cellulaire.

La protéine OxyR est un senseur du peroxyde d'hydrogène chez la bactérie *E. coli*. OxyR remplit parfaitement son rôle de senseur puisqu'elle peut détecter des concentrations très faibles d'H₂O₂ (excédant à peine la concentration physiologique : 20 nM) (Aslund et al., 1999). De par cette sensibilité, OxyR est le principal senseur de la concentration intracellulaire en H₂O₂ (Belousov et al., 2006). Plus d'une vingtaine de gènes régulés par OxyR sont dénombrés (Tao, 1997; Zheng et al., 2001a; Zheng et al., 2001b). Parmi ceux-ci se trouvent des gènes codant des protéines de détoxification comme une catalase (katG) et deux alkylhydroperoxyde reductase (ahpC et ahpF). Les gènes grxA et gorA sont également retrouvés et codent respectivement une glutaredoxine et une glutathion réductase. Le mécanisme réactionnel de détection de H₂O₂ par OxyR repose sur l'oxydation d'un seul résidu, la cystéine 199, en acide sulfénique. Ce dernier réagit ensuite avec la cystéine 208 pour former un pont disulfure (Choi et al., 2001; Zheng et al., 1998). Les études structurales (Choi et al., 2001) ont permis de mettre en évidence le changement de conformation d'OxyR lors de son oxydation par H₂O₂. Cette modification entraîne une réorganisation globale de la structure.

La réaction entre H₂O₂ et la protéine induit un changement conformationnel de la protéine qui se répercute sur la conformation de l'ADN. La polymérase peut alors accéder à l'ADN pour initier la transcription. La détection et la réponse au peroxyde d'hydrogène chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* font intervenir deux protéines : la protéine Orp1 et le facteur de transcription Yap1. Les fonctions de détection et de régulation sont ainsi découplées chez *S. cerevisiae*, faisant du relais Orp1-Yap1 l'équivalent d'OxyR d'*E. coli* (Toledano et al., 2004). L'étude du régulon Yap1 par électrophorèse bidimensionnelle (Lee et al., 1999) ou par la technique des puces à ADN (Gasch et al., 2000) a permis d'identifier au moins soixante-dix protéines dont l'expression est contrôlée par Yap1 en réponse à H₂O₂. Parmi celles-ci, il existe une majorité de protéines anti-oxydantes (Carmel-Harel et al., 2001; Collinson et Dawes, 1995; Grant et al., 1996; Kuge et Jones, 1994; Morgan et al., 1997) telles que GSH1 (une γ -glutamylcystéine synthétase), GLR1 (une glutathion réductase), GPX2 (une glutathion peroxydase), TRX2 (une thioredoxine), TRR1 (une thioredoxine réductase), TSA1 et AHP1 (deux thioredoxine peroxydases).

Le mécanisme réactionnel peut être scindé en deux parties : une étape de détection du peroxyde et une étape de régulation permettant la mise en place des systèmes de défense.

Le système est initialement activé par la formation d'un acide sulfénique sur la cystéine 36 d'Orp1 sous l'effet de H_2O_2 . Cette réaction conduit à la formation consécutive de deux ponts disulfures (inter- et intra-moléculaires) faisant intervenir les domaines N- et C-CRD terminaux (Cystein Rich Domain) ([Delaunay et al., 2002](#)) de Yap1 selon la séquence suivante: l'acide sulfénique Orp1-Cys38-SOH réagit avec la cystéine 598 de Yap1 formant le pont disulfure inter-moléculaire.

Le second pont disulfure est formé par condensation des cystéines 598 et 303 de Yap1, suivi de la libération d'Orp1 qui se retrouve réduite. Très récemment, la formation d'un deuxième pont disulfure intramoléculaire a été mise en évidence entre les cystéines 310 et 629 dans Yap1 ([Wood et al., 2003a](#)). Ce pont disulfure serait formé en suivant la même séquence que la formation du premier (celui impliquant les cystéines 303 et 598). Même si l'existence du dernier pont disulfure n'a pas été clairement établie *in vivo*, les auteurs suggèrent qu'il pourrait stabiliser la protéine Yap1 en la maintenant sous sa forme oxydée.

Ces différentes modifications subséquentes à la présence de peroxyde d'hydrogène démontrent jusqu'à un certain seuil les moyens déployés par la levure *S. cerevisiae* pour lutter contre l'effet oxydant. Cette lutte est évidemment facilitée dans notre cas par la neutralisation de H_2O_2 par l'extrait brut de la pulpe de *Z. jujuba*. En Chine, les fruits du jujubier sont principalement utilisés en médecine traditionnelle pour le traitement de certaines maladies telles que les tumeurs et les maladies cardio-vasculaires associées à la production d'espèces radicalaires résultant du stress oxydatif. Ces fruits sont couramment consommés sous forme fraîche ou séchée ([Zhang et al., 2010](#)). Récemment, la forte activité antioxydante des extraits de différentes parties du fruit du jujubier tels que le zeste, la pulpe et les graines a été rapportée. Cette activité anti-oxydante a été attribuée au niveau élevé des composés phénoliques. En effet le fruit du jujubier est connu pour contenir une quantité considérable de composés phénoliques, y compris l'acide chlorogénique, acide gallique, l'acide caféique et l'acide protocatéchique ([Zhang et al., 2010](#)).

Troisième partie :

*Potentiel anti-inflammatoire de l'extrait de pulpe du fruit du
jujubier*

Étude sur modèle Rat Wistar

VI.8. Etude de la réaction inflammatoire

VI.8.1 Effet de l'EEZ sur la réaction inflammatoire de la patte de rat

Les épaisseurs de l'œdème (état inflammatoire) induits par la carragénine augmentent avec le temps. Les résultats sont regroupés dans le **tableau 18**.

Au départ les épaisseurs des œdèmes relevés chez les rats avant injection de carragénine ne présentent pratiquement pas de différences et varient de $3,75 \pm 0,036$ à $3,83 \pm 0,104$ mm. Après trois heures les mesures de l'œdème au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat chez le groupe recevant NaCl 0,9% montrent une nette augmentation qui s'accroît après six (06) heures. Ces valeurs passent de $3,75 \pm 0,036$ à $4,86 \pm 0,034$ mm ensuite à $5,42 \pm 0,077$ mm respectivement 03 h et 06h après injection de carragénine ($P < 0,001$) (**figure24**). Le calcul du pourcentage d'augmentation (%Aug) par rapport à l'état initial donne une valeur de 29,6% après 03 h et 44,5% après 06 h.

Tableau18 : Effet de l'extrait éthanolique de *Z. jujuba* sur l'épaisseur de l'œdème (mm) de la patte de rat Wistar

Traitements Injections Intra péritonéales (IP)	Doses (mg/kg)	Epaisseurs des œdèmes (mm) chez les rats après injection de carragénine 1%			%Aug		%Inh	
		0h (état initial)	3h	6h	3h	6h	3h	6h
NaCl 0,9%	2,5	E ₀ NaCl 3,75 $\pm 0,036$	E ₃ NaCl 4,86 $\pm 0,034$	E ₆ NaCl 5,42 $\pm 0,077$	29,6	44,5	/	/
Extrait éthanolique de <i>Z. jujuba</i>	500	E ₀ EEZ 3,83 $\pm 0,104$	E ₃ EEZ 4,30 $\pm 0,45$	E ₆ EEZ 4,28 $\pm 0,062$	/	/	11,52	21
Diclofenac (AINS)	300	E ₀ Dicl 3,77 $\pm 0,045$	E ₃ Dicl 4,05 $\pm 0,064$	E ₆ Dicl 3,82 $\pm 0,056$	/	/	16,66	29,52

-La carragénine est injectée 15 min après les traitements intra péritonéaux par les différents produits

-Les valeurs sont des moyennes $\pm$ E.S.M (erreur standard sur la moyenne) avec n = 6; * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ par rapport aux Témoins.

L'injection de carragénine est à l'origine d'une réaction inflammatoire vasculoexudative. Il s'agit d'une vasodilatation artériolaire puis capillaire dans la zone atteinte. Localement, il en résulte une augmentation de l'apport sanguin et un ralentissement

du courant circulatoire. La congestion est déclenchée rapidement par un mécanisme nerveux (nerfs vasomoteurs) et l'action de médiateurs chimiques. L'œdème inflammatoire résulte du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat constitué d'eau et de protéines plasmatiques. Sa traduction clinique est un gonflement des tissus. L'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques (Weill et Batteux, 2003 ; Prin et al, 2009).

Dans le cas où l'extrait éthanolique de *Z. jujuba* (EEZ) est utilisé à raison de 500 mg/kg, on constate que l'épaisseur de l'œdème passe de $3,83 \pm 0,104$ mm à $4,30 \pm 0,45$ mm, 3 heures après injection de carragénine. Ces résultats montrent une faible diminution de l'œdème par rapport au lot injecté de NaCl 0,9% ($P < 0,001$). Cette diminution de l'œdème est évaluée à 11,52% après 03 heures. Après 06 heures, le lot de rats traités par l'EEZ présente une moyenne des épaisseurs $4,28 \pm 0,062$ mm correspondant à un pourcentage de diminution de 21%. Cette diminution comparée à celle du lot de rats injectés de NaCl 0,9% est hautement significative ($P < 0,001$) (figure 24).

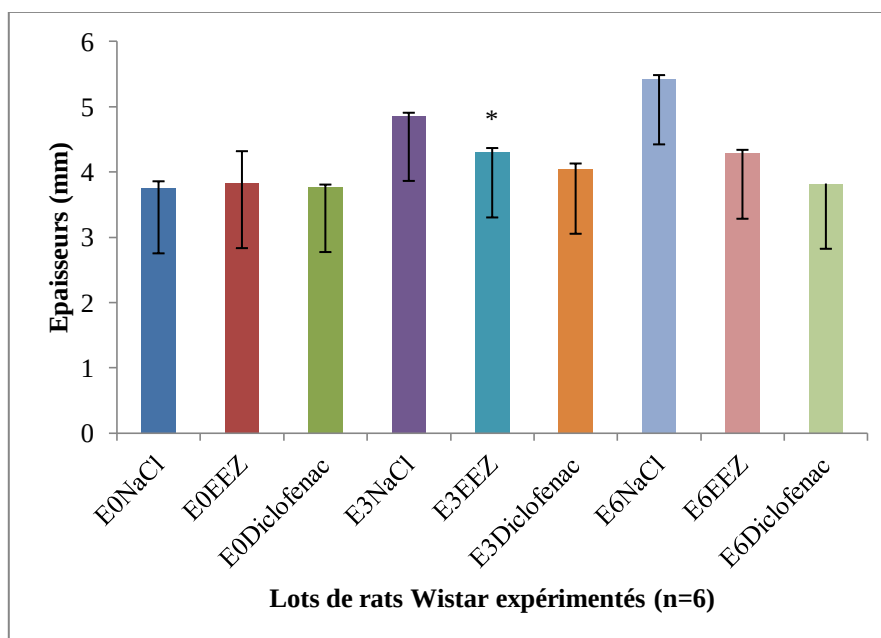


Figure24 : Effet de l'extrait éthanolique de *Z. jujuba* sur l'épaisseur de l'œdème de la patte de rat Wistar induit par injection de carragénine (mm).

-Les valeurs sont des moyennes $\pm$ E.S.M (erreur standard sur la moyenne) avec $n = 6$; $*P < 0,001$ par rapport aux Témoins. Les témoins sont représentés par E₀NaCl, E₃NaCl et E₆NaCl.

Si l'on considère le Diclofénac, un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé en intrapéritonéale chez les rats injectés de carragénine, l'épaisseur de la région centrale de l'aponévrose plantaire gauche passe de $3,77 \pm 0,045$ mm à $4,05 \pm 0,064$ mm après 03h. Cette

dernière valeur est diminuée comparativement à celle du lot de rats injectés en intra péritonéale par du NaCl 0,9% avec un pourcentage d'inhibition de 16,66% ($P < 0,001$). En outre ces valeurs évoluent après 06 heures d'injection de carragénine pour atteindre $03,82 \pm 0,056$ mm. Cette dernière valeur est aussi significativement diminuée par rapport à celle des rats injectés de NaCl 0,9% ($5,42 \pm 0,077$ mm) avec un pourcentage d'inhibition de 29,52% ($P < 0,001$).

En définitive les résultats de notre expérimentation montrent que l'EEZ présente un effet anti-inflammatoire chez les rats injectés par la carragénine à 1% comparativement au lot n'ayant reçu qu'une injection sans effet de NaCl 0,9%. Aussi l'utilisation du Diclofenac montre un effet anti-inflammatoire plus prononcé que celui de l'EEZ après 03h et 06 h avec des valeurs respectivement de $4,30 \pm 0,45$ vs $4,05 \pm 0,064$ mm et $4,28 \pm 0,062$ vs $3,82 \pm 0,056$ mm ($P < 0,001$).

Le criblage de l'activité anti-inflammatoire est réalisé par le test de la carragénine. Cet agent phlogogène induit au niveau de la patte un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et paramètre important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés. Cette technique a été sélectionnée en raison de sa simplicité d'exécution et en raison de sa reproductibilité. La carragénine provoque l'inflammation locale lorsqu'elle est injectée dans l'aponévrose de la plante du pied ([Bhatt et al., 1977](#); [Ossipov et al., 1995](#)). La cause de cette réaction inflammatoire est la lésion tissulaire. Cette lésion tissulaire induit la synthèse de l'histamine, des prostaglandines, des leucotriènes ([Ammon et al., 1993](#)), du PAF (facteur d'activation plaquettaire), des cytokines, du NO (monoxyde d'azote) et du TNF (facteur de nécrose tumorale) ([Clarke et al., 1996](#)).

L'évolution de l'œdème suite à une injection de la carragénine évolue de manière temps-dépendant et se divise en deux phases : la première phase se situe de 0 à 3h ; la deuxième phase de 3 à 6h. Des études antérieures ont indiqué que trois heures après administration de la carragénine son effet est maximal ([Kirkova et al., 1992](#)). En effet, la carragénine induit une augmentation de la synthèse de cyclooxygénase de type 2 (COX-2). L'augmentation de la concentration de cette enzyme passe par un optimum à 1h selon ces mêmes auteurs. Cette augmentation est accompagnée par une augmentation de la synthèse en prostaglandines essentiellement, la prostaglandine type E2 (PGE2) impliquée dans les processus de la douleur et de l'inflammation ([Nantel et al., 1999](#) ; [Posadas et al., 2004](#)). Ceci explique l'effet des AINS comme le Diclofenac qui n'a d'effet qu'à 1h. Ceci est en relation avec leur mode d'action qui passe par l'inhibition de la Prostaglandine par stimulation de la

COX-1 et COX-2 (Vergne *et al.*, 2000 ; Editorial, 2005). Cela explique aussi pourquoi l'effet du Diclofenac devance celui de notre extrait EEZ après 3h et 6h d'injection de carragénine, agent inflammatoire.

VI.8.2 Effet de l'EEZ sur la C-réactive protéine (CRP)

Le dosage de la C-réactive protéine est effectué par une technique automatisée immunoturbidimétrique qui a donné les résultats traités par la **figure 25**.

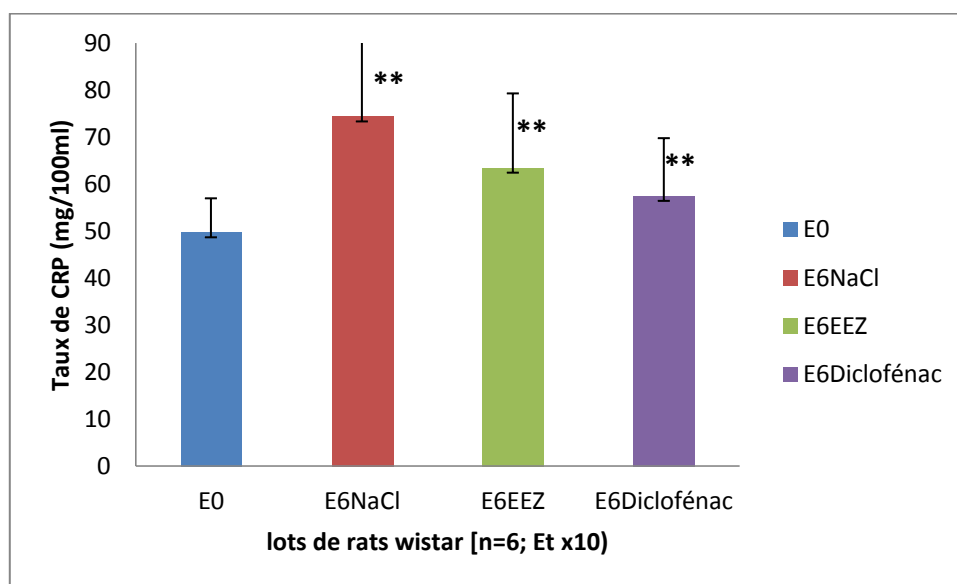


Figure25 : C-Réactive Protéine chez les rats Wistar traités par différents produits et injectés de carragénine inflammatoire à 1%.

- E0= lot de rats traités par du NaCl 09% au début de l'expérimentation avant injection de carragénine à 1%
 - E6NaCl= lot de rats traités avec NaCl 09%, 06 heures après injection de carragénine à 1%
 - E6EEZ= lot de rats traités avec EEZ, 06 heures après injection de carragénine à 1%
 - E6Diclofenac= lot de rats traités avec le Diclofenac 06 heures après injection de carragénine à 1%
- (n=6, *P<0,01 différence significative ; **P<0,001 différence hautement significative. Les valeurs sont comparées à celles du témoin E0).

Six (06) heures après injection de carragénine à 1% la CRP_r subit une augmentation chez les rats traités par du NaCl à 0,9% comparativement à l'état initial avec respectivement des valeurs de 497µg/ml vs 743,5µg/ml (p< 0,001). La protéine C-réactive (CRP) est une pentraxine rencontrée chez la plupart des vertébrés (souris, rats, humains) et chez les invertébrés comme la limule (*Limulus polyphemus*) (Etlinger et Coe 1986 ;Nakanishi *et al.* ,1991 ;Shrive *et al.*,1999).

La C-réactive protéine humaine (CRP_h) est une protéine de la phase aiguë inflammatoire dont les concentrations plasmatiques peuvent augmenter jusqu'à 1000 fois suite aux dommages de tissu ou d'infection (Padilla et al. 2003). La CRP_h se lie également à la phosphorylcholine que l'on trouve dans les phospholipides membranaires. Parmi les fonctions effectrices exercées par la CRP_h lors de la liaison à des ligands, c'est l'activation in vivo et in vitro du complément (Nakanishi et al.,1991 ;Siegel et al.,1974 ;wolbink et al., 1996).

Chez les rats, la CRP (CRP_r) n'est pas une protéine typique de la phase inflammatoire aiguë en comparaison avec l'haptoglobine sérique et le fibrinogène plasmatique (Giffen et al., 2003). Cependant, contrairement aux humains, les rats ont des concentrations plasmatiques de CRP beaucoup plus élevées, soit environ 300-500 mg/l, ce qui est 100 fois plus élevé que la concentration chez les humains. Contrairement à la CRP_h, la CRP_r est incapable d'activer le complément malgré une homologie en acide aminés de 70%. Il est aussi important de signaler que la CRP_r n'active pas le complément en utilisant le polysaccharide de *Streptococcus pneumoniae* et peut par conséquent l'activer lors de sa liaison avec d'autres ligands.

Dans notre cas la CRP_r augmente et corrobore les résultats de nombreux travaux l'ayant utilisé pour suivre l'évolution de la réaction inflammatoire aigue. En effet pour les différents lots, E6NaCl, E6EEZ et E6Diclofenac le taux de CRP_r est augmenté sensiblement par rapport à l'état initial (E0) avec respectivement des valeurs de 743,5 ; 634,5 ; 574,5µg/ml vs 497µg/ml (p<0001)(figure25). Selon Giffen, 2003 les taux de CRP_r culminent, 25 à 40 h après l'administration d'adjuvant complet de Freund par voie intra péritonéale, à environ 120% de ceux du contrôle (100%). Selon Dimitrov et al., 2014 les rats obèses présentent une élévation de la CRPr qui atteint 947,51µg/ml par rapport à celle des témoins (649,34 µg/ml) après quatorze semaines d'expérimentation. Dans notre cas la quantification immunoturbidimétrique de la CRP a permis sa culmination à 743,5µg/ml pour les rats sans traitement anti-inflammatoire correspondant à 150% comparativement au témoin à 100%.

Chez le lot de rat ayant reçu l'extrait éthanolique de *Z. jujuba*, 15 minutes avant le traitement par la carragénine et après six heures, on assiste à une diminution du taux de CRP_r chez les rats traités avec du NaCl 0,9% (E6NaCl) comparativement à ceux traités avec l'EEZ (E6EEZ), avec des valeurs respectivement de 743,5 µg/ml vs 634,5 µg/ml (P<0,01). Quand au lot de rats traités par le diclofénac, il présente une valeur sensiblement plus diminuée que celle du lot traité à l'EEZ comparativement au lot traité au NaCl 0,9%. En effet le taux de CRP_r de E6Diclofenac est inférieur à celui de E6NaCl avec des valeurs respectivement de

574,5µg/ml vs 743,5µg/ml ($p<0,001$). Aussi il est important de comparer l'effet de l'EEZ à celui du diclofenac par rapport à celui de NaCl supposé comme nul. Le lot E6EEZ présente cependant un taux de CRPr de 634,5 µg/ml supérieur à celui du lot E6Diclofenac qui est de 574,5 µg/ml ($P<001$). Ces résultats témoignent de l'effet anti-inflammatoire important de l'extrait ethanolic de *Z. jujuba* (E6EEZ) comparativement au lot non traité (E6NaCl) mais demeure légèrement inférieur à l'effet anti phlogogène du diclofenac.

Ces résultats montrent aussi que le fruit du jujubier présente une activité anti-inflammatoire appréciable comparativement à un médicament. Cela reflète la teneur importante en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en anthocyanes déterminés dans ce fruit. Notre étude contribue à la compréhension de la relation positive entre la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes dans l'extrait ethanolic du fruit du jujubier et son activité anti-inflammatoire. Dans l'ensemble, Les différentes parties de la plante de l'espèce *Ziziphus* de la famille des Rhamnaceae sont couramment utilisées en médecine traditionnelle dans différentes régions du monde, principalement dans les régions subtropicales et tropicales du continent asiatique et américain mais aussi en région méditerranéenne pour soigner diverses maladies telles que les troubles digestifs, l'asthénie, les problèmes hépatiques, l'obésité, les troubles urinaires, le diabète, les infections de la peau, l'anorexie, la fièvre, la pharyngite, la bronchite, l'anémie, la diarrhée, l'insomnie, et le cancer (Plastina et al., 2012 ; Saif et al., 2010).

VI.8.3. Effet de l'EEZ sur la Formule numéraire sanguine du rat (FNS_r)

La FNS_r est un examen courant et essentiel en clinique générale et celle des animaux. Elle est constituée, d'une part, du dénombrement des hématies et, d'autre part, de celui des leucocytes. Nous nous intéresserons, dans cette partie de l'étude uniquement à cette seconde catégorie de cellules. L'étude nous permettra de connaître les variations numériques des leucocytes de rats, physiologiques puis pathologiques en l'occurrence lors de l'inflammation aigue produite par l'introduction de carragénine. A cet effet nous avons utilisé la technique automatisée dont les avantages résident dans l'assurance d'une meilleure reproductibilité, une plus grande précision des résultats et une bonne rapidité d'exécution. Le principe de détection optique par diffraction est fondé sur l'analyse et la quantification de différents paramètres obtenus à partir des signaux lumineux émis par une cellule traversée par un faisceau laser. L'étude de la diffraction optique des signaux en provenance de chaque cellule permet de connaître sa taille et sa « granulosité » (présence de granulations cytoplasmiques). Les automates d'hématologie qui utilisent ce principe d'analyse affichent la numération et la formule leucocytaire. Les résultats de notre étude sont rassemblés dans la **figure26**.

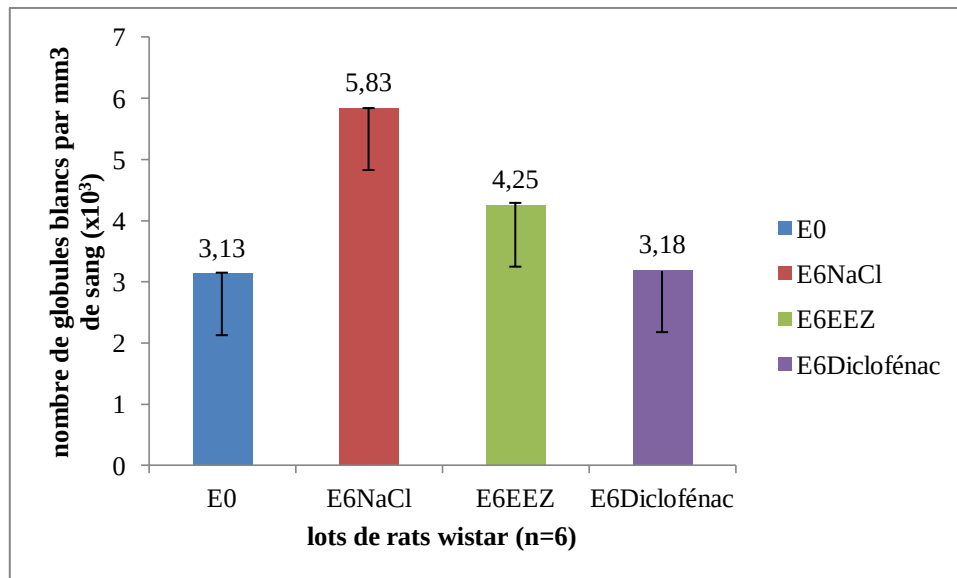


Figure26 : Détermination des leucocytes de rats au cours de la réaction inflammatoire

Pour les lots (voir figure)

(n=6, *P<0,01 différence significative ; **P<0,001 différence hautement significative. Les valeurs sont comparées à celle du témoin E0).

Le dénombrement leucocytaire chez les rats normaux (E0) âgés de 6 à 7 semaines et pesant 150 à 200g donne une valeur de $3,13 \cdot 10^9$ /litre de sang ($3130/\text{mm}^3$). Ces valeurs sont inférieures à celles rapportées par [CRL, 1998](#) et qui sont pour les femelles de mêmes mensurations pondérales de 4190 à $9730/\text{mm}^3$. De nombreux auteurs ([Smith et al. 1986](#) ; [Suber et odell, 1985](#) ; [Eccleston, 1977](#)) rapportent des variations dans le nombre de leucocytes. Il peut en effet varier du double au triple selon le lieu de ponction ([Descat, 2001](#)). Selon [Smith et al, 1986](#) le sang prélevé à partir de l'aorte abdominale et dans un tube type Vacutainer et à partir du ventricule droit chez le rat montre un niveau bas d'érythrocytes, de leucocytes et de plaquettes comparé à celui prélevé à partir d'autres sites. Aussi les femelles présentent un nombre de leucocytes inférieur à celui des males. La littérature ne manque pas de références sur les paramètres hématologiques du rat. Cependant, il peut y avoir de grandes variations d'une étude à l'autre et il semblait à priori difficile d'établir un hémogramme de référence pour le rat. En effet il existe un très grand nombre de facteurs de variation, parmi lesquels on peut déjà citer le sexe, l'âge, le site de ponction, la lignée, le statut médical, et bien sûr la méthode d'étude de ces paramètres sanguins, manuelle ou automatisée. Tous ces facteurs ne peuvent pas être contrôlés de manière semblable par tous les laboratoires et pour toutes les expérimentations. En définitive et selon [Ringler et Dabich 1979](#), il est impossible d'établir une quelconque valeur universelle pour un paramètre hématologique ou biochimique.

Six heures après injection de carragénine chez le lot (E6NaCl) traité par du NaCl 09% on assiste à une augmentation du nombre de leucocytes qui atteint $5830/\text{mm}^3$ comparé au témoin ($3130/\text{mm}^3$) ($P < 0,001$).

L'inflammation aiguë représente la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. La réaction vasculo-exsudative se traduit cliniquement par quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation aiguë : rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur ; elle comporte trois phénomènes : une congestion active, un œdème inflammatoire, une diapédèse leucocytaire. L'œdème inflammatoire résulte du passage dans le tissu conjonctif interstitiel ou les cavités séreuses d'un liquide appelé exsudat constitué d'eau et de protéines plasmatiques. Sa traduction clinique est un gonflement des tissus qui, en comprimant des terminaisons nerveuses, est responsable de la douleur (également provoquée par certains médiateurs chimiques) (Russo-Marie et al., 1998).

L'œdème inflammatoire résulte d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet de médiateurs chimiques. Ces différents phénomènes témoignent de la forte multiplication leucocytaire.

Pour les lots traités à l'EEZ (E6EEZ) et au diclofénac (E6Diclofenac) on constate qu'après six heures le nombre de leucocytes diminue par rapport au témoin (E6NaCl) ($P < 0,001$). Les rats traités par le Diclofénac, anti-inflammatoire non stéroïdien (E6Diclofénac) présentent une diminution du nombre de leucocytes par rapport au témoin (E6NaCl) mais de manière plus prononcée que pour l'EEZ ($P < 0,001$). Cela montre que notre extrait présente un effet anti-inflammatoire entraînant une variation de la formule leucocytaire mais de manière moins intense que le Diclofénac.

les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), bloquent la synthèse des prostaglandines. L'enzyme cible des AINS est la prostaglandine synthase ou cyclooxygénase (COX) qui convertit l'acide arachidonique en prostaglandine H_2 (PGH₂) ; du métabolisme de PGH₂ dérivent ensuite les diverses prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes. Il existe au moins deux isoformes de COX, de même poids moléculaire et avec environ 60 % de similitude, COX-1 et COX-2. Le diclofénac est 20 à 50 fois plus actifs sur COX-1 que sur COX-2 (Meade et al., 1993 ; Mitchell, 1993). L'action inhibitrice du Diclofénac sur les cyclooxygénases entraîne une inhibition de la synthèse des prostaglandines et donc de la réaction inflammatoire aigue innée et de la prolifération des globules blancs.

L'EEZ contient de nombreux composés identifiés par LC-MS/MS ([Tableau15](#)). Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques biologiquement actifs et ubiquitaires chez les fruits et les végétaux. La composition des flavonoïdes varie selon les variétés de fruits. Dans la pulpe du fruit du jujubier la présence de flavonoïdes comme la quercétine, le kaempférol et la myricétine, confèrent à ce produit la capacité d'inhiber l'activité des enzymes impliquées dans l'apparition de médiateurs inflammatoires. Selon [González-Gallego et al, 2010](#) ces médiateurs sont le monoxyde d'azote (NO) ou les prostanoïdes, eicosanoïdes synthétisés par l'entremise de cyclo-oxygénase (COX) et les leucotriènes qui possèdent un rôle chimiotactique pour les leucocytes (macrophages, neutrophiles..) sur les sites de l'inflammation. Ces flavonols (quercétine et kaempférol) inhibent la production de NO et l'expression de l'oxyde nitrique synthase une oxydoréductase responsable de la synthèse du radical libre $\cdot\text{N-O}$ chez les lignée RAW264-7 de cellules macrophage-like de souris ([Liang et al. 1999](#) ; [Shen et al., 2002](#)). La quercétine et le kaempférol inhibent aussi la cyclo-oxygenase (COX)-2 chez les macrophages de souris ([Jung et Sun, 2004](#) ; [Kim et al., 2008](#)). En définitive ces travaux corroborent nos résultats concernant l'effet anti-inflammatoire de l'EEZ au regard de sa composition en polyphénols tels que la quercétine le kaempférol, la myricétine la naringénine et l'hespérétine ([tableau15](#)).

Conclusion générale

Le travail que nous avons entrepris avait pour objectif de valoriser le *Z. jujuba* en déterminant le profil nutritionnel et thérapeutique de la pulpe du fruit de cette espèce, très rare qui ne se trouve que clairsemée dans des habitations de l'ouest d'Algérie et qui produit des fruits qui sont pourtant convoités mais souvent ignorés voire oubliés et méconnus par la population.

La détermination des métabolites primaires de ce fruit donne un profil nutritionnel que l'on peut considérer d'appréciable et comparable aux mêmes espèces étudiées dans d'autres pays. Les légères variations dans les valeurs sont liées à l'influence probable de l'environnement abiotique et à la différence des conditions climatiques et à la répartition géographique.

Avec un taux de cendres élevé de 6.1% notre PFJ semble riche en éléments minéraux. Si la matière grasse et les protéines sont faibles respectivement de 0.28% et 2.88%, les sucres représentent quant à eux 28.20% de la matière fraîche de PFJ et cette quantité est comparable au taux rapporté par le répertoire général des aliments pour la pulpe fraîche du fruit du Jujubier commun et le Jujubier de Chine et qui est de 19%.

Dans notre cas la valeur de 194 mg de vitamine C pour 100g de la PFJ est appréciable et témoigne d'une richesse de notre produit en ce composé qui peut varier en fonction de la maturité du fruit.

La détermination des métabolites secondaire de la PFJ montre que le dosage des composés phénoliques, des flavonoïdes, des tanins totaux hydrolysables et condensés, des anthocyanes et des caroténoïdes, confèrent à ce produit une grande aptitude à piéger les radicaux libres et réduire les risques de maladies cardiovasculaires et de cancer comme tous les polyphénols aux propriétés antioxydantes avérées.

Les différents composés phénoliques contenu dans notre extrait ethanologique ont montré une activité antioxydante assez appréciable comparée à celle de la vitamine C.

Cette activité antioxydante est corroborée par l'analyse de notre PFJ par LC-MS/MS qui donne un profil avec de nombreux composés phénoliques notamment la quercétine la naringine, la génistéine, l'hespérétine et le kaempférol. Ces derniers ne sont pas en totale conformité avec ceux découverts par d'autres chercheurs mais sont pour la plupart doués de cette activité antioxydante. Par ailleurs, il est probable que malgré les similitudes géographiques et de pratiques culturelles du jujubier, les différences de synthèse de composés phénoliques sont dues à la variabilité génétique.

L'utilisation de *S. cerevisiae* comme modèle d'étude du potentiel antioxydant de la PFJ a permis suite à un stress par du peroxyde d'hydrogène de déterminer la DL50 de cette levure. Notre extrait éthanolique de *Zizyphus jujuba* a un effet palliatif face à l'effet létal vis-à-vis de *S. cerevisiae* du peroxyde d'hydrogène. Le pouvoir antioxydant de l'extrait de PFJ sur l'effet oxydant du peroxyde d'hydrogène est important. Les différentes modifications subséquentes à la présence de peroxyde d'hydrogène démontrent jusqu'à un certain seuil les moyens déployés par la levure *S. cerevisiae* pour lutter contre l'effet oxydant. Cette lutte est évidemment facilitée dans notre cas par la neutralisation de H_2O_2 par l'extrait brut de la pulpe de *Z. jujuba*.

Le potentiel anti-inflammatoire de l'EEZ est testé in vivo chez des rats Wistar. Les épaisseurs des œdèmes induits par la carragénine au niveau de la région subplantaire de la patte du rat augmentent avec le temps. L'EEZ présente un effet anti-inflammatoire chez les rats injectés par la carragénine à 1% comparativement au lot n'ayant reçu qu'une injection sans effet de NaCl 0,9%. Aussi l'utilisation du Diclofenac montre un effet anti-inflammatoire plus prononcé que celui de l'EEZ après 03h et 06 h. L'extrait de *Z. jujuba* doté de son activité telle que mise en évidence dans notre expérimentation in vivo chez le rat Wistar, pourrait être un substituant des produits anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

Contrairement aux humains, les rats ont des concentrations plasmatiques de CRP beaucoup plus élevées, soit environ 300-500 mg/l, ce qui est 100 fois plus élevé que la concentration chez les humains. Dans notre cas la CRP_r augmente et corrobore les résultats de nombreux travaux l'ayant utilisé pour suivre l'évolution de la réaction inflammatoire aigue. Ces résultats montrent aussi que le fruit du jujubier présente une activité anti-inflammatoire appréciable comparativement à un médicament, le Diclofenac. Cela reflète la teneur importante en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes et en anthocyanes déterminés dans ce fruit. Cela contribue aussi à la compréhension de la relation positive entre la teneur en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique du fruit du jujubier et son activité anti-inflammatoire.

Cette étude nous a aussi permis de connaître les variations numériques des leucocytes de rats, physiologiques puis pathologiques en l'occurrence lors de l'inflammation aigue produite par l'introduction de carragénine. **La consommation de polyphénols ou d'aliments riches en polyphénols semble avoir des effets potentiellement bénéfiques** comme par exemple, une baisse des marqueurs de l'inflammation tels que la CRP et les leucocytes ou une diminution du volume de l'œdème induit par un antigène la carragénine. **Toutefois, les**

mécanismes impliqués ne sont la plupart du temps que partiellement connus et les études donnent des résultats contradictoires.

En perspective il est important de faire l'état des lieux de cette plante (*Z. jujuba*) et ses fruits en vue de promouvoir sa vulgarisation en mettant en avant les allégations nutritionnelles et thérapeutiques permettant la conception de produits nouveaux, d'aliments fonctionnels. Le fruit du jujubier se consomme en frais, en conserves, confits, en confiture, en liqueur, ou à l'état de pâte. Dans les régions du Sahel, ce fruit constitue l'intérêt principal du jujubier, largement consommé par les populations et faisant l'objet d'un commerce actif impliquant surtout les femmes. Ce produit des terroirs villageois sahéliens présente un profil nutritionnel appréciable. Le fruit de la variété locale ayant une pulpe parfois peu sucrée peut être transformé en farine pour diverses utilisations alimentaires : pâte, gâteau, boissons, bouillie.

L'apparition saisonnière des fruits de l'espèce jujuba écotype Zfisef que nous avons étudiée n'attire malheureusement pas l'attention d'une grande frange de la population qui ignore ce produit aux vertus thérapeutiques et nutritionnelles pourtant très importantes dans les zones soudaniennes et sahéliennes du Burkina Faso, du Cameroun, de la Gambie, de la Guinée, du Mali, du Niger et du Sénégal. L'espèce est largement répartie en Afrique et en Asie du Sud tropicale : l'Inde, le Pakistan, le Bangladesh, le Sri Lanka...

A

Abdel-Zaher A ., Salim Y-S ., Assaf M-H ., Abdel-hady R-H. (2005). Antidiabetic activity of *Zizyphus spina –christi* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**:129-138

Abu-Zarga M ., Sabri S ., Al-Boudi A ., Ajaz S ., Sultana N ., Rahman A-U. (1995). New cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus lotus*. *Journal of Natural Products*, **58**:504-511.

Aggarwal B B, Sung B (2008). Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, **30**, 85-94

Ammon H.P.T.; Safayhi H.; Mack T.; Sabieraj J. (1993) Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and bowenolic acids; *Journal of Ethnopharmacology*; **38**:113-119.

Ansari S.H., Bhatt D., Masihuddin M. and Khan M.U., (2006). The wound healing and herbal drugs. In: Herbal Drugs. Jaypee Publication, New Delhi; 460-468

Antwerpen P-V. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myéloperoxydase /peroxyde d'hydrogène /chlorure Thèse de Doctorat .Université libre de Bruxelles. 122p

AOAC. (1980). Official methods of analysis. 11th Edition William Horwitz WASHINGTON.D.C.

ARCHER R. K.- Technical methods- In: **ARCHER,R.K., JEFFCOTT,L.B.** (1977) *Comparative Clinical Hematology*- Blackwell Scientific -- Chap 14, 537-609.

Aslund f. zheng M. beckwith.j. and storz . g (1999). Regulation of oxy-r transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:6161-6165.

Audigie C. , Figarella J ., Zonszaain F. (1984).Manipulation d'analyse biochimique .Doin (Ed).Paris, 274p

Azam-Ali S., Bonkougou E., Bowe C., Dekock C., Godara A., Williams J.T., (2006)- Ber and other jujubes SO17 1BJ, UK. Centre for Underutilized Crops, 289 P.

B

Bhatt, K.R.; Mehta, R.K.; Shrivastana, P.N. (1977) .A simple method of recording anti-inflammatory effects on rat paw oedema; *Indian 1. of Physiology and Pharmacology* ; 21: 399-400.

Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Tersikh AV, Lukyanov S. (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods.*; 3 (4):281-6.

Burdurlu Hande Selen, Nuray Koca, Feryal Karadeniz(2006)' Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *Journal of food engineering.*74(2):211-216.

Bate-smith. E. C. (1973) haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry* .12: 907-912

Belkheiri, N. Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, (2010) :182pp.

Bahorun, T. Gressier, B. Trotin, F. Brunet, C. Dine, T. Luyckx, M. Vasseur, J. Cazin, M. Cazin, J.C. Pincas, M. (1996).Oxygen species scavening activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittle Forshing* , , n° 46, pp 1086-1089.

Babior B-M ., Lambeth J-D ., Nauseef W. (2002). The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys*, **397**:342-344.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3ème éd). Tec et Doc (Ed), Paris, 1120p

Bahorum T. (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle Food and Agricultural Research council Mauritias pp 83-94.

Boizot N. et Charpentier J-P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des Techniques de l'Inra*. pp79-82.

Boudraa S., Hambaba L., Zidani S., Boudraa H. (2010). Composition minérale et vitaminique des fruits de cinq espèces sous exploitées en Algérie : *Celtis australis L.*, *Crataegus azarolus L.*, *Crataegus monogyna Jacq.*, *Elaeagnus angustifolia L.* et *Zizyphus lotus L.* Fruits, 65(2): 75-84.

Botting RM, Botting JH (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. Clinical Drug Investigation, 19, 1-7.

Börzsei R, Pozsgai G, Bagoly T, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z (2008). Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. Neuroscience, 152, 82-88.

Birklein F, Schmelz M (2008). Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). Neuroscience Letters, 437, 199-202.

Bidaut-Russell M (2001) Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 15, 739-753.

Barnes P J (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. Clinical Science, 94, 557–572.

Britton G.S, Liaaen-Jensen and H. Pfander (,1995) carotenoids today and challenges for the future .IN: Britton G.S, liaaen-jensen and H. Pfander (eds) carotenoids vol.1A: isolation and analysis. Basel: Birkhanser.

Bauernfeind, J.C., (1981). carotenoids as colorants and vitamin A. precursors. Technological and nutritional applications. New York: Academic press.

Broadhurst Richard B. and Jones William T. (1978) Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* .29(9) :788-794.

Bal J.S. 1981 a. A note on sugars and amino acids in ripe ber. *Progressive Horticulture*, 13: 41-42.

Bekir San, Adnan Nurhan Yildirim (2010) Phenolic, alpha-tocopherol, beta-carotene and fatty acid composition of four promising jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) selections. *journal of food composition and analysis*.23(7):706-710

Berlett Barbara S. and . Stadtman Earl R (1997) Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress . *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313-20316.

Burrows CJ, Muller JG.(1998) Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem Rev.* 98:1109-1152

Bown, D.,(1995). Encyclopaedia of Herbs and their Uses. Dorling Kindersley, London.

C

Clarke J.M.; Sabrena M.B.; Edward, C.; Jo Rae W. (1996) Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNF-alpha activity from LPS-stimulated macrophages; *American Journal of Physiology* ; 271: L310-L319.

Choi H Kim S., Mukhopadhyay P., Cho S., Woo J., Storz G., Ryu S. (2001) Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*. 105 (1):103-13.

Catoire C., Zwang H., Bouet C. (1999) Les jujubiers ou le *Zizyphus*, fruits oubliés n°1

Chowdary N.B., Padashetty N.S. (2000) *In vitro* screening of antibacterial activity of leaves of Ber. *Current Research - University of Agricultural Sciences (Bangalore)* 29: 78-79

Chopda M.Z. and Mahajan R.T. (2009) The wound healing plants of Jalgaon District, Maharashtra State, India. *Ethanobotanical leaflets* 13: 1-32

Cetkovic G., Canadanovic-Brunet J., Djilas S., Savatovic S., Mandic A., Tumbas V. (2008). Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry* 109:340-347

Cabrera M., Simoens M., Falchi G., LauraLavaggi M., Piro O –E., Castellano E., Vidal A., Azqueta A., Monge A., Lopez de Cerain A., Sagraera G.I., Seoane G., Cerecetto H., Gonzalez M. (2007) Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral biological evaluation and structure activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15:3356-3367

Curtay J.P., Robin J.M. (2000) Intérêt des complexes antioxydants. *Nutrition Info.* 4p

Cheng D., Zhu C., Cao J., Jiang W., (2012) The protective effects of polyphenols from jujube peel (*Ziziphus Jujube Mill*) on isoproterenol-induced myocardial ischemia and aluminum-induced oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology* 50:1302-1308

Chevalier X., Flipo R., Goupille P., Schaeffer T. (2005) Rhumatologie Eds, *Elsevier Masson* (France), pp : 340

Catelan S.C., Belentani R. M., Marques L.C., Silva E.R., Silva M. A., Caparroz-Assef S.M., Cuman R.K.N., Bersani-Amado C.A. (2006) The role of adrenal corticosteroids in the anti inflammatory effect of the whole extract of *Harpagophytum procumbens* in rats. *Phytomedicine* 13: 446-451

Ciquel-Cneva (1993) Tome 3. Table de composition des fruits exotiques, Fruits de cueillette d'Afrique Editions Lavoisier, Orstrom et Inra, p 270

Carmel Harel O., Stearman R., Gasch A.P., Botestein D., Brown P.O., Storz G. (2001) role of thioredoxine reductase in the YAP1-p dependent response to oxidative stress in *saccharomyces cereviceae*. *mol.microbiol.* 39:595-60

D

Danthu P., Hane B., Sagna P. and Gassama Y.K. (2002). Restoration of rooting competence in mature *Faidherbia albida*, a Sahelian leguminous tree, through serial root sucker micrografting. *New Forests* 24: 239–244.

Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324:1–18

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

Diallo A.M. (2005). Etude des plantes médicinales de niafunke (region Tombouctou) Phytochimie et pharmacologie de *Maerua crassifolia* Forsk (Capparidacée). Thèse de Doctorat, Université de Bamako 125p.

Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traré A., Coulibaly K., Maïga A. (2004) Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana lam* (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *C.R. Chimie*, 7 :1073-1080

Dan Y. (2008) Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 44:149-161

Dubois M. Gilles K.A. Hamilton J.K. Rebers P.A. et Smith F. (1956) Colorimetric Method for determination of Sugars and related Substances. *Analytical chemistry* 28: 350-356

Duwiejua M., Zeitlin I.J. (1993) Plants as source of anti-inflammatory substances. In: *Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals*. Harvey A L. Eds, Taylor & Francis (Royaume-Uni), pp: 153.

Dewanto V., Wu X., Adom K.K., Liu R.H. (2002) *Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. J Agric Food Chem* 50: 3010–3014

Delaunay A., Pflieger D., Barrault M.B., Vinh J., Toledano M.B. (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111(4):471-81

Dimitrov I., Kamenov V., Angelova P., Petrov M. (2014) Concentration of C-reactive protein in white adipose tissue, liver and blood serum of male Wistar rats. *Trakia Journal of Sciences*, 12: 29-33

Dombrowicz D., Capron M. (2001) Eosinophils, allergy and parasites. *Current Opinion in Immunology* 13: 716-720

Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V. (1996) Cytokines pro-inflammatoires et cellules phagocytaires. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 36 : 310-314

Descat F. (2002) *Hématologie du rat : hémogramme et myélogramme*. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 110 p.

Delille L. (2008). Les plantes médicinales d'Algérie. Edition Berti, 240p

E

Eccleston E. (1977) Normal hematological values in rats, mice and marmosets- In: Archer R.K., Jeffcott L.B.- *Comparative Clinical Hematology* - Blacwell Scientific - Chap 15, 611-617.

Etlinger H.M., Coe J.E. (1986) Complement activation by female protein, the hamster homologue of human C-reactive protein. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 81:189–91

Editorial (2005) Dual inhibition of cyclooxygénases and 5-lipoxygenase : a novel therapeutic approach to inflammation? *Revue du Rhumatisme* 72:379-382

El Kadi F.Z., Bénali A.I., Bénali M. and Belbraouet S. (2014) Effect of Sodium Metabisulphite on Blood Metabolic Status of Wistar Rats. *Food and Nutrition Sciences*, 5:1529-1537

Eiznhamer D. , Xu Z. (2004) Betulinic acid : a promising anticancer candidate. *Int Drugs* 4: 359-373

Elmahi M., Essassi E.M., Hamamouchi M. and Hamamouchi J. (1997) Study on the antimicrobial and antibilharzia activity of *Ziziphus vulgaris*. *Fitoterapia* 68: 34-36

Eley J.G., and Hossein D. (2002) Permeability enhancement activity from *Ziziphus jujuba*. *Pharmaceutical Biology*. 40:149-153

Eming S.A., Krieg T., Davidson J.M. (2007) Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 514–525.

Erdemoglu N., Küpeli E., silada E.Y. (2003) Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 123–129.

Englard S. ; Seifter S. (1990) Precipitation techniques. *Meth.Enzymol.*182 : 287-300.

ElAloui-Kefi M. (2013) Suivi de la phénologie et caractérisation morpho-chimique comparées de quatre écotypes *Ziziphus jujuba* (Miller) dans la station expérimentale de Rouhia (Tunisie) (semi-aride supérieur). Thèse de doctorat en agronomie, Laboratoire des Ressources Sylvo-Pastorales de Tabarka, Institut National agronomique de Tunisie 145p.

F

Fukuyama Y., Mizuta K., Nakagawa K., Chin W.J., and. Wa X.E. (1986) A new neolignan, a prostaglandin I₂ inducer from the leaves of *Ziziphus jujuba*. *Planta Medica*. 6: 501-502

Forkmann G., Martens S. (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current opinion in biotechnology*, 12:155-160

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

Favier A. (2003) Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. 108-115

Fauve R.M., Hevin M. (1998) Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. In: inflammation. Russo-Marie F., Peltier A., Polla B. S. Eds, John Libbey Eurotext (France) pp 10-19.

Fraser P.D., Bramley P.M. (2004) the biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. progress in lipid research 43:228-265

Fleurentin J., (1993) Ethnopharmacologie et aliments : Introduction au sujet et réflexions sur l'efficacité biologique. Actes du 2^{ème} Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11^{ème} Conférence internationale d'Ethnomédecine, Heidelberg-2, 7 mars

G

Giffen P.S., Turton J., Andrews C.M., Barrett P., Clarke C.J., Fung K.W., Munday M.R., Roman I.F., Smyth R., Walshe K., York M.J. (2003) Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch Toxicol.* 77: 392-402

Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2006) Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Jour. of pharm. and biomed. anal.* 41:1220-1234

Ganachari M.S., and Shiv K. (2004) Anti-ulcer properties of *Ziziphus jujube* Lam leaves extract in rats. *Journal of Natural Remedies* 4: 103-108

Gupta R.B., Sharma S., Sharma J.R. and Goyal R. (2004) Study on the physicochemical characters of fruits of some wild and cultivated forms/spp. (*Ziziphus spp.*). *Haryana Journal of Horticultural Sciences* 33 : 167-16

Ganachari M.S., Shiv K., and. Bhat K.G. (2004) Effect of *Ziziphus jujube* leaves extract on phagocytosis by human neutrophils. *Journal of Natural Remedies* 41: 47-51

Ghestem A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M. (2001) Le préparateur en pharmacie. Dossier 2. Editions TEC & DOC Paris.275p

Gervaise Y. (2004) Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits. Polyphénols. Paris. 33 p

Girotti-Chanu C. (2006) Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *mirotea de bilis*. Thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon. 136p

Galeotti F., Barile E., Curir P., Dolci M., Lanzotti V. (2008) Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Photochemistry Letters*, **1**: 44-48

Gueye P.M. (2007) Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg 247p.

Gülçin İlhami , Zübeyr Huyut,Mahfuz Elmastaş, Hassan Y., Aboul-Enein (2010) Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*. 3:43-53

Gao X.D., Wu P.T., Zhao X.N., Shi Y.G., Wang J.W. (2011) Estimating spatial mean soil water contents of sloping jujube orchards using temporal stability, *Agr. Water Manage.* 102: 66-73

Gilbert H.F. (1990) Molecular and cellular aspects of thioldisulfide exchange. *Adv Enzymol Relat. Areas Mol. Biol.* 63:69-172

Gasch A.P., Spellman P.T., kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G.,Botstein D., Brown P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to invironmental changes. *Mol. Boil.cell.*11:4241-4257.

Grant C.M., Maciver F.H., Dawes I.W. (1996) Stationary-phase induction of GLRI expression in mediated by the YAP1 transcriptional regulatory protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 22:739-746

González-Gallego J.M., Garcia-Mediavilla V., Sánchez-Campos S., Tunon M.J. (2010) Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition* 104: S15–S27

H

Hudina M., Liu M., Veberic R., Stampar F., Colaric M. (2008) Phenolic compounds in the fruit of different varieties of Chinese jujube (*Ziziphus jujube* Mill.) *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83:305-308

Han B.H., Park M.H. (1986) Studies on the sedative alkaloids from *Ziziphus spinosasemen* (seed). *Saengyak Hakhoechi*. 16: 233-238

Huang L.Y.W., Cai B., Li D., Liu J., Liu M. (1990) A preliminary study on the pharmacology of the compound prescription huangqin tang and its component drugs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 15: 115-128

Heo H, Park, Young J., Suh, Young M, Choi, Soo J, Kim, M Jeong, Cho, HongY, Chang Y., Hong B., Kim H., Kim E., Kim C., Kim B. and Shin D. (2003) Effects of oleamide on choline acetyltransferase and cognitive activities. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67: 23-27

Halliwell B et Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of pharmacology* 142:31-32

Hoffmann L. (2003) Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'Hydroxycinnamoyl-CoA : Shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat Université de Louis Pasteur, Strasbourg 200p

Hogan S P, Rosenberg H F, Moqbel R, Phipps S, Foster P S, Lacy P, Kay A B, Rothenberg M E (2008) Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical and Experimental Allergy*, 38: 709-750

Henzen C. (2003) Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum médical suisse*, 19: 442-446

Daniela Heimler, Pamela Vignolini, Maria Giulia Dini, Franco Francesco Vincieri, Annalisa Romani (2006) Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae edible varieties* 99:464-469

I

Ikram M., Ogihara Y., Yamasaki K. (1981) Structure of a new saponin from *Zizyphus vulgaris*. *Journal of Natural Products*, 44: 91–93

Ielpo M.T.L., Bosile A., Miranda R., Moscatiello V., Nappo C., Sorbio S., Laghi E., Ricciardi M.M., Ricciardi L., Vuotto M.L. (2000) Immunopharmacological properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 71:101-109

Imlay J.A., Linn S. (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 4857:1302-1309.

Imlay J.A., Chin S.M., Linn S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 4852:640-642.

J

Jüni P., Nartey L., Reichenbach S., Sterchi R., Dieppe P. A, M Egger (2004) Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. *Lancet* 364: 2021-2029

Jauário A. H., Santos S. L., Marcussi S., Mazzi M.V., Pietro R.C.L.R., Sato D.N., Ellena J., Sampaio S.V., França S.C., Soares A.M. (2004) Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions* 150, 243-251

Jung W.J., Sung M. (2004) Effects of major dietary antioxidants on inflammatory markers of RAW 264·7 macrophages. *Biofactors* 21:131–137

Jian-Guo Jiang, Xiao-Juan Huang, Jian Chen, Qing-Sheng Lin (2007). Natural Product Research, 21: 310-320

K

Kamiloglu Ö., Ercisli S., Engül M., Toplu C., Serçe S. (2009) Total phenolics and antioxidant activity of jujube (*Zizyphus jujube* Mill.) genotypes selected from Turkey. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (2), pp. 303-307.

Kurihara Y. (1992) Characteristics of anti sweet substances, sweet proteins and sweetness inducing proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32: 231-252

Kurihara Y., Oohubo K., Tasaki H., Kodama H., Akiyama Y., Yagi A., Halperm B. (1988). Studies on taste modifiers. I Purification and structure in leaves of *Zizyphus jujuba*. *Tetrahedron* 44:61-66

Kim D.S.H.L., Pezzuto J.M., Pisha E. (1998) Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 8: 1707-1712

Kim H.Y., and Han S.W. (1996) *Zizyphus jujube* and *Codonopsis pilosula* stimulate nitric oxide release in cultured endothelial cells and kidney tissues. In *Asia Pacific Journal of Pharmacology* 11: 26-29

King A., Young G. (1999) Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American dietetic association*, 99:213-218

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

Klein B.P., Perry A.K. (1982) Ascorbic Acid and Vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *journal of food science.* 47:941-945

Kraus A.L. Research methodology- In **Baker H.J., Lindsey J.R., Weisbroth S.H.** (1980) *The Laboratory Rat Vol 2-* Academic Press- Chap 1, 5-19

Kwon Y.I., Jung I.C., Kim S.H., Kim S.Y., and Lee J.S. (1997) Changes in properties of pitted jujube during drying and extraction. *Agr. Chem. Biotechnol.* 40: 43-47

Kudachikar V.B., Ramana K.V.R., Eiperson W.E. (2000) Pre- and post-harvest factors influencing the shelf life of ber (*Ziziphus mauritiana Lamk.*) – a review. *Indian Food Packer* January to February, 81-90

Koley T.K., Charanjit K., Shweta N., Shweta W., Seema J., Sarika (2011) Antioxidant Activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (*Zyziphus mauritiana Lamk.*) *Arabian Journal of Chemistry*.

Kassem H.A., Al-Obeed R.S., Ahmed M.A., Omar A.K.H.(2011) Productivity, Fruit Quality and Profitability of Jujube Trees Improvement by preharvest application of agro-chemicals. *Middle-East Journal of Scientific Research* 9: 628-637

Kuge S., Jones N. (1994) YAPI dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* 13:655-664

Kirkova M., Kassabova T., Russanov E. (1992) Activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation Gen. *Pharmacol.* 23: 503-507

Kim J.Y., Park S., Yun K.J. (2008) Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264·7 macrophages. *Eur J Pharmacol* 584, 175–184.

I

Laroche M.J., Rousselet F. (1990) Les animaux de laboratoire. Ethique et bonnes pratiques- Masson- Chap 7:167-187

Lin Ying Chih Hsieh, MingTsuen Chen, ChungFung Cheng, HaoYuan Peng, WenHuang (2003) Anxiolytic effect of Ting-Chih-Wan in mouse behavior models of anxiety. *American Journal of Chinese Medicine* 31: 27-30

Lee S., Min B., Lee C., Kim K., Kho Y. (2003) Cytotoxic triterpenoids from the fruits of *Zizyphus jujuba*. *Planta Medica* 69: 18-21

Li J.W., Fan L.P., Ding S.D., Ding X.L. (2007) Nutritional composition of five cultivars of Chinese jujube. *Food Chem.*, 103: 454-460

Jin-wei Li, Shao-dong Ding, Xiao-lin Ding (2005) Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube process. *Biochemistry* 40:3607-3613.

L

Liu W.K., Ho J.C.K., Cheung F.W.K., Liu B.P.L., Ye W.C. and Che C.T. (2004) Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. *European Journal of Pharmacology* 498: 71-78

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

Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L et Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193,pp.265-27.

Lindsay P. Collinson and Ian W. Dawes (1992) Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress . *Journal of General Microbiology* 138: 329-335.

Liang YC, Huang YT, Tsai SH, (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20, 1945–1952.

Laamouri A., (2009) Contribution à l'étude des jujubiers en Tunisie:Identification, caractérisation, adaptation au déficit hydrique et multiplication. Thèse de Doctorat, INAT, 272 p.

M

Morgan B.A., Banks G.R., Toone WM, Raitt D., Kuge S., Johnston L.H. (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* *EMBO J.* 16:1035-44

Munzuroglu Omer, Karatas Fikret, Geckil Hikmet (2003). The vitamin and selenium contents of apricot fruit of different varieties cultivated in different geographical regions. *food chemistry* .83(2):205-212.

Molyneux P. (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin. *J. Sci. Technol.* 26 : 211-219

Madden K., Flowers L., Salani R., Horowitz I., Logan S., Kowalski K., Xie J., Mohammed S.I. (2009) Proteomics-based approach to elucidate the mechanism of antitumor effect of curcumin in cervical cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 80, 9-18

Mahajan R.T., Chopda M.Z. (2009) Phyto-Pharmacology of *Ziziphus jujube* Mill- A plant review. *Phcog Rev* 3:320-329

Mahajan R T, Chopda M Z.(2009) Phyto-Pharmacology of *Ziziphus jujuba* Mill- A plant review. *Phcog Rev* 3:320-329

Mathy M., Sanchez C., Priem F., Henrotin Y. (2007) La curcumine inhibe la synthèse d'interleukine-6, d'interleukine-8, de monoxyde d'azote et de prostaglandine E2 par les chondrocytes bovins. *Revue du Rhumatisme* 74 : 10-11

Mukharjee P.K., Mukharjee K., Rajesh Kumar M., Pal M. and Saha B.P. (2003) Evaluation of the wound healing Activity of Some Herbal Formulations. *Phytother. Res.* 17: 265-268

Marfak A., (2003) Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoges 187 p

Marrack J.R., Richards C.B. (1971) light scattering studies of the formation aggregates in mixture of antigen and antibody. *J. immunol.* 20:1019-1040

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

Mbaveng A.T., Ngameni, Kuete V., Simo I.K., Ambassi P., Roy R., Bezabih M., Etoa F.X., Ngadjui B.T., Abegaz B.M., Meyer J.J.M., Lall N., Beng V.P. (2008) Antimicrobial activity of crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 116:483-489

Mucsi I., Pragai B.M., (1985) Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Experientia* 41: 930–931

Male D (2007). Mécanisme de l'immunité innée. In: Immunologie. Male D, Roitt Y, Brostoff J, Roth D B. Eds, Masson (France), pp: 155.

Mole S., Waterman P.G. (1987) A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies 72:148-156.

Murdock D.H., (2002) Encyclopedia of Food a Guide to Healthy Nutrition. APA Academic Press, San Diego, California, p 501

Meade E.A., Smith W.L., DeWitt D.L. (1993) Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* 268 : 661 -664.

Mitchell J.A., Akarasereenont P., Thiemermann C., Flower R.J., Vane J.R. (1993) Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90 : 11693-7

N

Nakanishi Y., Kodama H., Murai T., Mikami T., Izawa H. (1991) Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *Am J Vet Res* 52:397-401

Nantel F., Denis D., Gordon R., Northey A., Cirino M., Metters K.M . et Chan C.C. (1999) Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 128:853-859

Nawwar, M. M., Ishak, M. S., Michael, H. N., & Buddrus, J. (1984) Leaf flavonoids of *Zizyphus spina-christi*. *Phytochemistry*, 23:2110-2111

Na M., An R., Lee S., Hong N., Yoo J., Lee C., Kim J., Bae K.. (2001) Screening of crude drugs for antioxidative activity. *Korean Journal of Pharmacognosy* 32:108-115

Nzengue Y. (2008) Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Thèse de Doctorat. Université Joseph fourrier-Grenoble. 297p

Nathan C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature*, 420: 19-26.

Neve H., Heller K.J., (2002) La microflore du kéfir d'eau: un coup d'œil par microscopie électronique à balayage, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 54:337-349.

O

Oyaizu M. (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44: 307-315

Ossipov M.H., Kovelowski C.J., Porreca F. (1995) The increase in morphine antinoceptive potency produced by carrageenan-induced hindpaw inflammation is blocked by nalttrindole, a selective delta-opioid antagonist. *Neuroscience Letter* 184:173-176

P

Pareek O.P., (2001) - Fruits for the Future 2: Ber, International Centre for Underutilized Crop. Redwood Books, Wiltshire, pp 42, 38, 15, 20, 34, 45, 52-58.

Posadas I., Bucci M., Roviezzo F., Rossi A., Parente L., Sautebin L., Cirino G. (2004) Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependant and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British journal of pharmacology* 142:331-338

Prin L., Hachulla E., Hennache B., Bonnotte B., Dubucquoi S., Abbal M., Faure G., Bouletreau P. (2009) Available from: http://w3med.univlille2.fr/inflammation/documents/Immuno_1.pdf. Consulté le 01.02.2016

Plastina P., Bonofiglio D., Vizza D., Fazio A., Rovito D., Giordano C., Barone I., Catalano S., Gabriele B. (2012) Identification of bioactive constituents of *Ziziphus jujube* fruit extracts exerting antiproliferative and apoptotic effects in human breast cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology* 140: 325-32

Pareek S. (2013) Nutritional composition of jujube fruit Emir. *J. Food Agric.* 25:463-470

Peng Wen Huang, Hsieh MingTsuen, Lee YiShung, Lin YiChin and Liao Jen (2000) Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujube* in mouse models of anxiety. *Journal of Ethnopharmacology* 72:435-441

Pisha E., Chai H., Lee I., Chagwedera T., Farnsworth N., Cordell G., Beecher C., Fong H., Kinghorn A., and Brown D. (1995) Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med.* 10:1046-1051

Petit P., Granier T., Langlois d'Estaintot B., Manigand C., Bathany K., Schmitter J-M., Lauvergeat V., Hamdi S., Gallois B. (2007) Crystal Structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis. *J. Mol. Bio.* 368:1345-1357

Pinta M., Bourdou B., Rousselet F. (1980) Spectrophotométrie d'absorption atomique. Masson et Arston (Eds). Paris, 478p

Petropoulos I. (2003) Stress oxydant et vieillissement modifications oxydatives des protéines au cours du vieillissement. Diderat. Paris. 5p

Peterson J., Dwyer J., Adlercreutz H., Scalbert A., Jacques P., McCullough M.L. (2010) Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* 68:571–603

Payne D.N.R., Adcock I.M. (2001) Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Pediatric Respiratory Reviews* 2:145–150

Preeti, Tripathi. S (2014) a phytopharmacological review on “ziziphus jujube”, *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences* 3: 959-966

Peshev D., Peeva L.G., Peev G., , Baptista I.I.R., Boam A.T., (2011) Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), *Chemical Engineering Research and Design* 89:318–327

R

Ranhotra G. S., Gelroth J. A., Vetter J. L. (1996) Determination of fat in bakery products by three different techniques. *Cereal Foods World* 41:620–622

Roux D., Catier O. (2007) Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. *Wolters Kluwer France Edition* p 74

Richardson J. D., Vasko M.R. (2002) Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. *Perspectives in Pharmacology* 302:839-845

Rankin J.A. (2004) Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues* 15:3-17

Ritchie R.F. (1967) a simple direct and sensitive technique for the measurement of specific proteins in cerebrospinal fluid. *J. lab. clin. med.* 70:512-517

Russo-Marie F., Peltier A., Polla B. (1998) *L'Inflammation John Libbey Eurotext, Paris.*

Ringler D.H., Dabich L. (1979) Hematology and biochemistry In: **Baker H.J., Lindsey J.R.,** Weisbroth S.H.- *The Laboratory rat, Volume I-* Academic Press, Chap 5, 105-121

S

Izawa S., Inoue Y., Kimura A. (1995) Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae* 368:73-76.

Santos-Buelga C., Scalbert A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* .80:1094-1117

Suttisri R., Lee I.S., Kinghorn A.D. (1995) Plant-derived triterpenoid sweetness inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology* 47:9-26

Smith V.V., Halpern B.P. (1983) Selective suppression of judged sweetness by ziziphins. *Physiol Behav* 30 : 867-874

Sarfaraz A., Ansari S. H. and Porchezian E. (2002) Antifungal activity of alcoholic extracts of *Ziziphus vulgaris* and *Acacia concinna*. *Hamdard Medicus*. Bait al-Hikmah, Karachi, Pakistan. 14/15: 42-45

Shiv K., Ganachari M.S, Banappa Nagoor V.S. (2004) Anti-inflammatory activity of *Ziziphus jujube* Lamk. Leaves extract in rats. *Journal of Natural Remedies* 4:183-185

Su B.N.C.M., Farnsworth N.R., Fong H.H., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. (2002) Activity-guided fractionation of the seeds of *Ziziphus jujube* using a cyclooxygenase-2 inhibitory assay. *Planta Med.* 68: 1125-1128

Siegel J., Rent R., Gewurz H. (1974) Interactions of C-reactive protein with the complement system. I. Protamine-induced consumption of complement in acute phase sera. *J Exp Med.*140:631-47

Seong H. K., Seong W. C., Sang K. Y., Angho S. Y., H. S. Kim and M. H.Chung (2008) Comparison of anti-oxidant activities of seventy herbs that have been used in Korean traditional medicine. *Nutrition Research and Practice* 2: 143-151

Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A-R., Simonic M., Knez Z (2005) Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry* 89:191-198

Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F. (1995) Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes. *Free radical biology & medicine* 19 :481-486

Sokol-Letowska A., Oszmianski J., Wojdylo A. (2007) Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn pine and skullcap. *Food chemistry* 103:853-859

Sevanian A., Nordenbrand K., Kim E., Ernester L., Hochstein P. (1990) Microsomal lipid peroxidation : The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radic Biol Med* 8: 145-152

Souley A.B. (2004) Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr. ex DC (Combretaceae). Thèse de Doctorat .Université de Bamako Mali

Siddhuraju P. (2007) Antioxydant activity of polyphenolic compounds axtracted from defatted raw and dry heated Tamarindus indica seed coat. *LWT* 40:982-990

Schoroderet M. (1992 Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Volume 2. Eds, *Office des publications universitaires* (Alger), pp : 523-530

Schiler N.J., Singh S.M. (1989) effect of ethanol in vivo on enzymes which detoxify oxygen free radicals. *free radic. Boil. Med.* 7:117-123

Steinhubl S.R. (2007) Platelets as Mediators of Inflammation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 21:115-121

Setty A.R., Sigal L.H. (2005) Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34: 773-784

Suttisri R., Soo Li, Kinghorn A.D. (1995) plant derived triterpenoid sweetness inhibitors. *j.ethnopharm.* 47:9-26

Shou C., Feng Z, Wang J., Zheng X. (2002) the inhibitory effects of jujuboside A on rat hippocampus in vivo and in vitro 68:799-803

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., (1999) Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178

Singleton V.L., Rossi Joseph A.Jr. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. j. enol. vitic.* 16:144-158

Schofield P., Mbugua D.M., Pell A.N. (2001) analysis of condensed tannins a review. *Anim. feed. sci. tech.* 91:21-40

Sun M., Larivière L., Dengl S., Mayer A., Cramer P. (2010) A tandem SH2 domain in transcription elongation factor Spt6 binds the phosphorylated RNA polymerase II C-terminal repeat domain (CTD). *J. Biol. Chem.* 285:41597-41603

Shrive A.K., Metcalfe A.M., Cartwright J.R., Greenhough T.J. (1999) C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in *Limulus polyphemus* haemolymph: crystal structure of Limulus SAP. *J Mol Biol.* 290:997–1008

Shen S.C., Lee W.R., Lin H.Y. (2002) In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide- induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur J Pharmacol* 446: 187-194

Saif M.W., Lansigan F., Ruta S., Lamb L., Mezes M., Elligers K., Grant N., Jiang Z.L., Liu S.H., Cheng Y.-C., (2010) Phase I study of the botanical formulation PHY 906 with capecitabine in advanced pancreatic and other gastrointestinal malignancies. *Phytomedicine* 17: 161–169

Smith G.H., Mc Clure R.D., Stetson P.B., Hesser J.E., Bell R.A. (1986) *Astron J.* 91-842

T

Talukdar M.D., Imdad Shahinur Rahman S.k., Akhtaruzzamanand M.Md. Abdus Samad (2014) A Comparative Study on the Nutritional Quality of 5 (five) Varieties of Bangladeshi Jujubes (*Zizyphus Mauritiana*). *American Journal of Nutrition and Food Science* 1 :32-36

Tapiero H., Tew K.D., Nguyen Ba G., Mathé G. (2002) Polyphenol: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother* 56:200-207

Tonelli N., Gallouin F. (2013) Des fruits et des graines comestibles du monde entier Éditions Tec et Doc / Lavoisier. 726 p

Traore K., Sharma R., Rajesh K. Thimmulappa, Walter H. Watson, Shyam Biswa L., Michael A. Trush (2008) Redox-Regulation of ERK 1/2-Directed Phosphatase by Reactive Oxygen Species. *J. Cell. Physiol.* 216:276-285

Toledano MB, Delauney A ,Monseau L, Tacnet F .(2004) microbial H₂O₂sensors as archetypicalredox signaling modules . *trends biochem sci* .29:351-357.

V

Vonkeman H.E., Laar M.A.V. (2008) Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Seminars in arthritis and rheumatism* 10: 10-16.

Vergne P., Bertin P., Trèves R. (2000). Aspirine, douleurs et inflammation. *Rev. Méd. Interne*, 21: 89-96.

W

Weiss J., Taylor G.R., Zimmermann F., Nebendahl K. (2000) Collection of body fluids- In: KRINKE,G.J.- *The laboratory Rat, The handbook of experimental Animal*-Academic press-, Chap 25, 485-495.

Weill B., Batteux F., Dhainaut J. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), pp: 12-23.

Williams C.M.M., Galli S.J. (2000) The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 105:847-59

Wallace M., Staats P.S. (2004) Pain medicine and management: just the facts. *McGraw-Hill (New York)*, p48

Weir M.R., Sperling R.S., Reicin A., Gertz B.J. (2003) Selective COX-2 inhibition and cardiovascular effects: A review of the rofecoxib development program. *American Heart Journal* 146:591-604

Wolbink G.J., Brouwer M.C., Buysmann S., Ten Berge I.J., Hack C.E. (1996) CRP-mediated activation of complement *in vivo*: assessment by measuring circulating complement–C-reactive protein complexes. *J Immunol.* 157:473-479

Wiert C. (2006) Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific. *Eds, Humana Press (Totowa)*, pp 1-20

Wang Mingfu, Li Jiangang, Rangarajan Meera, Shao Yu, LaVoie Edmond J., Huang Tzou-Chi, Ho Chi-Tang (1998) Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4869-4873

Weill B., Batteux F. (2003) Immunopathologie et réaction inflammatoire. Bruxelles: De Boeck 310 p

Wood A., Schneider J., Dover J., Johnston M., Shilatifard A. (2003) The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *J. Biol. Chem.* 278:34739-42

Y

Yoo K-M., Lee C-H., Lee H., Moon B.K., Lee C.Y. (2008) Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food chemistry* 106:929-936

Yue-Horng Yen, Chia-Ho Shih, Ching-Hui Chang (2008) Effect of adding ascorbic acid and glucose on the antioxidative properties during storage of dried carrot. *Food chemistry*.107:265-272

Yang, S. , Arasu, M. , Chun, J. , Jang, Y. , Lee, Y. , Kim, I. , Lee, K. , Hong, S. and Kim, S. (2015) Identification and Determination of Phenolic Compounds in Rapeseed Meals (*Brassica napus* L.). *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 4:14-23

Yolanda Y.P., Jiménez F.E., Zamilpa A., Hernandez V.M., Francisco J.A.A., Tortoriello J. (2007) effect of polyphenol rich extract from Aloe vera gel on experimentally induced insulin resistance in mice. *The American journal of Chinese medicine* 35:1037-1046

Z

Zhang H., jiang L., Ye S., Ye Y., Ren F. (2009) Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) from China. *Food and Chemical Toxicology*, 48:1461-1465

Zhishen Jia, Mengcheng Tang, Jianming Wu (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry* 64:555-559

Zhang Qiong, Zhou, Guang-fang, Shen Guang-ning, Zhu En-yuan, Wang Hong-qing (2010) the Flavonoids in the Fruit Peel of *Ziziphus jujuba* Mill. 'Dongzao' During Coloring Process. *Acta Horticulturae Sinica* 2, 006

Zheng B., Wu J.N., Schober W., Lewis D.E., Vida T. (1998) Isolation of yeast mutants defective for localization of vacuolar vital dyes. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* 95:11721-6

Zheng M., X. Wang L.J. Templeton D.R. Smulski R.A. LaRossa G. Storz (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J.Bacteriol* 183:4562-45