



HAL
open science

**Étude phytochimique des extraits de deux
Euphorbiaceae : Ricinus communis et Jatropha curcas.
Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur
action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase**

Wafa Ghnimi

► **To cite this version:**

Wafa Ghnimi. Étude phytochimique des extraits de deux Euphorbiaceae : Ricinus communis et Jatropha curcas. Évaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acétylcholinestérase. Autre. Université de Lorraine, 2015. Français. NNT : 2015LORR0006 . tel-01751291

HAL Id: tel-01751291

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751291v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



LCP-A2MC
Laboratoire de Chimie et Physique
Approche Multi-échelles des Milieux Complexes



THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE :

UNIVERSITE DE LORRAINE (FRANCE) ET UNIVERSITE DE CARTHAGE (TUNISIE)

Présentée par

Wafa GHNIMI

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE ET DE LA FACULTE DES SCIENCES DE
BIZERTE**

Domaine :

CHIMIE / BIOLOGIE

**Etude phytochimique des extraits de deux
Euphorbiacées: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*.
Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de
leur action inhibitrice sur l'activité de
l'acétylcholinestérase**

Thèse présentée et soutenue à Bizerte le 5 Janvier 2015 devant le jury composé de :

Hassan Rammal
Mossadok Ben Attia
Héla El Ferchichi Ouarda
Elie Baudelaire
Amadou Dicko
Mohamed Larbi Khouja

Professeur (Université Libanaise)
Professeur (Faculté des Sciences de Bizerte)
Maître de conférences (Faculté des Sciences de Bizerte)
Docteur ingénieur (AGRITECH France)
Professeur (Université de Lorraine)
Professeur (INERGREF Tunisie)

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Co-Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse

**Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées:
Ricinus communis et *Jatropha curcas*. Evaluation de leur
propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur
l'activité de l'acétylcholinestérase**

Wafa GHNIMI

Je dédie cette thèse,

A mes parents, aux êtres qui me sont les plus chers dans ce monde, qui ont fait des sacrifices immenses pour moi et pour mes frères sans qu'ils attendent en retour. Tout au long de ces dernières années j'étais loin de chez eux mais ils ont été toujours présents dans mon âme et mon cœur.

A mon mari Adnen qui, malgré la distance, m'a toujours soutenu et encouragé. Je te remercie pour ta grande patience.

A mes deux frères Alaa et Wahbi que j'aime énormément.

A tous mes amis à Metz et à Tunis, merci pour les agréables moments qu'on a passé ensemble. Je vous aime tous.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Mr. Amadou Dicko**, co-directeur de cette thèse, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de la confiance qu'il m'a accordé et aussi pour son encadrement, sa sympathie, sa rigueur scientifique, ses conseils et ses encouragements.

J'exprime mes sincères remerciements à **Mr. Mohamed Larbi Khouja**, co-directeur de cette thèse, avec lequel j'ai travaillé depuis un bon moment, pour m'avoir guidé pendant toutes ces années ainsi que pour sa gentillesse, sa disponibilité et la qualité de ses conseils.

Mes remerciements vont également à **Mme Héra El Farchichi Ouarda**, qui m'a beaucoup aidé tant qu'encadrante en mastère et grâce à qui j'ai acquis une bonne formation. Je la remercie pour sa vision toujours rassurante et optimiste, pour ses judicieux conseils, et pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de ma thèse.

J'exprime ma vive gratitude à **M. Mossadok Ben Attia** d'avoir accepté d'évaluer les travaux de ma thèse et de faire partie de jury.

Je remercie également **M. Hassan Rammal** d'avoir accepté de juger mon travail. Je suis très honorée de sa présence.

Je remercie **M. Elie Baudelaire** pour sa participation à mon jury de thèse.

Enfin, mes remerciements s'adressent également au ministère de l'enseignement supérieur en Tunisie pour m'avoir accordé une bourse d'étude, sans la quelle je n'aurai pas réussi à mener mes travaux de recherche.

RESUME

Ce travail de recherche est centré sur la valorisation de deux Euphorbiacées : *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. La première est une espèce autochtone connue comme plante dont l'huile des graines est utilisée pour ses vertus cosmétiques quant à la deuxième, c'est une espèce allochtone récemment introduite à titre expérimental en Tunisie et connue comme plante bioénergétique. Pour le ricin huit populations Tunisiennes ont été étudiées: Riadh Andalous, Nefza, Béja, Nabeul, Hammamet, Bouficha, Khanguet Hajej et Aouled Amer. Quant au jatropha, le matériel végétal est récolté dans la station expérimentale de Nabeul (Tunisie). Il s'agit de huit populations qui proviennent d'Arusha en Tanzanie, de Mozambique, de Suriname et de Brésil à partir de cinq provenances à savoir : Paranà, Norte de Minas, Mato Grosso, Regiao sudeste et Vale do Jequitinhonha. Le travail comprend une première partie consacrée à une étude bibliographique. Une deuxième partie est consacrée aux matériels et méthodes utilisés et une dernière partie qui montre l'ensemble des résultats obtenues. Ainsi, les résultats montrent que les extraits des feuilles des populations des deux espèces étudiées sont plus riches en composés phénoliques que les extraits des racines. L'étude phytochimique a montré que le ricin contient surtout de l'acide gentisique. Quant au jatropha, il contient surtout de l'épicatchine et de la naringine. L'étude chimique des huiles fixes des deux espèces montrent que l'huile de ricin renferme essentiellement d'acide ricinoléique. Quant à l'huile de jatropha, elle contient deux acides gras en proportions majeures qui sont l'acide oléique et l'acide linoléique. L'évaluation des activités anti-oxydantes des extraits des deux espèces indique une corrélation positive entre ces activités et les teneurs en composés phénoliques. Par ailleurs, l'étude de l'activité anti-acétylcholinestérase des extraits testés montrent que ces extraits sont des inhibiteurs de l'AChE plus puissants que la galanthamine utilisée comme contrôle positif. Notre étude a confirmé que les différents extraits de ricin et de jatropha, autres que les huiles fixes, peuvent

donc être exploités pour d'autres activités biologiques, parmi les quelles l'action inhibitrice de l'AChE une des principales cibles des traitements contre la maladie l'Alzheimer et le piégeage des radicaux libres, en raison de leur richesse en composés phénoliques.

Mots clés : composés phénoliques, polyphénols, flavonoïdes, antioxydant, DPPH, ABTS, anti-acétylcholinestérase.

ABSTRACT

The aim of this study is to promote two Euphorbiaceae plants the *Ricinus communis* and the *Jatropha curcas*, the first one is known for its oil used in the cosmetic products, whereas the second one is known especially for its seeds used in the production of biodiesel. For the castor plant, eight Tunisian populations are studied: Riadh Andalous, Nefza, Beja, Nabeul, Hammamet, Bouficha, Khanguet Hajej and Aouled Amer. For the jatropha, recently introduced in Tunisia, the plant material is collected from the Nabeul station (Tunisia). Eight populations coming from Arusha in Tanzania, Mozambique, Suriname and Brazil from regions of Paraná, Minas Norte, Mato Grosso, Regiao sudeste and Vale do Jequitinhonha are studied. In first, a bibliographic study is made. In second, the used materials and methods are cited. Finally, all the results are mentioned. The study shows that the phenolic compounds are higher in the leaves extracts than in the roots extracts for both species. The phytochemical study shows that the gentisic acid is the major phenolic compound identified in the castor plant extracts. In contrast, the epicatechin and the naringin are the most important phenolic compounds identified in the jatropha extracts. The GC-MS analysis reveals that the castor oil contains mainly the ricinoleic acid. For the jatropha oil, two major fatty acids are identified: the oleic and the linoleic acids. Results of the antioxidant properties of leaves and roots of both species indicate a positive correlation between the leaves and the roots activities and their contents of phenolic compounds. Furthermore, the anti-acetylcholinesterase activity of the tested extracts shows for the first time that some tested extracts are more active than the galantamine used as a positive control. Our study confirmed that, in addition to their oils, different extracts of the castor plant and the jatropha can be used for biological activities such as the scavenging free radicals and the inhibitory action of AChE enzyme, which is a major target for treatments against the Alzheimer's disease due to their high levels of phenolic compounds. Owing to the activities of the leaves and the roots extracts confirmed by this

study, the agricultural exploitation of the castor plant and the jatropha can be economically more profitable.

Keywords: phenolic compounds, polyphenols, flavonoids, antioxidant, DPPH, ABTS, anti-acetylcholinesterase.

Table de matières

INTRODUCTION.....	1
1^{ERE} PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
CHAPITRE I: ETUDE ETHNOBOTANIQUE DES ESPECES	6
I- Le ricin : Ricinus communis L.....	6
I-1 Taxonomie du ricin	6
I-2 Nomenclature	6
I-3 Description botanique du taxon.....	6
I-3-1 La floraison	7
I-3-2 Les fruits et les graines	8
I-4 Distribution biogéographique de l'espèce	9
I-4-1 Répartition mondiale.....	9
I-4-2 Répartition en Tunisie	9
I-5 Exigences écologiques du taxon	10
I-5-1 Exigences climatiques.....	10
I-5-2 Exigences édaphiques	10
I-6 La phénologie	10
I-7 Utilisation du ricin	12
I-7-1 Utilisation industrielle.....	12
I-7-2 Utilisation médicinale	12
I-8 Etude phytochimique de ricin.....	14
II- Le jatropha : Jatropha curcas L.....	15
II-1 Taxonomie du jatropha	15
II-2 Nomenclature.....	16
II-3 Description botanique du taxon	16
II-3-1 La floraison.....	17
II- 3-2 Les fruits et les graines.....	18
II-4 Distribution biogéographique de l'espèce.....	18
II-4-1 Répartition mondiale	18
II-4-2 Répartition en Tunisie.....	19
II-5 Exigences écologiques du taxon.....	19
II-5-1 Exigences climatiques	19
II-5-2 Exigences édaphiques	19
II-6 La phénologie.....	20
II-7 Utilisation du jatropha.....	20
II-8 Les activités biologiques du jatropha	21
II-9 Etude phytochimique du jatropha.....	23
CHAPITRE II: ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	26
I- Définition des composés phénoliques	26
II- Classification	27
II-1 Les non flavonoïdes	27
II-1-1 Les acides phénoliques	27
II-1-2 Les stilbenes Hydroxylés	28
II-1-3 Les coumarines.....	28
II-1-4 Les lignines et les lignanes.....	29
II-2 Les flavonoïdes.....	31
II-2-1 Biosynthèse des flavonoïdes	31
II-2-2 Classification	32

➤	Les flavones.....	33
➤	Les flavanes.....	33
➤	Les flavanones	33
➤	Les flavonols	33
➤	Les anthocyanes.....	36
➤	Les isoflavonoïdes.....	37
➤	Les chalcones et les auronnes	38
➤	Les Xanthonnes.....	40
➤	Les tannins.....	40
III-	Activités biologiques des polyphénols	43
	CHAPITRE III: METHODES D'ANALYSE PHYSICO-CHIMIQUES	46
I-	Etude par spectrophotométrie (UV-visible).....	46
I-1	Principe.....	46
I-2	Appareillage.....	47
I-3	Analyses qualitatives	47
I-4	Analyses quantitatives	48
I-5	Mesures cinétiques	48
II-	Etude par chromatographie.....	49
II-1	Définition	49
II-2	Principe	49
II-3	La chromatographie liquide haute performance (HPLC).....	49
II-3-1	Appareillage.....	50
II-3-2	Analyses	51
II-4	La chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS)	52
II-4-1	Appareillage.....	52
II-4-2	Analyses	53
	2^{EME} PARTIE: MATERIELS ET METHODES	54
I-	Echantillonnage.....	55
I-1	Partie expérimentale.....	55
I-1-1	Ricinus communis L.	55
I-1-2	Jatropha curcas L.	55
I-2	Matériel végétal	57
I-2-1	Les feuilles.....	57
I-2-2	Les racines.....	57
I-2-3	Les graines	58
II-	Dosages des composés phénoliques.....	58
II-1	Réactifs chimiques	58
II-2	Préparation des extraits	59
II-3	Dosage des polyphénols totaux (PPT).....	59
II-3-1	Méthode utilisée pour doser les PPT.....	59
II-3-2	Mesures	60
II-4	Détermination des flavonoïdes totaux (FVT).....	61
II-4-1	Méthode utilisée pour doser les FVT	61
II-4-2	Mesures	62
II-5	Dosage des tannins condensés (TC).....	62
II-5-1	Méthode utilisée pour doser les TC.....	62
II-5-2	Mesures	63
III-	Identification des composés phénoliques	64
III-1	Réactifs chimiques.....	64
III-2	Gradient d'éluion	64
III-3	Préparation des extraits	65

<i>IV-</i>	<i>Etude de la composition chimique des huiles</i>	66
<i>IV-1</i>	<i>Préparation des extraits</i>	66
<i>IV-2</i>	<i>Transestérification</i>	67
<i>V-</i>	<i>Etude des activités anti-oxydantes</i>	67
<i>V-1</i>	<i>Evaluation de l'activité anti-oxydante par deux tests DPPH et ABTS</i>	67
<i>V-1-1</i>	<i>Principe du test DPPH</i>	68
<i>V-1-2</i>	<i>Principe du test ABTS</i>	68
<i>V-2</i>	<i>Méthodes utilisées</i>	69
<i>V-2-1</i>	<i>Test DPPH</i>	69
<i>V-2-2</i>	<i>Test ABTS</i>	71
<i>VI-</i>	<i>Etude de l'activité anti-acétylcholinestérase (anti-AChE)</i>	73
<i>VI-1</i>	<i>Méthode utilisée</i>	73
<i>VI-1-1</i>	<i>Principe du test d'Ellman</i>	73
<i>VI-1-2</i>	<i>Démarche expérimentale</i>	74
<i>VII-</i>	<i>Analyses statistiques</i>	74
3^{EME}	PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSIONS	75
	CHAPITRE I: DOSAGES DES COMPOSES PHENOLIQUES	76
<i>I-</i>	<i>Dosage des polyphénols totaux (PPT)</i>	76
<i>I-1-</i>	<i>Le ricin</i>	76
<i>I-2</i>	<i>Le jatropa</i>	77
<i>II-</i>	<i>Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)</i>	78
<i>II-1</i>	<i>Le ricin</i>	78
<i>II-2</i>	<i>Le jatropa</i>	79
<i>III-</i>	<i>Dosage des tannins condensés (TC)</i>	80
<i>III-1</i>	<i>Le ricin</i>	80
<i>III-2</i>	<i>Le jatropa</i>	81
<i>IV-</i>	<i>Analyses statistiques</i>	81
<i>V-</i>	<i>Conclusion</i>	82
	CHAPITRE II: IDENTIFICATION DES COMPOSES PHENOLIQUES	83
<i>I-</i>	<i>Analyses des extraits de ricin</i>	83
<i>I-1</i>	<i>Chromatogrammes des étalons</i>	83
<i>I-2</i>	<i>Analyse des extraits de ricin</i>	84
<i>II-</i>	<i>Analyses des extraits de jatropa</i>	89
<i>II-1</i>	<i>Chromatogrammes des étalons</i>	89
<i>II-2</i>	<i>Analyse des extraits de jatropa</i>	91
<i>III-</i>	<i>Analyses statistiques</i>	94
<i>IV-</i>	<i>Conclusion</i>	94
	CHAPITRE III: ETUDE DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES FIXES	95
<i>I-</i>	<i>Etude des huiles fixes de ricin</i>	95
<i>II-</i>	<i>Etude des huiles fixes de jatropa</i>	103
<i>III-</i>	<i>Conclusion</i>	106
	CHAPITRE IV: ETUDE DES ACTIVITES ANTI-OXYDANTES	109
<i>I-</i>	<i>Résultats du test DPPH</i>	109
<i>I-1</i>	<i>Le ricin</i>	109
<i>I-1-1</i>	<i>Etude des activités anti-oxydantes des extraits des feuilles et des racines de ricin</i>	109
<i>I-1-2</i>	<i>Etude des activités anti-oxydantes des huiles de ricin</i>	110
<i>I-1-3</i>	<i>Analyses statistiques</i>	111
<i>I-2</i>	<i>Le jatropa</i>	111
<i>I-2-1</i>	<i>Etude des activités anti-oxydantes des extraits des feuilles et des racines de jatropa</i>	111
<i>I-2-2</i>	<i>Etude des activités anti-oxydantes des huiles de jatropa</i>	113
<i>I-2-3</i>	<i>Analyses statistiques</i>	114

II-	Résultats du test ABTS	114
II-1	Etude des activités anti-oxydantes des extraits des feuilles et des racines de ricin.....	114
II-2	Etude des activités anti-oxydantes des différents extraits de jatropha	115
II-3	Analyses statistiques	116
III-	Etude des relations entre teneurs en composés phénoliques et activités anti-oxydantes (AAO)....	116
III-1	Corrélations entre teneurs en CP et les AAO des extraits de ricin	117
III-1-1	Feuilles.....	117
III-1-2	Racines	118
III-2	Corrélation entre teneurs en CP et AAO des extraits de jatropha.....	120
III-2-1	Feuilles.....	120
III-2	Racines	121
IV-	Conclusion	123
	CHAPITRE V: ETUDE DES ACTIVITES ANTI-ACETYLCHOLINESTERASE.....	124
I-	La maladie d'Alzheimer	124
II-	L'activité anti-acétylcholinestérase (anti-AChE)	124
III-	Résultats des activités anti-AChE des deux espèces	130
III-1	Activités anti-AChE des extraits de ricin.....	130
III-2	Activités anti-AChE des extraits de jatropha.....	131
IV-	Analyses statistiques	133
V-	Conclusion	133
	CONCLUSION GENERALE	135
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	139
	ANNEXE I	158
	ANNEXE II.....	191

Liste des abréviations

AA: Aouled Amer
AAO : Activité anti-oxydante
AChE : Acetylcholinestérase
ALT : Alanine aminotransférase
ABTS : Sel d'ammonium de l'acide 2, 2' - azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
B: Béja
Bf: Bouficha
CP : Composés phénoliques
DPPH : 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle
EC/g Ms: Equivalant catéchine par gramme de matière sèche
EGa/g Ms: Equivalent acide gallique par gramme de matière sèche
ERO : espèces réactives de l'oxygène
EVC/g MS : Equivalent vitamine C par gramme de matière sèche
FVT : Flavonides totaux
GC- MS: Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse
H: Hammamet
HPLC : La chromatographie liquide haute performance
KH: Khanguet Hajej
MA : Maladie d'Alzheimer
N : Nefza
Nb : Nabeul
P1: Arusha Tanzanie
P2: Mozambique
P3: Parana Brésil
P4: Norte de Minas Brésil
P5: Mato Grosso Brésil
P6: Regiao sudeste Brésil
P7: Vale do Jequitinhonha Brésil
P8: Suriname
PPT : Polyphénols totaux
RA : Riadh Andalous
RP-HPLC: Chromatographie liquide haute performance en phase inverse
TC : Tannins condensés
T_R : Temps de rétention

Liste des tableaux

Tableau 1. Données sur les sites d'échantillonnage du ricin.	56
Tableau 2. Données sur l'origine géographique des provenances de jatropha.	57
Tableau 3. Profil du gradient utilisé pour l'analyse HPLC des extraits de ricin.	65
Tableau 4. Profil du gradient utilisé pour l'analyse HPLC des extraits de jatropha.	65
Tableau 5. Analyse quantitative et qualitative des extraits des feuilles de huit populations de ricin. ...	87
Tableau 6. Analyse quantitative et qualitative des extraits des racines de huit populations de ricin. ...	88
Tableau 7. Analyse quantitative et qualitative des extraits des feuilles de huit populations de jatropha.	93
Tableau 8. Analyse quantitative et qualitative des extraits des racines de huit populations de jatropha.	93
Tableau 9. Pourcentages des aires des pics correspondants à l'ester méthylé d'acide ricinoléique et à la macrolactone présentés par le chromatogramme enregistré par la GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet en fonction du temps.	97
Tableau 10. Analyse quantitative et qualitative des huiles fixes de huit populations de ricin.	102
Tableau 11. Analyse quantitative et qualitative des huiles fixes de huit populations de jatropha.	108
Tableau 12. Activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de huit populations de ricin.	110
Tableau 13. Activité anti-oxydante des huiles de huit populations de ricin.	111
Tableau 14. Activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de huit populations de jatropha.	113
Tableau 15. Activité anti-oxydante des huiles de huit populations de jatropha.	113
Tableau 16. Activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de huit populations de ricin.	115
Tableau 17. Activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de huit populations de jatropha.	116
Tableau 18. Activités anti-AChE des différents extraits testés de huit populations de ricin.	131
Tableau 19. Activités anti-AChE des différents extraits testés de huit populations de jatropha.	133

Liste des figures

Figure 1. Morphologie des feuilles de ricin	7
Figure 2. Inflorescence en panicule terminal chez le ricin ; Fleurs femelles apicales et fleurs mâle basales.	7
Figure 3. Structure du fruit triloculaire.....	8
Figure 4. Graine entière avec sa caroncule au sommet.	9
Figure 5. Les différents composants de la graine de ricin	11
Figure 6. Schéma explicatif de la classification de <i>Jatropha curcas</i> L.	16
Figure 7. Les différentes parties de la plante du jatropha	17
Figure 8. La répartition mondiale de jatropha	18
Figure 9. Phorbol esters présents dans l'huile de jatropha	24
Figure 10. Structure chimique des deoxypreussomerins isolés à partir de la tige du jatropha	25
Figure 11. Structure d'unité de base des polyphénols.	26
Figure 12. Hydroxylation d'acide benzoïque.	27
Figure 13. Hydroxylation d'acide cinnamique.	28
Figure 14. Structure du resvératrol.....	28
Figure 15. Formation d'une coumarine.	29
Figure 16. Structure des lignanes.	30
Figure 17. Structure de la lignine.	30
Figure 18. Structure de base des flavonoïdes.	31
Figure 19. Schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes.	32
Figure 20. Structure de quelques flavonoïdes.	34
Figure 21. Exemples des Flavonoïdes.	35
Figure 22. Structure de quelques anthocyanes et leur identification dans la nature	36
Figure 23. Structure des isoflavonoïdes.	38
Figure 24. Structure de base des chalcones et des aurones.	39
Figure 25. Structure des quelques chalcones.....	39
Figure 26. Structure d'un aurone.....	39
Figure 27. Schéma de biosynthèse des xanthones.....	40
Figure 28. Structure de quelques tannins hydrolysables.	41
Figure 29. Structure de quelques tannins condensés.	42
Figure 30. Répartition de différentes populations de ricin étudiées sur la carte de la Tunisie.	56
Figure 31. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.	60
Figure 32. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.	62
Figure 33. Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins totaux.	63
Figure 34. Schéma simplifié de la réaction de transestérification.....	67
Figure 35. Mécanisme d'action de DPPH.	68
Figure 36. Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H [•]	69
Figure 37. Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de vitamine C dans une solution méthanolique de DPPH.....	71
Figure 38. Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de vitamine C dans une solution toluène-méthanol de DPPH.	71
Figure 39. Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de vitamine C dans une solution ABTS.	72

Figure 40. Réaction colorimétrique d'Ellman.	73
Figure 41. Composition en PPT des extraits des feuilles et des racines de huit populations de ricin. ..	76
Figure 42. Composition en PPT des extraits des feuilles et des racines de huit populations de jatropha.	77
Figure 43. Composition en FVT des extraits des feuilles et des racines de huit populations de ricin. .	78
Figure 44. Composition en FVT des extraits des feuilles et des racines de huit populations de jatropha.	79
Figure 45. Composition en TC des extraits des feuilles et des racines de huit populations de ricin.	80
Figure 46. Composition en TC des extraits des feuilles et des racines de huit populations de jatropha.	81
Figure 47. Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 280 nm.	83
Figure 48. Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 320 nm.	84
Figure 49. Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 280 nm.	89
Figure 50. Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 320 nm.	90
Figure 51. Profil du chromatogramme de la vitexine à 280 nm.	90
Figure 52. Profil du chromatogramme de la vitexine à 320 nm.	91
Figure 53. Schéma simplifié de la formation de macrolactone.	95
Figure 54. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet après 1 minute.	96
Figure 55. Spectre de masse de la macrolactone (13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one).	96
Figure 56. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet après 30 minutes.	96
Figure 57. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet après 1 heure.	97
Figure 58. Spectre de masse de l'ester méthylique d'acide ricinoléique.	97
Figure 59. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Béja.	99
Figure 60. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Nabeul.	99
Figure 61. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Khanguet Hajej.	100
Figure 62. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Riadh Andalous.	100
Figure 63. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Nefza.	100
Figure 64. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Bouficha.	101
Figure 65. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Aouled Amer.	101
Figure 66. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet. ...	101
Figure 67. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P1.	104
Figure 68. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P2.	104
Figure 69. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P3.	105
Figure 70. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P4.	105
Figure 71. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P5.	105
Figure 72. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P6.	106
Figure 73. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P7.	106
Figure 74. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P8.	106
Figure 75. Relation entre AAO (DPPH) et teneurs en composés phénoliques des extraits de feuilles des populations de ricin.	117

Figure 76. Relation entre AAO (ABTS) et teneurs en composés phénoliques des extraits de feuilles de huit populations de ricin.	118
Figure 77. Relation entre AAO (DPPH) et teneurs en composés phénoliques des extraits de racines des populations de ricin.	119
Figure 78. Relation entre AAO (ABTS) et teneurs en composés phénoliques des extraits de racines de huit populations de ricin.	119
Figure 79. Relation entre AAO (DPPH) et teneurs en composés phénoliques des extraits des feuilles de huit populations de jatropha.	120
Figure 80. Relation entre AAO (ABTS) et teneurs en composés phénoliques des extraits des feuilles de huit populations de jatropha.	121
Figure 81. Relation entre AAO (DPPH) et teneurs en composés phénoliques des extraits des racines de huit populations de jatropha.	122
Figure 82. Relation entre AAO (ABTS) et teneurs en composés phénoliques des extraits des racines de huit populations de jatropha.	122
Figure 83. Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique.	125
Figure 84. Schéma de quelques inhibiteurs connus d'AChE.	127
Figure 85. Structure de la galantamine.	128
Figure 86. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population AA de ricin à 280 nm.	159
Figure 87. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population AA de ricin à 320 nm.	159
Figure 88. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population AA de ricin à 280 nm.	160
Figure 89. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population AA de ricin à 320 nm.	160
Figure 90. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population Bf de ricin à 280 nm.	161
Figure 91. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population Bf de ricin à 320 nm.	161
Figure 92. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population Bf de ricin à 280 nm.	162
Figure 93. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population Bf de ricin à 320 nm.	162
Figure 94. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population H de ricin à 280 nm.	163
Figure 95. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population H de ricin à 320 nm.	163
Figure 96. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population H de ricin à 280 nm.	164
Figure 97. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population H de ricin à 320 nm.	164
Figure 98. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population B de ricin à 280 nm.	165
Figure 99. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population B de ricin à 320 nm.	165
Figure 100. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population B de ricin à 280 nm.	166
Figure 101. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population B de ricin à 320 nm.	166
Figure 102. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population KH de ricin à 280 nm.	167
Figure 103. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population KH de ricin à 320 nm.	167
Figure 104. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population KH de ricin à 280 nm.	168
Figure 105. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population KH de ricin à 320 nm.	168
Figure 106. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population Nb de ricin à 280 nm.	169
Figure 107. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population Nb de ricin à 320 nm.	169
Figure 108. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population Nb de ricin à 280 nm.	170
Figure 109. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population Nb de ricin à 280 nm.	170
Figure 110. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population N de ricin à 280 nm.	171
Figure 111. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population N de ricin à 320 nm.	171
Figure 112. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population N de ricin à 280 nm.	172
Figure 113. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population N de ricin à 320 nm.	172

Figure 114. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population RA de ricin à 280 nm.	173
Figure 115. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population RA de ricin à 320 nm.	173
Figure 116. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population RA de ricin à 280 nm.	174
Figure 117. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population RA de ricin à 320 nm.	174
Figure 118. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P1 de jatropha à 280 nm.	175
Figure 119. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P1 de jatropha à 320 nm.	175
Figure 120. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P1 de jatropha à 280 nm.	176
Figure 121. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P1 de jatropha à 320 nm.	176
Figure 122. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P2 de jatropha à 280 nm.	177
Figure 123. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P2 de jatropha à 320 nm.	177
Figure 124. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P2 de jatropha à 280 nm.	178
Figure 125. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P2 de jatropha à 320 nm.	178
Figure 126. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P3 de jatropha à 280 nm.	179
Figure 127. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P3 de jatropha à 320 nm.	179
Figure 128. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P3 de jatropha à 280 nm.	180
Figure 129. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P3 de jatropha à 320 nm.	180
Figure 130. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P4 de jatropha à 280 nm.	181
Figure 131. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P4 de jatropha à 320 nm.	181
Figure 132. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P4 de jatropha à 280 nm.	182
Figure 133. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P4 de jatropha à 320 nm.	182
Figure 134. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P5 de jatropha à 280 nm.	183
Figure 135. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P5 de jatropha à 320 nm.	183
Figure 136. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P5 de jatropha à 280 nm.	184
Figure 137. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P5 de jatropha à 320 nm.	184
Figure 138. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P6 de jatropha à 280 nm.	185
Figure 139. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P6 de jatropha à 320 nm.	185
Figure 140. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P6 de jatropha à 280 nm.	186
Figure 141. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P6 de jatropha à 320 nm.	186
Figure 142. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P7 de jatropha à 280 nm.	187
Figure 143. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P7 de jatropha à 320 nm.	187
Figure 144. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P7 de jatropha à 280 nm.	188
Figure 145. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P7 de jatropha à 320 nm.	188
Figure 146. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P8 de jatropha à 280 nm.	189
Figure 147. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P8 de jatropha à 320 nm.	189
Figure 148. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P8 de jatropha à 280 nm.	190
Figure 149. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P8 de jatropha à 320 nm.	190

Introduction

Depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes médicinales ou des préparations à base des plantes connaît un succès croissant. Ainsi, d'après les estimations, 80% de la population mondiale dépend principalement de la médecine traditionnelle (OMS, 2012). Une analyse des prescriptions médicales menée aux Etats unis entre 1959 et 1980 a montré que 25% d'entre elles contenaient un principe issu du règne végétale (Farnsworth, 1988), tandis que environ 60% de prescriptions en Europe proviennent directement ou indirectement des plantes (Rao *et al.*, 2004).

Le recours aux pratiques traditionnelles à base de plantes médicinales est expliqué par plusieurs raisons tels que le coût élevé des produits pharmaceutiques, les habitudes socioculturelles des populations, la nécessité de disposer d'options thérapeutiques pour les agents pathogènes résistants et l'existence des maladies pour lesquelles il n'y a pas de traitement efficace (Duke, 1993, Cox et Balik, 1994).

Aujourd'hui, l'industrie pharmaceutique a investi dans la recherche des médicaments d'origine végétale. L'étude de la biodiversité des plantes médicinales et les utilisations médicinales traditionnelles des populations autochtones ont constitué un axe prioritaire dans cette recherche. L'ethnobotanique est la branche de la biologie qui étudie spécifiquement les relations économiques entre les plantes et ce qu'on appelle souvent les sociétés « primitives ». Ensuite, les progrès dans les domaines de l'automatisation et de la robotique ont facilité l'évaluation en laboratoire de gros échantillons en peu de temps. Enfin, lors de la synthèse d'un produit, les chimistes ont généralement besoin d'exemples de médicaments naturels efficaces en guise de modèles structurels et fonctionnels pour pouvoir concevoir rationnellement des médicaments ayant une structure moléculaire analogue (Small et Catling, 2000). Les plantes médicinales sont extrêmement nombreuses. En effet, les estimations indiquent que plus que 13000 espèces de plantes médicinales sont utilisées comme remèdes traditionnels par diverses cultures dans le monde entier (Tyler, 1993). Les propriétés

médicinales des plantes sont dues à des produits synthétisés par les plantes elles mêmes appelés métabolites secondaires. De nombreux métabolites secondaires essentiellement les polyphénols sont des antibiotiques au sens large, car ils protègent les plantes contre les champignons, les bactéries, les animaux et même les autres plantes (Buchanan *et al.*, 2000). Les polyphénols sont aussi connus pour leurs activités biologiques qui sont en relation directe avec la santé de l'être humain. Ils sont utilisés dans la chimiothérapie et dans le traitement de plusieurs types de cancer (Manach *et al.*, 1996). Ils sont présents comme ingrédients dans plusieurs préparations cosmétiques utilisées dans le traitement du vieillissement cellulaire et la protection de la peau (Mena *et al.*, 2014). Les polyphénols sont connus par leurs activités anti-oxydantes importantes, car ils peuvent agir par piégeage direct des ERO (espèces réactives de l'oxygène) (Halliwell, 1994). Ils sont aussi connus pour leurs activités enzymatiques, car ils peuvent inhiber l'activité de certaines enzymes comme le cas de l'acétylcholinestérase (Heinrich et Teoh, 2004).

Notre travail de recherche est centré sur la valorisation du ricin connu comme plante dont l'huile des graines est utilisée pour sa vertu cosmétique et plus récemment dans la production du biodiesel. On a choisi de valoriser cette plante à travers l'utilisation d'autres parties et en particulier les feuilles et les racines. Ainsi, on a mené dans des travaux antérieurs une étude préliminaire de l'activité larvicide des extraits des feuilles et des graines de différentes populations du ricin tunisien. Les résultats obtenus sont motivants ce qui nous a encouragé de vérifier les raisons de l'usage du ricin en médecine traditionnelle grâce à la mise en évidence d'autres activités biologiques comme le pouvoir anti-radicalaire et l'activité enzymatique. En parallèle, il est apparu nécessaire de réaliser une étude phytochimique pour quantifier et identifier les métabolites secondaires responsables des activités étudiées.

Les résultats obtenus suite à cette étude nous ont conduits à appliquer cette méthodologie sur une autre *Euphorbiaceae* récemment introduite en Tunisie dans une objective bioénergétique.

Il s'agit de *Jatropha curcas*. Cette deuxième étude nous a permis de comparer les activités anti-radicalaire et enzymatique en fonction de l'origine géographique de la plante de jatropha (pays d'Afrique ou d'Amérique de sud).

La première partie du manuscrit porte sur une synthèse d'une recherche bibliographique. D'abord, une étude ethnobotanique des deux espèces étudiées : *Ricinus communis* et *Jatropha curcas* a été réalisée. Nous avons cité l'importance économique, les différents composés phénoliques présents ainsi que les activités biologiques trouvés dans la littérature relatives aux deux espèces. Ensuite, après avoir présenté quelques uns des principaux composés phénoliques, nous avons détaillé plus précisément les activités biologiques connues des polyphénols et des flavonoïdes ainsi que leurs bienfaits sur la santé de l'être humain. Enfin, les techniques utilisées pour élaborer les différentes parties de cette thèse ont été détaillées.

La deuxième partie de ce travail est consacrée d'une part aux dosages des différents composés phénoliques (polyphenols totaux, flavonoïdes totaux et tannins condensés) présents au niveau des différentes parties des plantes et d'autre part à l'identification et la quantification de ces composés.

La troisième partie est destinée à l'étude qualitative et quantitative des huiles fixes des deux espèces étudiées.

La dernière partie est consacrée à la valorisation des différents extraits des plantes. Dans un premier temps, le pouvoir anti-radicalaire des extraits des deux espèces est mesuré par deux tests DPPH et ABTS. Ensuite, tous les extraits testés ont subi une étude de leur activité enzymatique en mesurant leur pouvoir inhibiteur de l'acétylcholinestérase, une des principales cibles des traitements contre la maladie d'Alzheimer.

1^{ère} Partie: Etude bibliographique

Chapitre I: Etude ethnobotanique des espèces

I- Le ricin : *Ricinus communis* L.

I-1 Taxonomie du ricin

Ricinus communis L. est une plante du sous règne des Phanérogames, de l'embranchement des Angiospermes, de la classe des *Magnoliopsidae*, de la sous classe des *Rosidae*, de l'ordre des *Euphorbiales* et de la famille des *Euphorbiaceae* qui compte entre 5000 et 8000 espèces réparties dans environ 300 genres. Les plantes de cette famille, sont d'aspect très variable, elles se caractérisent essentiellement par leur latex blanc avec une évolution de la morphologie florale qui va des fleurs classiques (sous-famille des *Crotonoideae*) aux fleurs simplifiées et réduites (sous-famille des *Euphorbioideae*). Chez la majorité des espèces, le fruit est à trois loges (Jussieu, 1789). Le genre *Ricinus* est représenté par une seule espèce : *Ricinus communis* L (Polvèche, 1996).

I-2 Nomenclature

Le nom scientifique de l'espèce est *Ricinus communis* L. (Armstrong, 1982). Le ricin est appelé également kharouâa en arabe, ricin en français et castor bean en anglais (Ghrabi, 2005).

I-3 Description botanique du taxon

Le ricin est un arbuste vivace robuste de 3 à 12 m de haut (Wan, 2006). Une cellule diploïde de ricin possède un nombre chromosomique égal à $2n = 2x = 20$ (Harrys, 1980 ; Karl et Dan, 1965). Les feuilles sont longuement pétiolées, palmées, lobées (5 à 9 lobes), caduques et de couleur vert foncé parfois tracées de rouge pourpre (Figure 1) (Wan, 2006).



Figure 1. Morphologie des feuilles de ricin (Morrow, 2009).

I-3-1 La floraison

Le ricin se caractérise par des fleurs mâles et des fleurs femelles insérées sur la même inflorescence. Ainsi, les fleurs staminées mâles sont placées sur la partie inférieure de l'inflorescence alors que les fleurs pistillées femelles occupent la partie supérieure (Figure 2). Les fleurs femelles sont couronnées par trois stylets rouges (William *et al.*, 1967). Dans certains cas, l'inflorescence peut être formée uniquement par des fleurs pistillées (Shifriss, 1966).

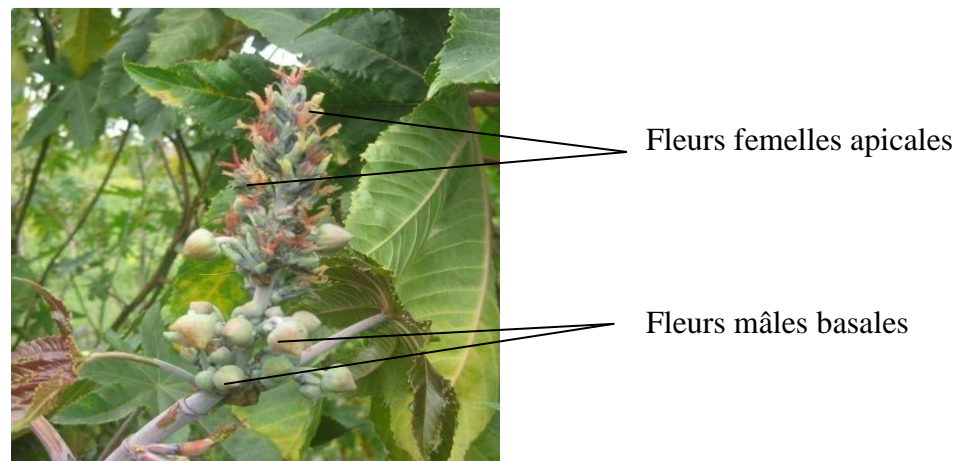


Figure 2. Inflorescence en panicule terminal chez le ricin ; Fleurs femelles apicales et fleurs mâle basales.

I-3-2 Les fruits et les graines

Le fruit est une capsule tricoque qui s'ouvre par déhiscence septicide, puis loculicide, en abandonnant la columelle sur laquelle s'insèrent les graines (Figure 3). Celles-ci, brillantes et tachetées, offrent extérieurement, dans la région du micropyle, un arille appelé caroncule (Figure 4). Ces graines se caractérisent encore par la présence d'un endosperme et d'un embryon spatulé axialement (Prat *et al.*, 2005).

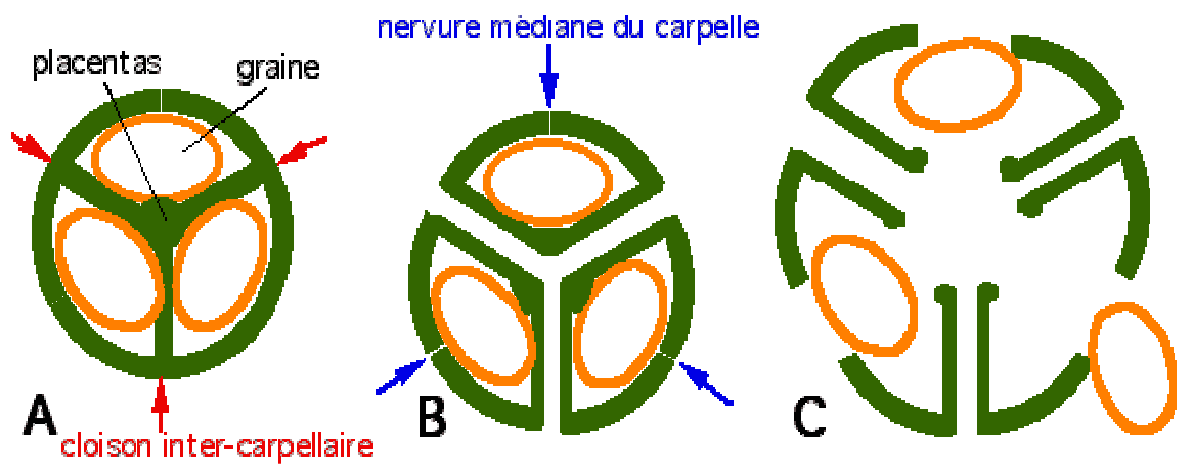


Figure 3. Structure du fruit triloculaire (Prat *et al.*, 2005).

Il est formé de trois carpelles soudés, fermés et à placentation axile. Dans chaque loge une seule graine se développe. **A**: L'ouverture est complexe ; **B** : les trois carpelles se séparent par trois fentes situées au niveau des cloisons (septum) intercarpellaires (déhiscence septicide) formant trois coques ; **C** : les trois coques séparées s'ouvrent par trois fentes situées au niveau de leur nervure médiane (déhiscence loculicide), ce qui permet la libération des graines (Prat *et al.*, 2005).

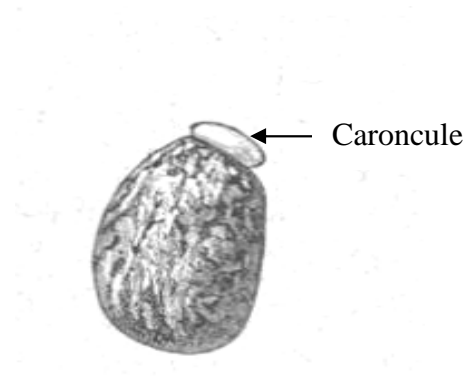


Figure 4. Graine entière avec sa caroncule au sommet.

I-4 Distribution biogéographique de l'espèce

I-4-1 Répartition mondiale

Le ricin est originaire du nord-est africain et du moyen-orient. Il est répandu en Inde et en Chine qui sont les deux premiers producteurs du ricin dans le monde (FAO, 2007). Il a envahit l'Amérique au 16^e siècle (Déthiollaz, 2003). Cette plante est cultivée dans la plupart des régions tropicales et subtropicales sèches de même que dans de nombreuses régions tempérées dotées d'un été chaud. Il se naturalise facilement et pousse dans de nombreux endroits comme plante rudérale adaptée aux contraintes des milieux parfois hostiles aux autres végétaux (Polvèche, 1996).

I-4-2 Répartition en Tunisie

Le ricin pousse spontanément en Tunisie et se rencontre surtout sur les terrains dégradés, les terres incultes et les friches urbaines (Neff, 2008). Il a été introduit et naturalisé dans toute la Tunisie (Ghrabi, 2005). La culture du ricin sur des terres dégradées non exploitées pour la production agroalimentaire est une opportunité pour la Tunisie pour produire du biocarburant. En effet, une attention particulière à la culture du ricin en Tunisie s'impose, car le ricin, utilisé comme biocarburant, peut contribuer efficacement à la diminution de la consommation de carburant fossiles et à la revalorisation potentielle des terres dégradées (Neff, 2008).

I-5 Exigences écologiques du taxon

I-5-1 Exigences climatiques

Le ricin a pu s'acclimater spontanément dans les régions tropicales et subtropicales mais il préfère des pluviométries assez élevées (450 – 1000 mm) pour compléter son cycle de développement (Déthiollaz, 2003). La répartition géographique du ricin dans le monde indique qu'il tolère une grande variabilité des conditions climatiques sauf pour les très basses températures. En effet, vingt-quatre heures à 2 °C suffisent pour inhiber la germination. Cependant, un bon démarrage de la germination à des températures supérieures à 15°C est observé (Polvèche, 1996).

I-5-2 Exigences édaphiques

Les caractéristiques physiques, chimiques et biologiques du sol sont dites conditions édaphiques. En général, La plante est exigeante, elle préfère des pentes qui ne dépassent pas 12%, des sols argileux-silicieux profonds dont le pH ne dépasse pas 7 (Rousset *et al.*, 2008).

I-6 La phénologie

La vie des plantes et des animaux est rythmée par des évènements périodiques, qui se produisent chaque année sensiblement à la même période. L'étude de ces événements est appelé phénologie et chaque étape du développement de la plante ou de l'animal est une phénophase. Les évènements phénologiques se reproduisent chaque année, mais leur date peut varier d'une année à l'autre, car ils sont fortement influencés par les conditions de l'environnement et en particulier les facteurs climatiques tels que la température, la photopériode et la pluviométrie (Brugger et Vassella, 2003 ; Lechowicz, 2001).

Le ricin est une plante pérenne. La période végétative se caractérise par l'augmentation du nombre d'entre-nœuds et par conséquent de l'élongation des rameaux. L'apparition des nouvelles feuilles caractérise cette croissance végétative. La germination de la graine se

caractérisé par l'émergence de la radicule ou racine embryonnaire qui permet à la jeune plantule de se fixer au sol et d'absorber l'eau. Au cours de sa croissance, cette racine primaire produit des racines latérales (Figure5). Après l'émergence de la radicule l'hypocotyle s'allonge et se recourbe en crosse et dès qu'il atteint la surface du sol, il se redresse et soulève les cotylédons et la plumule. Il s'agit dans ce cas d'une germination épigée. Au cours de la germination qui conduit au développement de la plantule, les réserves des cotylédons sont utilisées par la nouvelle plante pour sa croissance. Ainsi, la taille des cotylédons diminue progressivement, ils se dessèchent et finissent par tomber. La plantule devient alors un organisme photosynthétique autotrophe (Peter *et al.*, 1999).

***Ricinus communis* - castor bean (Euphorbiaceae)**

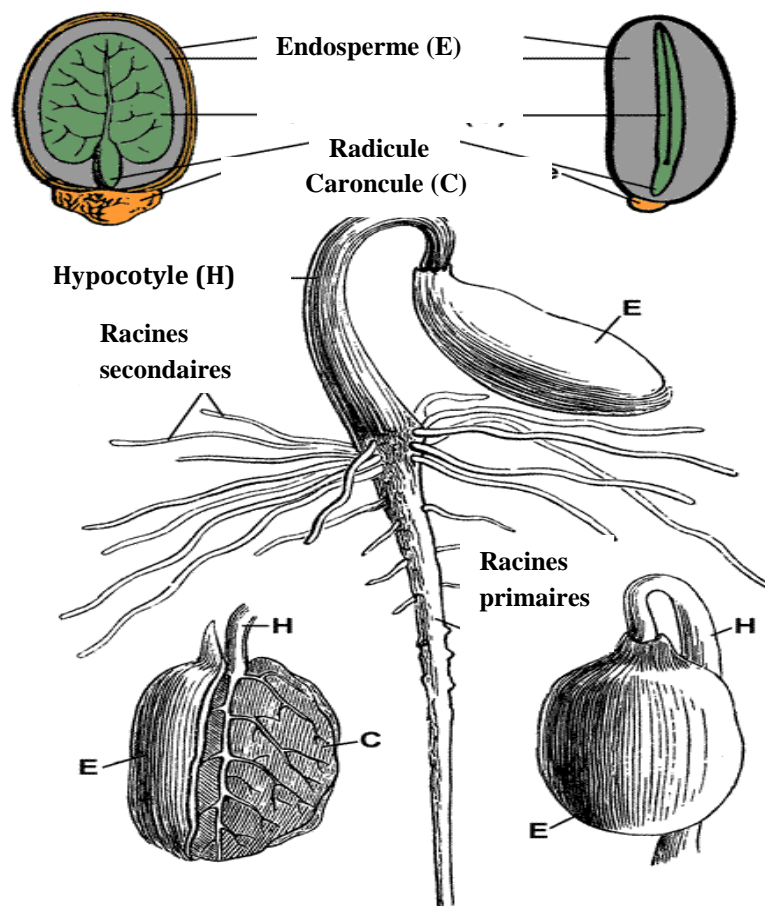


Figure 5. Les différents composants de la graine de ricin (Sachs et al., 2007).

I-7 Utilisation du ricin

I-7-1 Utilisation industrielle

Le ricin présente un grand intérêt économique et plus particulièrement son huile. L'huile de ricin est largement utilisée comme lubrifiant pour ces caractéristiques exceptionnelles : sa souplesse, sa bonne résistance, sa bonne tenue dans une plage étendue de température (de -40 °C à +130°C) et sa grande affinité pour les surfaces métalliques (qualités de mouillage). En outre, on est arrivé à fabriquer une fibre nylon qui s'avère un produit incontournable dans le monde entier, caractérisé par sa forte résistance mécanique et sa grande souplesse (Polvèche 1996). Polvèche (1996) puis Perret (2007) rapportent l'utilisation de certaines composantes de l'huile de ricin pour la fabrication des vernis, savons et des peintures.

Au Brésil, dans le domaine énergétique, l'huile de ricin est utilisée pour la production de biodiesel. La production du ricin dans ce pays est de 210 000 tonnes entre 2004 et 2005 (Rousset *et al.* 2008). De plus, cette huile s'avère une énergie renouvelable et biodégradable qui ne cause pas d'effets néfastes pour l'environnement comme c'est le cas de la majorité des carburants (Forero, 2004).

I-7-2 Utilisation médicale

Le ricin est une plante médicinale qui a été traditionnellement utilisée dans le traitement de nombreuses maladies. Ainsi, l'huile de ricin entre dans la composition de nombreux traitements purgatifs ou laxatifs. En usage externe, elle est exploitée en cosmétique comme crèmes solaires et crèmes antirides. En dermatologie, elle est utilisée pour le soin des durillons, des kystes et de certaines de plaies ouvertes (Polvèche, 1996).

En Inde, les feuilles, les racines et les graines sont utilisées pour la contraception et l'avortement (Kalita *et al.*, 2011 ; Sahria et Sharma, 2011). Kirtikar et Basu (1991) ont aussi

utilisé les différentes parties de la plante pour traiter les inflammations et les maladies du foie. L'extrait des feuilles mélangé avec du lait et du sucre est une préparation connue en Inde pour vider l'estomac selon Kachare et Surywanshi (2010). En Jordanie, après décoction des fruits de ricin, la solution obtenue est utilisée comme un antidysentérique (Al-Qura'n, 2009). Jayaweera (1980) puis Kota et Manthri (2011) indiquent que les feuilles de ricin soulagent les maux de tête et le rhumatisme. Le ricin est traditionnellement utilisé pour d'autres activités hépatoprotectrice (Visen *et al.*, 1992), diurétique (Nath, 2011) et antibactérienne (Khan *et al.* 1978).

Sharma *et al.* (1990) ont montré que le ricin peut être utilisé comme un insecticide efficace, ainsi l'utilisation du ricin dans la lutte contre les termites (fourmis blanches) qui endommagent le bois de *Mongifera indica* et *Pinus longifolia* a été mise en évidence dans des essais comparatifs. L'ordre de l'activité insecticide suivant a été observé : DDT=BHC > huile du ricin + extrait de l'écorce de ricin > huile du ricin > feuilles du ricin > extrait de l'écorce du ricin > huile de neem (*Azadirachta indica*, arbre utilisée en Inde comme fertilisant, pesticide et insecticide) > feuilles de neem. D'autre part, ils ont remarqué que les traitements utilisés réduisent de façon significative la perte de masse dans les pièces de bois exposées aux termites.

De plus, ces dernières années, la recherche a montré que la ricine, toxine qui caractérise le ricin, s'avère active contre certaines cellules cancéreuses. Cette glycoprotéine, largement étudiée, est formée par deux chaînes polypeptidiques A et B reliées par un pont disulfure. La chaîne A forme la partie toxique quant à la chaîne B, elle permet à la toxine de se fixer à la surface d'une cellule en se liant à une molécule de sucre ou galactose. Ainsi, une fois la chaîne A entrée à l'intérieur de la cellule, elle bloque la synthèse des protéines ce qui conduit à la mort cellulaire. Il est à noter que la chaîne A sans la chaîne B ne peut pas pénétrer à l'intérieur

d'une cellule et la chaîne B sans la chaîne A n'a aucune action toxique d'où l'importance du pont disulfure (Olsnes et Kozlov, 2001).

Déthiollaz (2003) montre que le ciblage des tumeurs par la ricine permet de détruire les cellules cancéreuses sans endommager les cellules saines du patient. Donc il s'agit d'une véritable " torpille " qui permettrait d'atteindre les cellules cancéreuses métastasées ou de pénétrer à l'intérieur des tumeurs solides inopérables. Plusieurs chercheurs ont réalisé des études pour révéler d'autres activités possibles du ricin. Ainsi, il a été démontré que l'extrait éthanolique des racines du ricin possède une activité anti-diabétique (Poonam *et al.*, 2008). Alors que l'extrait méthanolique montre une activité anti-inflammatoire importante contre des inflammations aiguës et chroniques chez les rats, cet extrait a montré également une importante activité dans le piégeage des radicaux libres par inhibition de la peroxydation lipidique (Ilavarasan *et al.*, 2005).

D'autres recherches ont montré que le ricin peut être utilisé comme larvicide. Ainsi les extraits aqueux des feuilles et des graines du ricin (*Ricinus communis*) provenant de plusieurs provenances Tunisiennes présentent des effets toxiques sur les larves de moustiques *Culex pipiens*. Les tests de toxicité ont révélé au bout de 24 heures d'exposition, des taux de mortalités de 100% et des concentrations létales CL₅₀ très faibles. Donc dans le cadre de lutte contre les moustiques, ces extraits peuvent être utilisés comme des biocides naturels (Ghnimi *et al.*, 2014).

1-8 Etude phytochimique de ricin

Plusieurs études phytochimiques ont été réalisées pour identifier les différents composés chimiques chez le ricin. Ces analyses ont montré la présence des flavonoïdes qui sont le kaempferol-3-O-beta-D-rutinoside et le kaempferol-3-O-beta-D-xylopyranoside, ces

flavonoïdes ont été isolés à partir des feuilles par Khafagy *et al.* (1979) puis Kang *et al.* (1985).

Plus récemment, les travaux de Singh and Chauhan, 2009 puis Ghosh *et al.* (2013) ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles est riche en composés phénoliques (l'acide gallique, l'acide gentsique, l'acide ellagique, la quercétine, la rutine et l'epicatéchine) et qu'il possède un pouvoir antioxydant. Khogali *et al.* (1992) ont montré la présence de tannins au niveau des feuilles. Pour les extraits des racines, Hall et Medlow (1975) ont confirmé la présence de l'acide indole-3-acétique connu sous le nom AIA (C₁₀H₉N₂) qui est l'une des auxines (phytohormones responsables de la croissance végétale) les plus connus. En ce qui concerne les graines, qui contiennent 45% d'huile fixe, elles sont riches en glycosides d'acides ricinoléique, isoricinoléique, stéarique et dihydroxystéarique. Ces graines contiennent également de la lipase et un alcaloïde qui est la ricinine (Khogali *et al.*, 1992).

II- Le jatropha : *Jatropha curcas* L.

II-1 Taxonomie du jatropha

Jatropha curcas L. (appelé jatropha dans le reste du texte) est une plante du sous règne des Phanérogames, de l'embranchement des Angiospermes, de la classe des *Magnoliopsidae*, de la sous classe des *Rosidae*, de l'ordre des *Euphorbiales* et de la famille des *Euphorbiaceae*. Cette plante fait partie de la sous-famille des *Crotonoideae* (Jussieu, 1789) et du genre *Jatropha* qui contient environ 170 espèces connues (Dehgan et Webster, 1979). Dehgan et Webster (1979) ont réétudié la subdivision faite par Pax (1910) du genre *Jatropha* et sont arrivés à distinguer deux sous genres : le *Jatropha* et le *Curcas*. La nouveauté, c'est qu'ils ont postulé que le *Jatropha curcas* L. est la forme primitive du genre *Jatropha* (Figure 6).

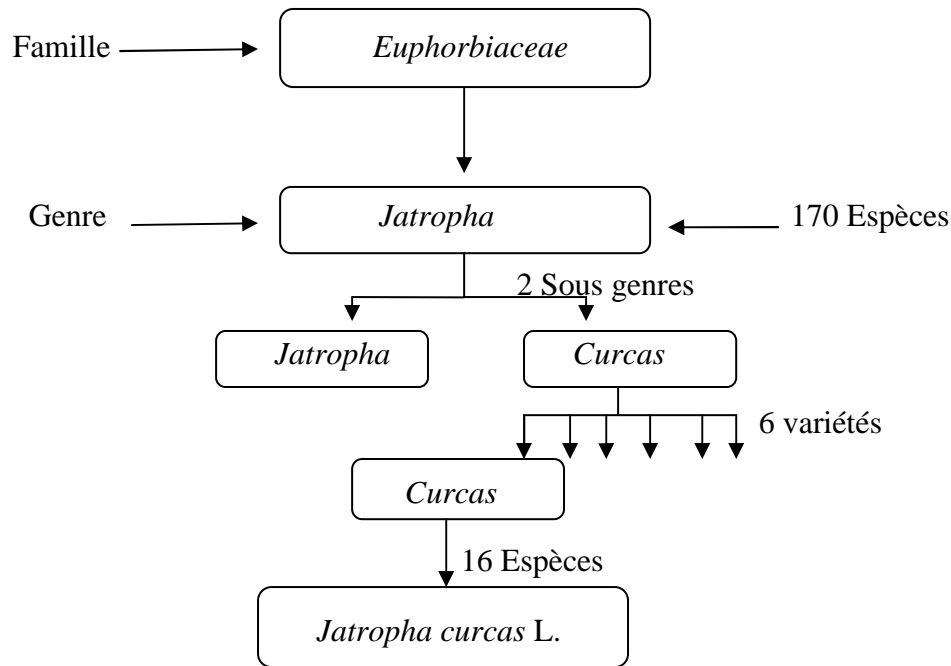


Figure 6. Schéma explicatif de la classification de *Jatropha curcas* L.

II-2 Nomenclature

Le nom jatropha dérive du grec jatro (médecin) et trophe (alimentaire) ce qui implique des usages médicaux (Kumar et Sharma, 2008). Le jatropha est également appelé physic nut ou purging nut en anglais, pourghère ou pignon d'Inde en français, purgeernoot en allemand, piñoncillo en mexicain et mundubi-assu en Brésil (Münch, 1986; Schultze, 1986).

II-3 Description botanique du taxon

Le jatropha est un petit arbre ou arbuste dont la hauteur peut atteindre 5m (Kobilke, 1989). Les espèces de jatropha possèdent toutes des chromosomes de très petite taille (longueur moyenne entre 1 et 3,7 μm). Une cellule diploïde de jatropha possède un nombre chromosomique égal à $2n = 2x = 22$ (Soontornchainaksaeng *et al.*, 2003). Cet arbre possède un tronc droit avec une écorce grise ou rougeâtre masquée par de grandes tâches blanches. Les feuilles sont vertes avec une longueur et une largeur qui varie entre 6 et 15 cm. Elles sont pétiolées, lobées (5 à 7 lobes) et disposées en alternance (Gupta, 1985) (Figure7).

II-3-1 La floraison

Le jatropha se caractérise par une inflorescence en grappe formée par des fleurs unisexuées, composées à la fois de fleurs mâles et de fleurs femelles qui possèdent cinq sépales et cinq pétales. En général, les fleurs mâles se caractérisent par 10 étamines réparties sur deux verticilles alors que les fleurs femelles possèdent trois carpelles et deux stigmates fendus (Wu *et al.*, 2011) (Figure7).

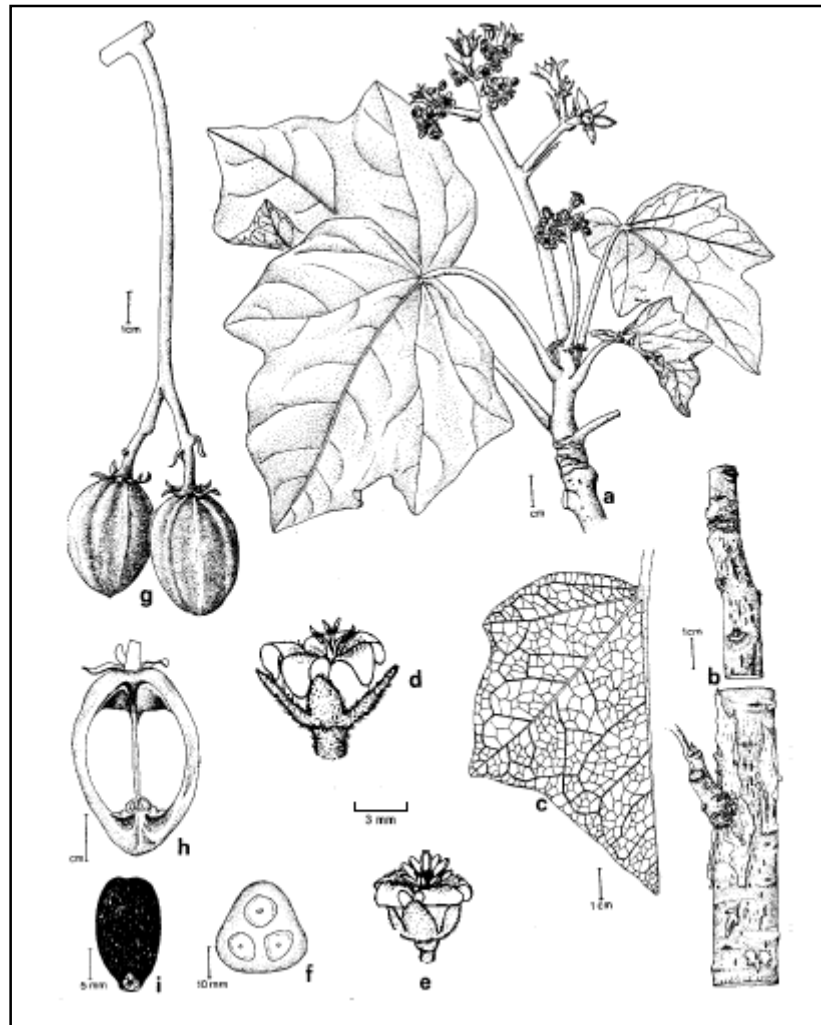


Figure 7. Les différentes parties de la plante du jatropha (Heller, 1996).

a- inflorescence terminale, b- ecorce, c- Feuille, d- fleur pistillée, e- fleur staminée, f- coupe transversale d'un fruit immature, g- fruit, h- coupe longitudinale du fruit et i- graine. a-c et f-h de Aponte, 1978 et d-e de Dehgan, 1984.

II- 3-2 Les fruits et les graines

Le fruit du jatropha est une capsule tricoque qui s'ouvre par déhiscence septicide, puis loculicide. L'exocarpe reste charnue jusqu'à ce que les graines soient mures. Ces graines sont noires, mesurent en moyenne 18 mm de longueur et 10 mm de largeur avec un poids d'environ 727g pour 1000 graines (Singh, 1970) (Figure7).

II-4 Distribution biogéographique de l'espèce

II-4-1 Répartition mondiale

Le jatropha est originaire d'Amérique centrale et plus particulièrement du Mexique où il se pousse naturellement dans les forêts des régions côtières (Aponte, 1978). A partir des Caraïbes, le jatropha a été probablement importé par les navigateurs portugais à partir des îles du Cap-Vert et de la Guinée Bissau vers les autres pays Africains ainsi qu'en Asie (Cano-Asseleh, 1986 et Heller, 1996) (Figure 8). Aujourd'hui, cette plante est largement cultivée dans la plupart des régions tropicales et subtropicales sèches (Garg *et al.*, 2011).

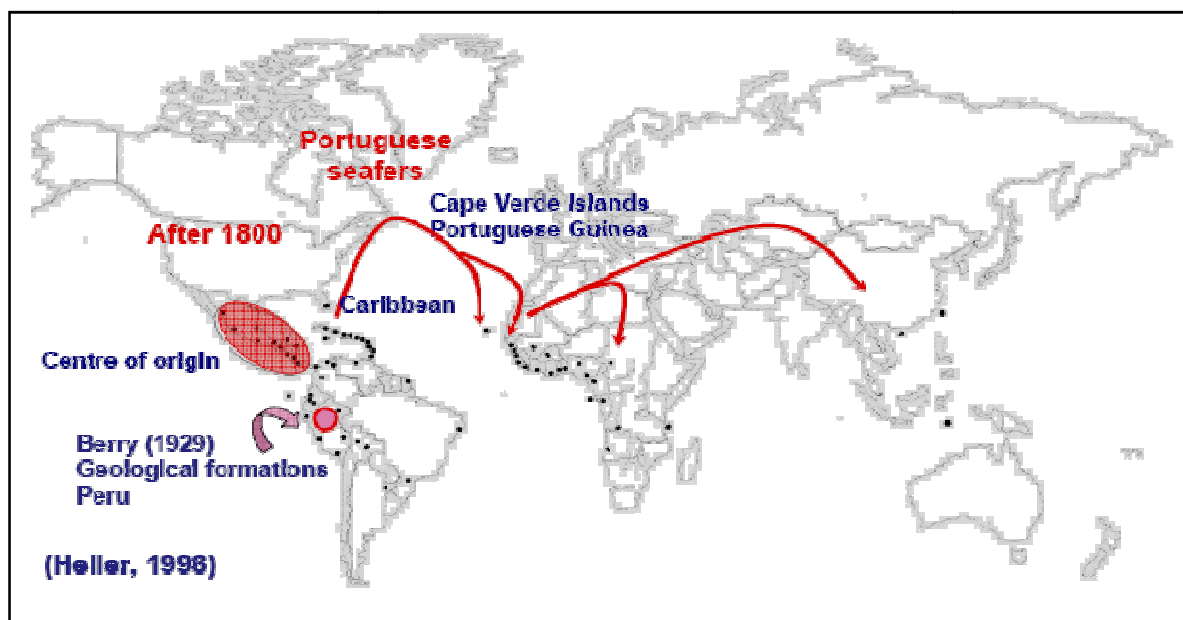


Figure 8. La répartition mondiale de jatropha (Heller, 1996).

II-4-2 Répartition en Tunisie

Afin de réduire leurs dépenses vis-à-vis des énergies fossiles, plusieurs pays africains dont la Tunisie, se sont aujourd'hui lancés dans la culture du jatropha dénommé « l'or vert » (De ville, 2009). La culture de jatropha en Tunisie est limitée à des régions bien ciblées. Il s'agit en fait d'une série d'essais en plein champ réalisée dans les régions de Kondar, de Kalaat Andalous, CFPA de Médenine ainsi que dans la station régionale d'Ouled Souhil à Nabeul (Khouja *et al.*). Même si ce type de culture en Tunisie est encore au stade expérimental, il est à noter que les autorités précisent qu'elle ne doit en aucun cas concurrencer la production agroalimentaire. Une attention particulière à la culture des plantes utilisées à la production des biocarburants en Tunisie s'impose, puisque elle peut contribuer efficacement à la revalorisation potentielle des terres dégradées (Neff, 2008).

II-5 Exigences écologiques du taxon

II-5-1 Exigences climatiques

Le jatropha est une plante caractéristique des régions tropicales et subtropicales. D'après sa répartition dans le monde, cette plante présente une grande tolérance aux conditions arides et semi-arides, en revanche elle est totalement absente dans les régions humides (Dehgan et Schutzman 1994). Heller (1996) signale que l'introduction de jatropha a connu une meilleure réussite dans les régions sèches avec une pluviométrie moyenne annuelle qui varie entre 300 et 1000 mm et des températures moyennes annuelles entre 20 et 28 °C.

II-5-2 Exigences édaphiques

Le jatropha pousse sur des sols bien drainés avec une bonne aération. La plante est bien adaptée aux sols marginaux avec de faibles teneurs en nutriments car dans les sols lourds la formation des racines est réduite. Il apparaît que cette plante s'adapte facilement d'où sa capacité à croître sur des sites pauvres et secs (Heller, 1996).

II-6 La phénologie

Le jatropha se caractérise par une croissance végétative durant les saisons de pluies et qui peut même se poursuivre pendant les saisons sèches mais avec un rythme moins important.

La floraison présente deux pics ou vagues de floraison : la première durant le mois de mai et la deuxième en novembre. La fructification nécessite 90 jours jusqu'à la formation des graines bien mûres.

La germination de la graine se caractérise par l'émergence de la radicule et de quatre racines périphériques. Peu de temps après la formation des premières feuilles les cotylédons se flétrissent et tombent. Dans des bonnes conditions d'humidité et de température, la germination nécessite environ une dizaine de jours. En général, le jatropha peut atteindre un âge de 50 ans (Takeda, 1982).

II-7 Utilisation du jatropha

Du point de vue économique, le jatropha est largement utilisé dans plusieurs domaines. Au Cap-Vert, cette plante est récemment implantée dans les zones arides pour aider dans le contrôle de l'érosion des sols (Heller, 1996). Au Mali, des milliers de kilomètres de jatropha servent de haies qui clôturent les champs de coton (Lutz, 1992; Henning et Von Mitzlaff, 1995). Traditionnellement, au Mali, l'huile des graines de jatropha entre dans la production de savon. La procédure de cette fabrication artisanale consiste à faire bouillir l'huile dans une solution alcaline (Henning, 1994 ; Heller, 1996). Des recherches plus récentes ont montré qu'un mélange de 75% d'huile de jatropha hydrogénée, 15% d'huile de jatropha raffinée et 10% d'huile de noix de coco peut fournir un savon avec des valeurs moussantes équivalentes aux savons de toilette utilisés actuellement (Heller, 1996). En agronomie, les tourteaux des fruits peuvent servir comme engrais organiques en raison de leur

important teneur en azote (3,2% à 3,8%) (Juillet *et al.*, 1955; Moreira, 1970; Vohringer, 1987 et Heller, 1996).

Dans le but de limiter l'utilisation des carburants fossiles, une attention particulière a été portée à d'autres ressources naturelles. En effet, plusieurs recherches ont été menées pour arriver à la production d'un biodiesel à partir des plantes oléagineuses et en particulier le jatropha. Ainsi, une expérience a été réalisée par le Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) dans les îles de Cap-Vert afin d'alimenter les moteurs avec de l'huile de jatropha. Cette expérience a malheureusement échoué (Heller, 1996). Par la suite, la GTZ a initié d'autres projets au Mali qui montrent l'intérêt de l'utilisation de cette huile sur des moteurs fixes. Après une série d'expériences, il a été confirmé que l'huile de jatropha est compétitive comparée au diesel importé. Elle pourrait donc remplacer le carburant fossile dans les régions éloignées où il n'est pas disponible (Lutz, 1992 ; Heller, 1996).

II-8 Les activités biologiques du jatropha

En médecine, les différentes parties de la plante comme les graines, les feuilles et les branches ont été utilisées traditionnellement dans des préparations à usage médicinal et vétérinaire (Heller, 1996). Différentes espèces de jatropha ont été utilisées traditionnellement pour traiter plusieurs maladies en Afrique, en Asie et en Amérique latine (Burkill, 1994). Ainsi, au Ghana, une décoction des feuilles de *J. curcas* avec *Azadirachta indica* et *Carica papaya* est utilisée dans le traitement de la malaria (Asase *et al.*, 2005). En outre, après ébullition des jeunes feuilles, la solution obtenue est consommée pour diminuer la fièvre (Kirtikar et Basu, 1980). Dans les pays d'Amérique du sud tel que le Pérou, le latex des écorces est exploité depuis longtemps pour soigner les blessures et les plaies (Villegas *et al.*, 1997) et traiter les maux de dents (Kirtikar et Basu, 1980). En Guyane, des préparations de tiges, de fruits et de racines sont utilisées pour traiter contre la leishmaniose (Odonne *et al.*, 2011). De plus, la plante de jatropha est utilisée dans le traitement de plusieurs allergies

(Heller 1996). Les fruits et les graines sont appliqués également contre les douleurs abdominales les dysenteries (Kirtikar et Basu 1980). L'huile de jatropha est connue pour être un purgatif puissant, elle est utilisée aussi dans le traitement des maladies dermatologiques ainsi que les douleurs causées par le rhumatisme (Heller, 1996).

Des études plus récentes ont montré que les tiges et les écorces sont utilisées contre les tumeurs et le HIV. Par ailleurs, l'étude réalisée par Sudha *et al.* (2013) a montré que les feuilles présentent une activité antimicrobienne importante.

Devappa *et al.* (2011) indiquent que les phorbol esters (PEs) isolés de l'huile de jatropha présentent une activité antibactérienne significative. Nithiyanantham *et al.* (2013) montrent que les différents extraits de graines présentent un pouvoir antioxydants important.

Les extraits des feuilles et des racines sont connus pour leur activité antileucémique (Duke, 1983), anticancéreuses, antiseptiques, antidiurétiques et hémostatiques (Dalziel, 1955).

La sève isolée des tiges de jatropha présente une activité coagulante ainsi que des propriétés cicatrisantes (Nath et Duttan, 1992 ; Heller, 1996).

D'autres études ont testé l'activité pesticide de l'huile de jatropha contre quelques insectes : *Helicoverpa armigera*, *Aphis gossypii*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, et *Callosobruchus maculatus*, et les résultats obtenus sont très concluants (Grainge et Ahmed, 1988 ; Heller, 1996).

L'étude réalisée par Fatnassi *et al.* (2014) a montré que les extraits aqueux des feuilles et des graines du jatropha provenant de plusieurs provenances présentent une activité larvicide importante contre les larves de moustiques *Culex pipiens*. Ainsi, les tests de toxicité ont révélé au bout de 24 heures d'exposition, des taux de mortalités qui varient entre 60 et 100% et des concentrations létales CL₅₀ très faibles.

II-9 Etude phytochimique du jatropha

Des analyses chimiques ont été réalisées pour identifier les différents composés présents chez le jatropha. Ces analyses ont montré au niveau des feuilles la présence de α -amyrine qui est un triterpène, plusieurs phytostérols comme le β -sitostérol, le stigmastérol et le campestérol (Morton, 1981).

D'autres analyses ont montré aussi la présence de plusieurs polyphénols glycosylés tels que la vitexine, l'isovitexine (List and Horhammer, 1979), l'acide vanillique, l'acide gallique, la rutine, la naringine, le pyrogallol (Namuli *et al.*, 2011), l'orientine, la vicénine II, l'apigénine, apigénine 7-O- β -D-galactoside, apigénine 7-O- β -D-neohesperidoside (Abd-Alla *et al.*, 2009), 3-hydroxy-4-méthoxybenzaldehyde, 3-hydroxy-4-hydroxybenzoate acide, la nobiletine (Lingyi *et al.*, 1996) et Cafféoylaldéhyde (Yao *et al.*, 2012).

Au niveau des graines, les études ont montré que 100 g de graines contient 6,6 g de H₂O, 18,2 g de protéines, 38 g de matière grasse, 33,5 g de glucides totaux, 15,5 g de fibres et 4,5 g de cendres (Duke et Atchley, 1983). En ce qui concerne l'huile de jatropha, elle est essentiellement formée d'acide linoléique, acide palmitique, acide oléique, acide stéarique, acide myristique et acide arachidonique (Perry, 1980).

Haas *et al.* (2002) ont montré que l'huile de jatropha contient l'acide cis-11-eicosénoïque (C₂₀:1) et l'acide cis-11,14-eicosadiénoïque (C₂₀:2). Ils ont identifié six phorbol esters nommés les facteurs de jatropha C₁-C₆ (Figure 9). Ces phorbol esters sont tous des diesters de la même diterpénoïde 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. Wender *et al.* (1998) ont montré que ces phorbol esters sont des promoteurs puissants des tumeurs puisqu'ils sont capables d'amplifier l'effet d'un agent cancérigène sans d'être eux-mêmes cancérogènes. Hecker (1987) a montré que la dose promoteur est inférieure à 5 nanomoles. Il est à noter que la structure du facteur

jatropha C₃ est complète tandis que les autres esters sont donnés sans la partie 12-désoxy-16-hydroxyphorbol (Figure 9).

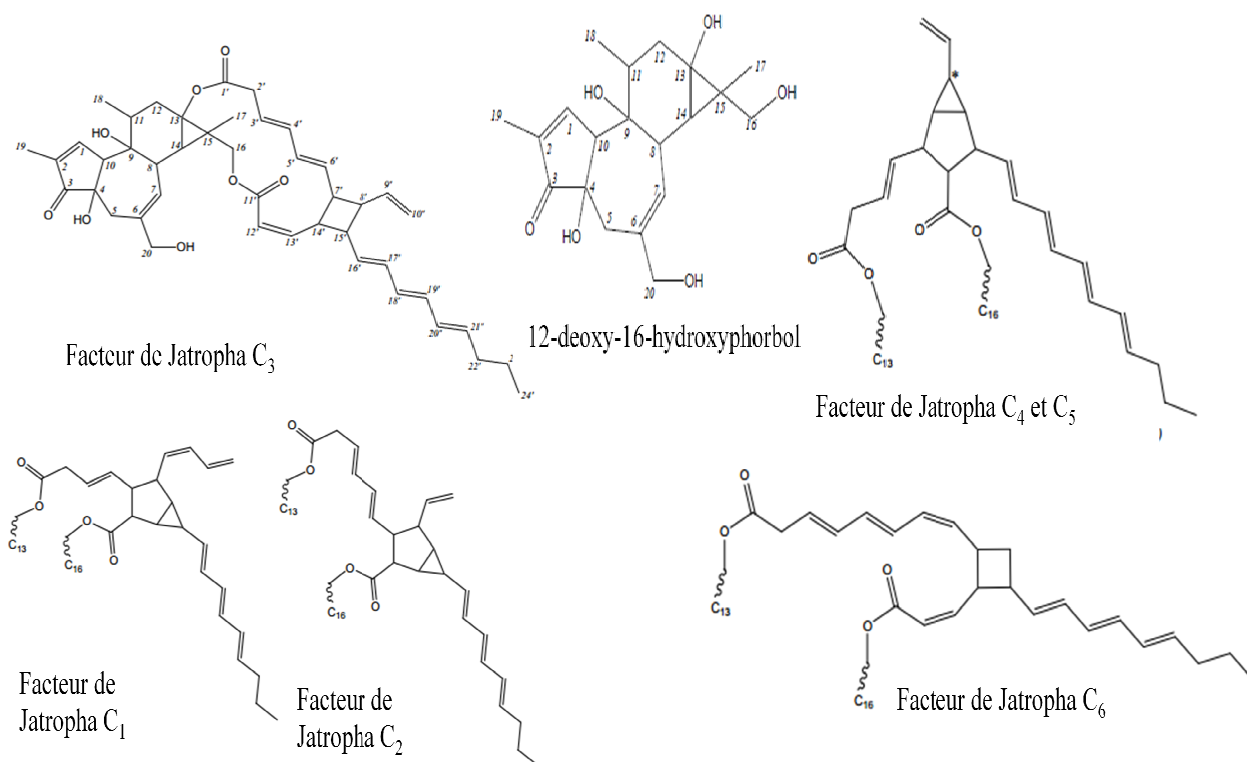


Figure 9. Phorbol esters présents dans l'huile de jatropha (Hass *et al.*, 2002).

D'autres recherches réalisées sur les tiges du jatropha ont montré la présence de trois deoxypreussomerins qui sont des composés appartenant à un groupe relativement nouveau et rare de produits naturels. Ainsi, le premier composé isolé c'est un palmarumycins CP1 qui est déjà connu, alors que les deux autres JC1 et JC2 sont nouveaux (Figure10) (Ravindranath *et al.*, 2004). Srinivas *et al.* (2003) ont montré que ces composés présentent une activité antibactérienne importante contre les bactéries *Staphylococcus aureus*. Ils sont même plus actifs que la pencillin-G utilisée comme contrôle positif.

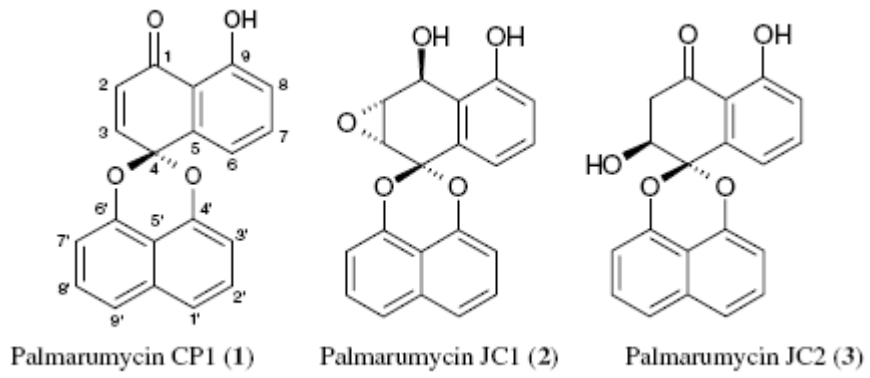


Figure 10. Structure chimique des deoxypreussomerins isolés à partir de la tige du jatropa
(Ravindranath et al., 2004).

Chapitre II: Etude phytochimique des composés phénoliques

Comme la majorité des métabolites secondaires, les polyphénols et essentiellement les flavonoïdes sont synthétisés pour accomplir certaines fonctions lors du développement de la plante. En terme de fonction protectrice, ils défendent la plante contre les pathogènes tels que les moisissures, les champignons et les bactéries. Ils assurent sa protection contre le rayonnement ultraviolet. Certains d'entre eux sont des répulsifs qui inhibent la croissance d'autres espèces. Les polyphénols jouent un rôle structural comme la lignine constituant la rigidité du bois (Buchanan *et al.*, 2000 ; Druyne, 1999). Ils participent à la coloration des fleurs et des fruits à fin d'attirer les insectes pollinisateurs qui transportent les graines dans les fruits (Buchanan *et al.*, 2000).

I- Définition des composés phénoliques

Dans la littérature il existe deux propositions pour définir les polyphénols. La première les définit comme étant une structure moléculaire qui porte plusieurs groupement phénoliques tandis que la deuxième indique la présence d'un groupement phénol polyhydroxylé (Figure 11). Ces polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux pour se défendre contre les agressions environnementales (Buchanan *et al.*, 2000). Il s'agit des dérivés non azotés connus par une grande variété structurale dont environ 8000 composés ont été identifiés (Lobstein, 2010).

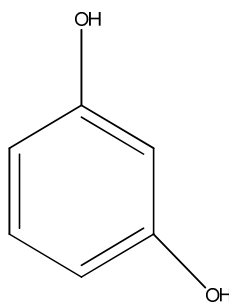


Figure 11. Structure d'unité de base des polyphénols.

II- Classification

Selon Corona (2011) les polyphénols peuvent être répartis en deux classes majeures : les flavonoïdes et les non flavonoïdes.

II-1 Les non flavonoïdes

Cette classe contient plusieurs composés chimiques, parmi les quels : les acides phénoliques, les stilbenes hydroxylés, les coumarines, les lignanes, les lignines et les xanthones.

II-1-1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont rares dans la nature. Ces composés sont formés de deux catégories : la première catégorie contient les acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque qui par monohydroxylation et/ou polyhydroxylation forme des acides phénoliques et des acides polyphénoliques respectivement l'acide gallique et l'acide protocatéchique (Figure 12). La deuxième catégorie regroupe les acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique. De même avec l'acide cinnamique, l'hydroxylation conduit à l'acide p-coumarique et à l'acide caféique (Figures 13) (Haslam, 1994).

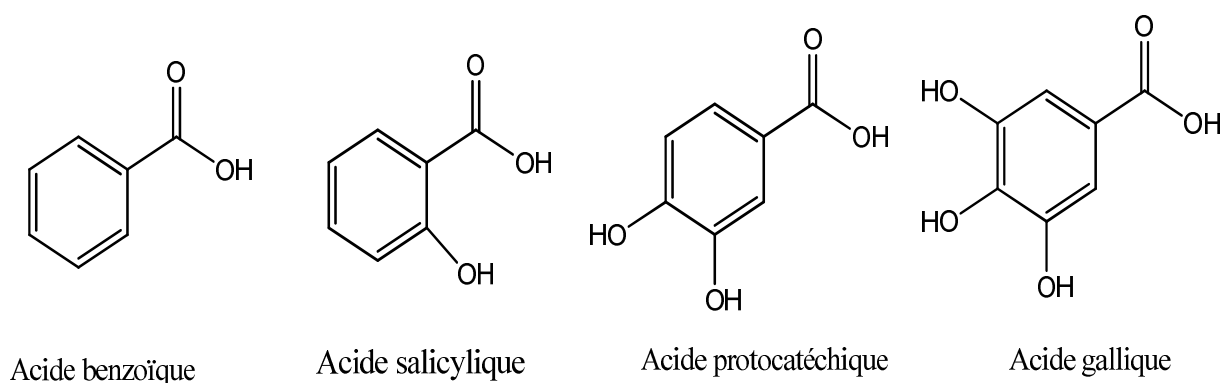


Figure 12. Hydroxylation d'acide benzoïque.

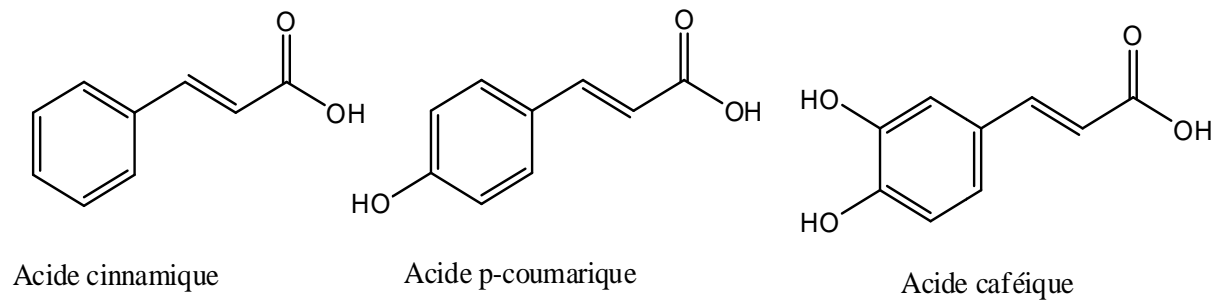


Figure 13. Hydroxylation d'acide cinnamique.

II-1-2 Les stilbenes Hydroxylés

Ces dérivés hydroxylés sont des composés formés de deux noyaux aromatiques liés par un groupe éthylénique (C6-C2-C6) (Lobstein, 2010). Le resvératrol un des stilbenes les plus connus se trouve dans le raisin ainsi que le vin (Cornwell *et al.*, 2004) (Figure14).

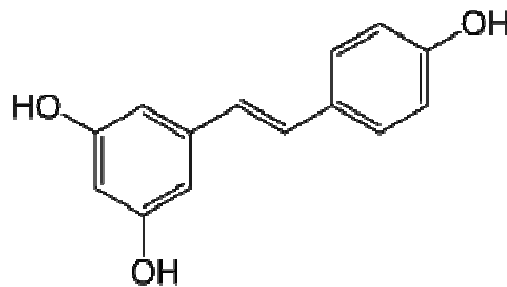


Figure 14. Structure du resvératrol.

II-1-3 Les coumarines

Les coumarines sont composées obtenues par lactonisation de l'acide orthocoumarique. Ces coumarines, une fois hydroxylés sur le noyau aromatique, sont des composés phénoliques à structures variables. Elles sont généralement substituées en C7 par un hydroxyle (Lobstein, 2010). Ces composés possèdent une structure de base : le benzo-2-pyrone. A présent plus de 1000 composés coumariques sont isolés dont plus de 800 sont isolés à partir des plantes et des micro-organismes exemple le mensuol (Figure 15) (Sakagami *et al.*, 2005). Les coumarines sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Anderson *et al.*, 1996).

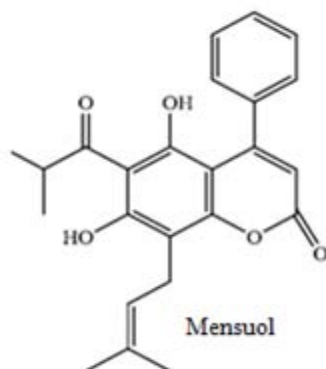
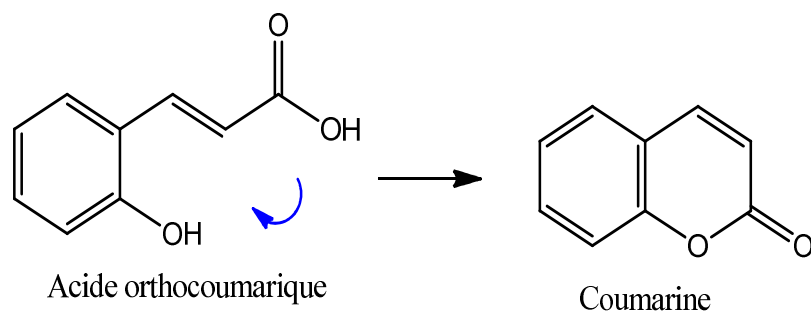


Figure 15. Formation d'une coumarine.

II-1-4 Les lignines et les lignanes

Les lignanes constituent une classe importante de substances naturelles du règne végétale. Il s'agit des dimères ramifiés de phénylpropènes. Ces derniers sont formés par dimérisation de trois types d'alcools : alcool p-coumarique, alcool coniférique et alcool sinapique. Le sécoisolaricirésinol et le matairesinol constituent les principales lignanes d'origine végétale (Axelson *et al.*, 1982) (Figure 16).

La polymérisation de ces trois alcools conduit à la formation de la lignine. Il est à noter que la composition de la lignine diffère d'une espèce à une autre. Une structure précise pour la lignine n'est pas encore connue, mais sûrement elle est très complexe (Buchanan *et al.*, 2000) (Figure 17).

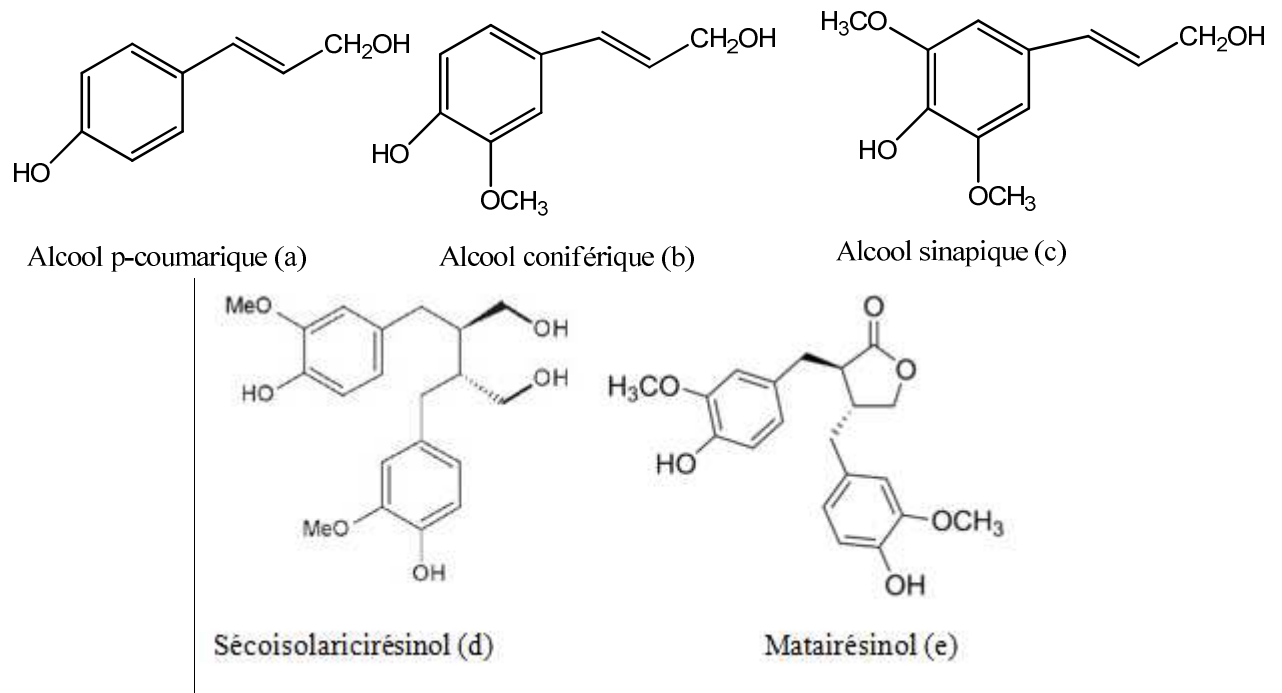


Figure 16. Structure des lignanes.

a, b et c structure des alcools formant les lignanes et les lignines ; d et e exemples de lignanes

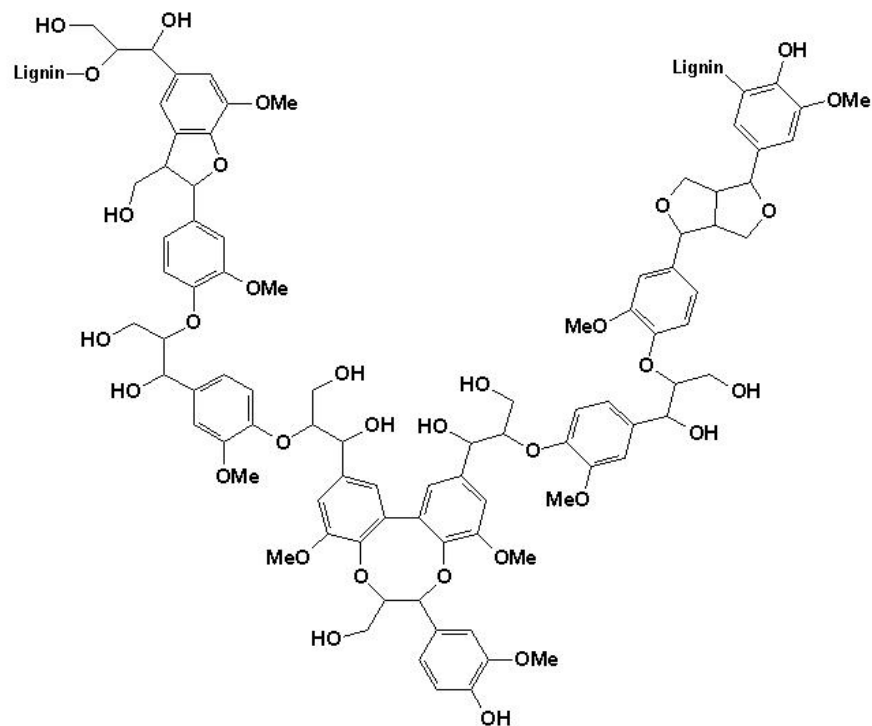


Figure 17. Structure de la lignine.

II-2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la plus vaste classe de composés phénoliques. A présent plus de 4000 composés ont été identifiés soit environ 50% des polyphénols. Ces composés ont une structure de base formé de 2 noyaux benzéniques A et B reliés par un noyau C qui est un hétérocycle pyranique (Lobstein, 2010) (Figure18).

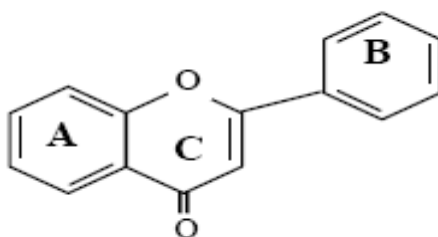


Figure 18. Structure de base des flavonoïdes.

II-2-1 Biosynthèse des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun qui est la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone. Le passage de chalcone en flavonoïde se fait par plusieurs étapes comme la méthylation, la glycosylation et l'acylation (Figure 19). L'enzyme clé de la biosynthèse c'est la chalcone synthase (CHS) qui catalyse la condensation de trois unités acétate à partir de malonyl-COA avec la 4-coumaroyl-COA. L'isomérisation des chalcones par la chalcone isomérase (CHI) conduit à la formation des flavanones. Ces derniers vont subir soit une oxydation par la flavone synthase (FS) et donnent les flavones, soit une réduction par la flavanone réductase (FNR) et donnent des flavanols. Tandis que l'hydroxylation des flavanones par la flavanone-3-hydroxylase (F3H) donne des dihydroflavonols qui peuvent s'oxyder en flavonols par la flavonol synthase (FLS) (Richter, 1993 ; Marfak, 2003).

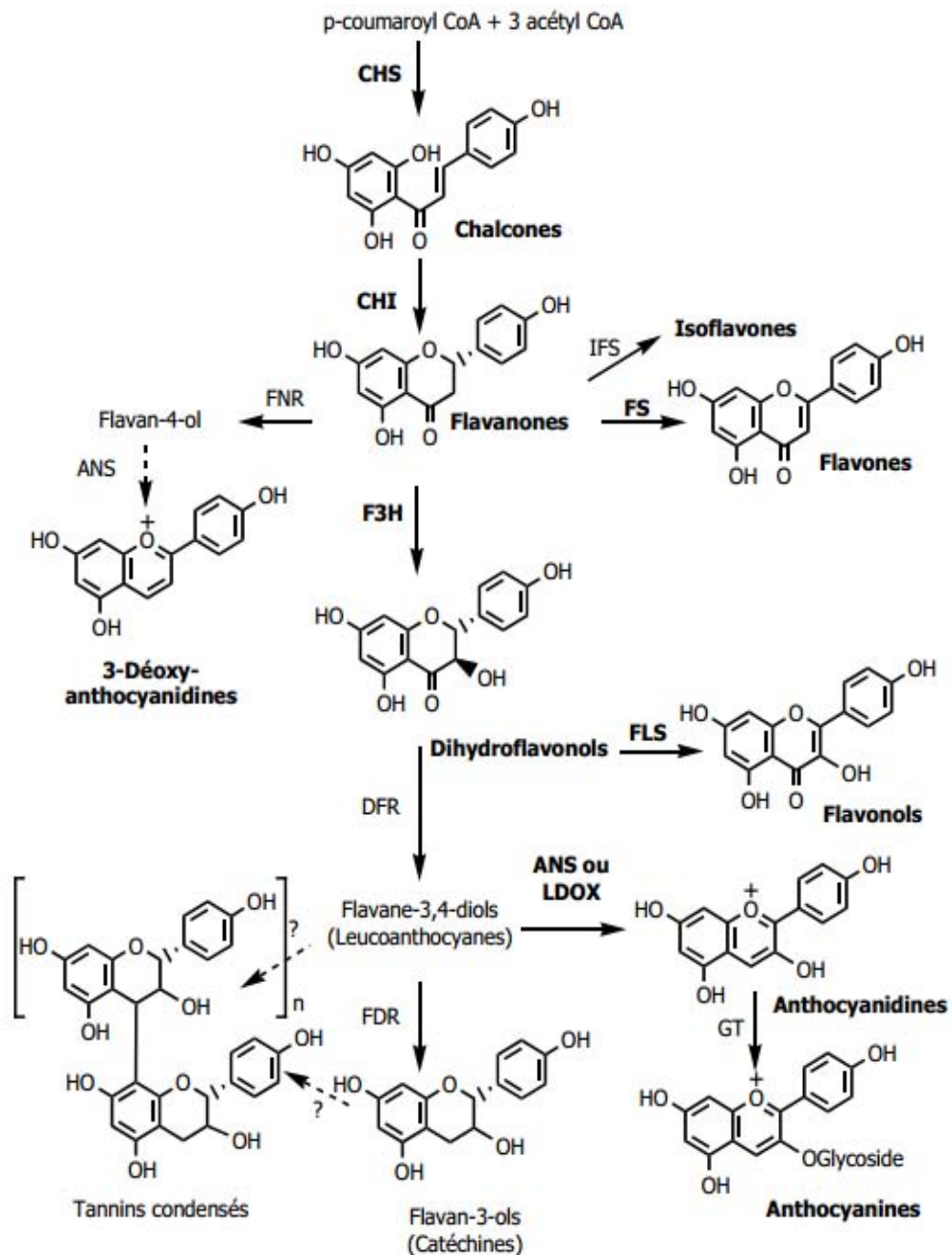


Figure 19. Schéma illustrant la biosynthèse des flavonoïdes.

CHS: chalcone synthase; CHI: chalcone isomérase; FS: flavone synthase; IFS: isoflavone synthase; FNR: flavanone réductase; F3H: flavanone-3-hydroxylase; FLS: flavonol synthase; DFR: dihydroflavonol réductase; ANS: anthocyanidine synthase; GT: glucosyl transférase.

II-2-2 Classification

Comme l'indique la figure 19 plusieurs classes de flavonoïdes apparaissent en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central (Lobestein, 2010).

➤ **Les flavones**

Caractérisés par une structure C6-C3-C6 avec une liaison C2-C3 est insaturé et une fonction cétone tels que l'apigénine et la vitexine (Figures 20 et 21).

➤ **Les flavanes**

Ce sont des composés dont l'hétérocycle central C est saturé et qui n'ont pas de fonction cétone. Les flavanes sont répons dans les écorces des végétaux (Jakupovic *et al.*, 1988). Ces composés sont connus sous forme de monomères ou polymères exemple la catéchine (Figures 20 et 21).

➤ **Les flavanones**

Ce sont des flavones dont l'hétérocycle central C est saturé tels que l'hespérine et la fustine (Figures 20 et 21).

➤ **Les flavonols**

Ce sont des flavones qui se caractérisent par la présence d'un groupement hydroxyle (OH) en position 3 de l'hétérocycle central C tels que le kaempférol, la quercétine et la rutine (Figures 20 et 21).

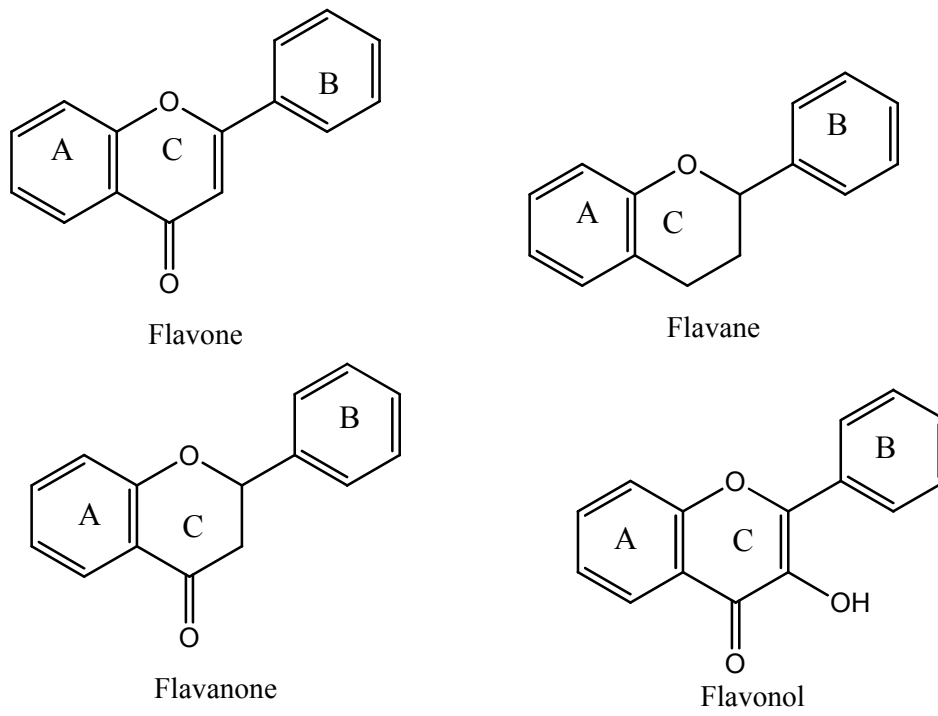


Figure 20. Structure de quelques flavonoïdes.

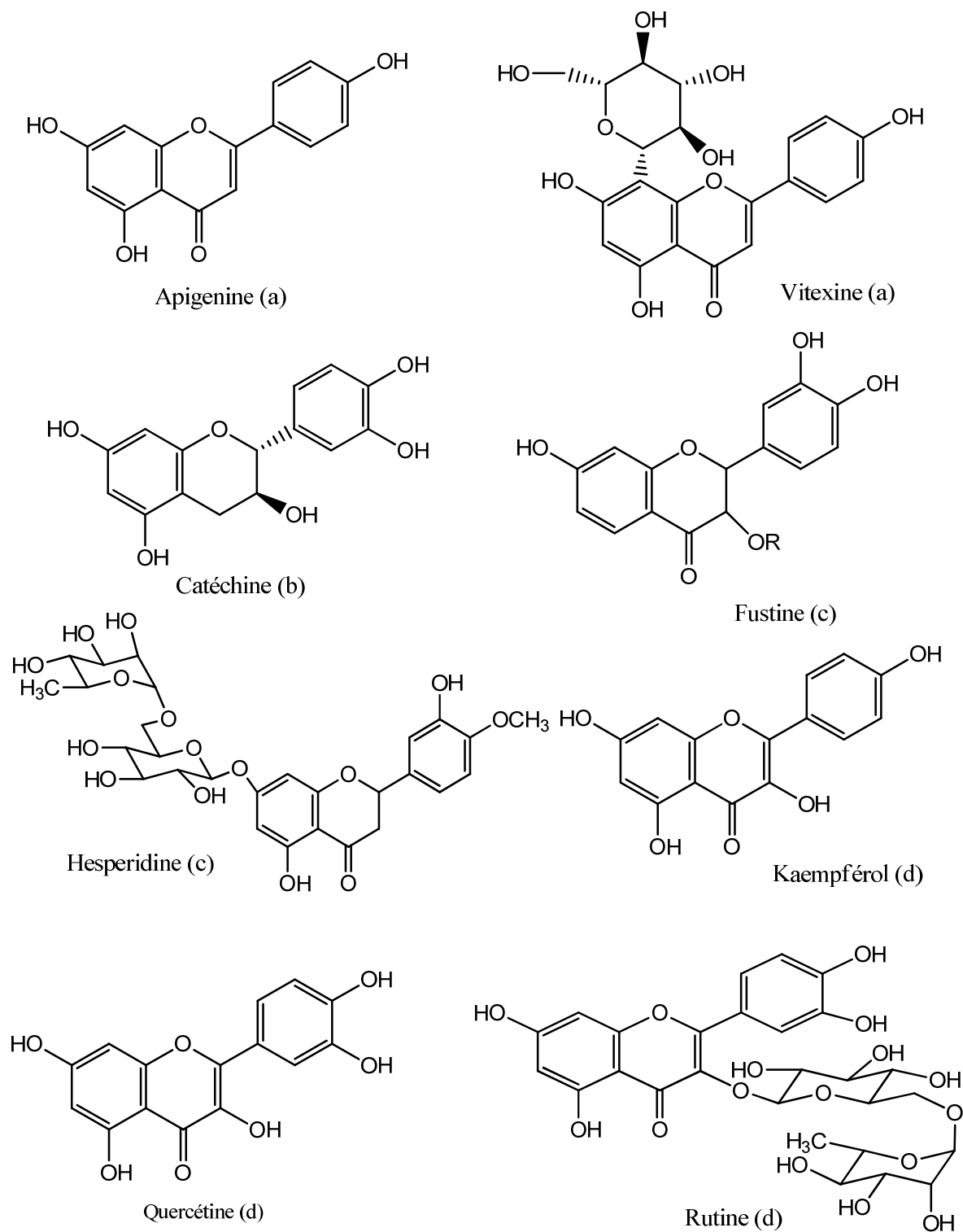


Figure 21. Exemples des Flavonoïdes.

Flavones (a), Flavanes (b), Flavanones (c) et Flavonols (d).

➤ Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des flavonoïdes qui portent une charge sur l'oxygène de l'hétérocycle central C. Ce sont des composés responsables de la plus grande partie des couleurs rouge, violet et bleu observées dans la nature (Buchanan *et al.*, 2000).

Les anthocyanes les plus connus sont la pélargonidine responsable de la couleur rouge ou orangé chez certaines plantes. Deuxième anthocyane connu c'est la cyanidine qui donne une coloration rouge ou rose et enfin la delphinidine responsable de la coloration mauve (Heller et Forkmann, 1993) (Figure22).

Il est à noter que les anthocyanes interviennent directement dans les interactions plantes-animaux et surtout dans l'attraction des pollinisateurs par la couleur des fleurs (Buchanan *et al.*, 2000).

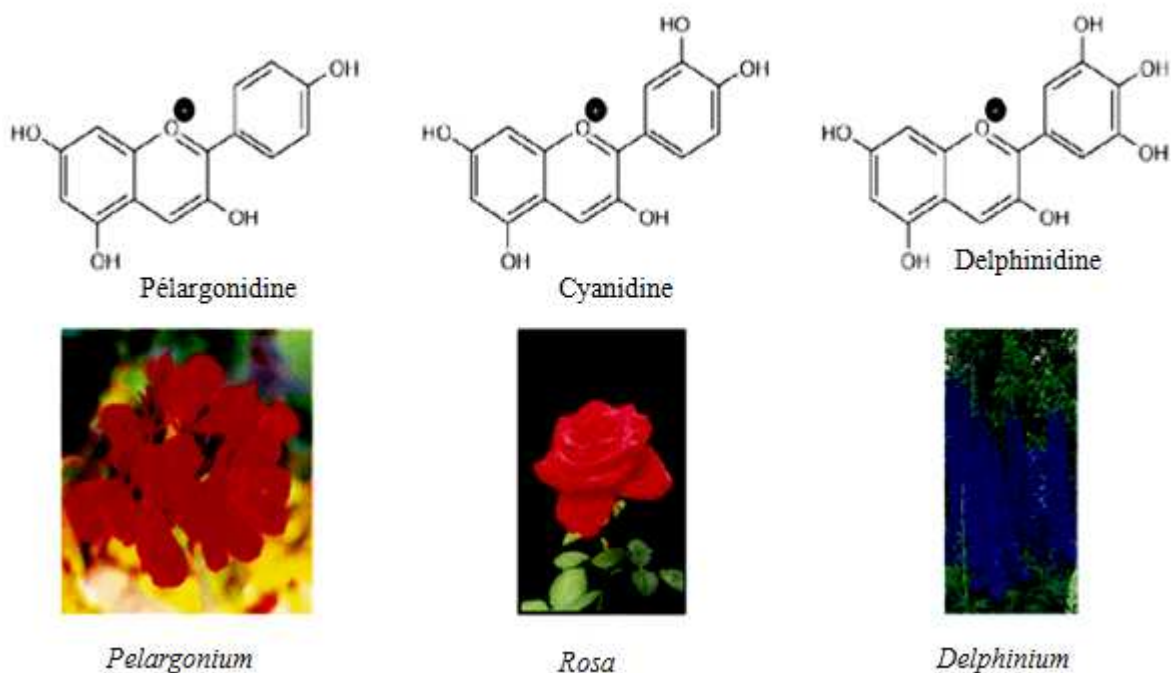


Figure 22. Structure de quelques anthocyanes et leur identification dans la nature (Buchanan *et al.*, 2000).

➤ **Les isoflavonoïdes**

Les isoflavonoïdes se différencient des flavonoïdes par la position C3 sur l'hétérocycle pyranique central C du noyau aromatique B. Ce sont des composés à 15 atomes de carbones comme les flavonoïdes. Ils dérivent d'une structure 1,2- diphénylpropane (Schwarz *et al.*, 2007). Les isoflavonoïdes sont connus essentiellement chez les fabales et surtout la famille des fabacées (Dewick, 1993).

Ces composés sont classés en fonction du degré d'oxydation et de l'existence ou non d'hétérocycles supplémentaires. Ainsi, on trouve les isoflavones, les isoflavanones, les isoflavanols, les isoflavanes, les roténoïdes, les ptérocarpanes, les coumaranochromones et les 3-arylcoumarines (Iwashina, 2000) (Figure 23).

En ce qui concerne leur biosynthèse, les isoflavonoïdes proviennent de la flavanone intermédiaire centrale qui est le 4', 5,7-trihydroxyflavanone dans le cas de la genistéine ou le 4',7-dihydroxyflavanone dans le cas de la daidzéine. Ainsi, la flavanone va subir en premier lieu le départ d'un radical hydrogène à C3 suivi de la migration du cycle B ainsi que l'hydroxylation du radical C2. L'enzyme responsable de cette transformation est l'isoflavone synthase (IFS) (Jung *et al.*, 2000) (Figure 19).

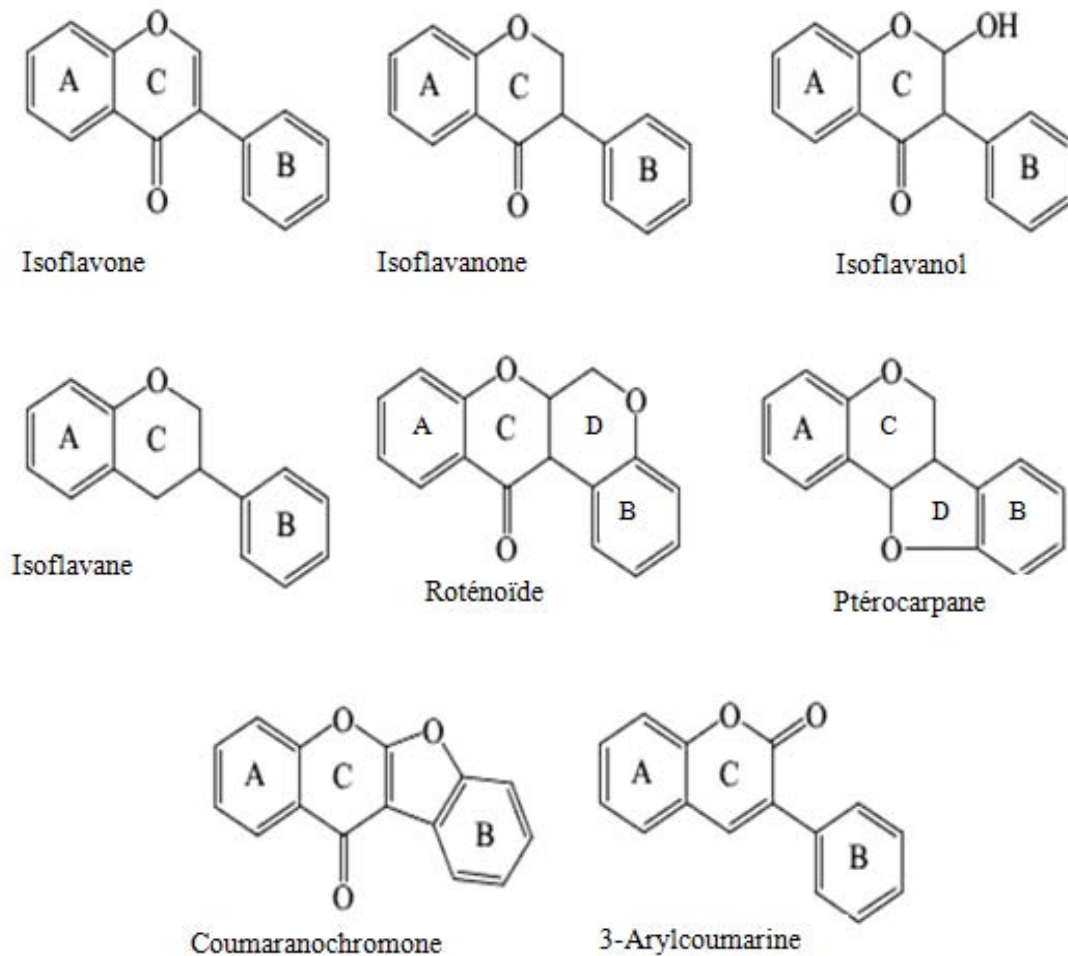


Figure 23. Structure des isoflavonoïdes.

➤ Les chalcones et les aurones

Les chalcones sont des composés phénoliques dépourvus de cycle pyranique central C. Ainsi, ces composés présentent deux cycles aromatiques A et B reliés par une chaîne tricarbonée cétonique α, β insaturé (Figure24). Exemple des chalcones : la derricine, la pseudo-isocordoïne et l'orotinchalcone (Figure25).

En ce qui concerne les aurones, il s'agit des isomères structuraux des flavones. Ces molécules dérivent des chalcones, l'exemple le plus connu est celui de la liptosidine (Figure26).

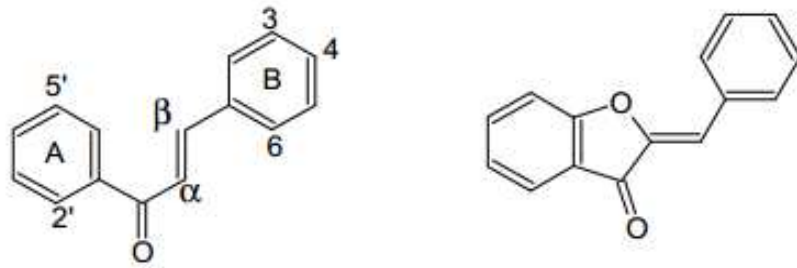


Figure 24. Structure de base des chalcones et des aurones.

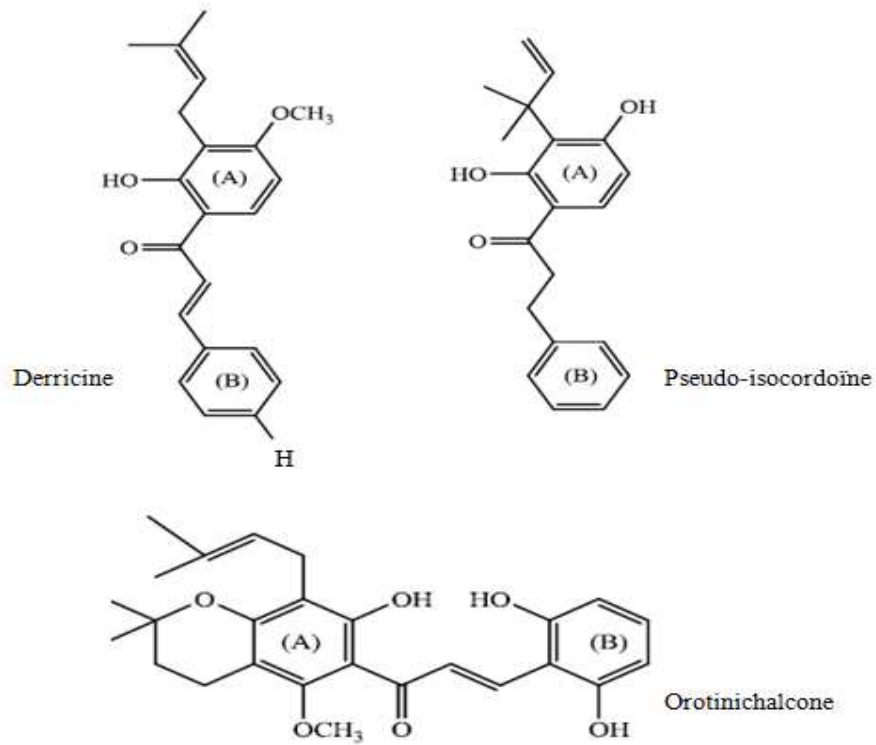


Figure 25. Structure des quelques chalcones.

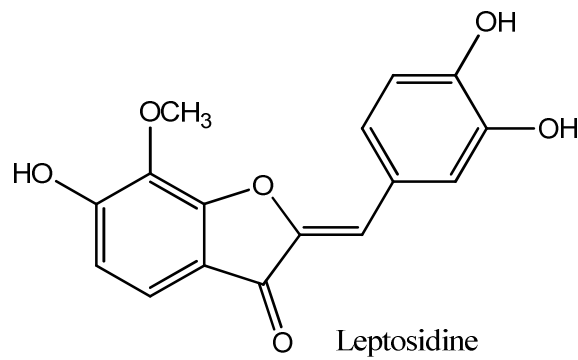


Figure 26. Structure d'un aurone.

➤ Les Xanthones

Ce sont des composés à base caractéristique tricyclique, elle comprend deux cycles benzéniques aromatiques qui entourent un hétérocycle oxygéné. Les xanthones des végétaux supérieurs sont formés par cyclisation des benzophénones résultant de l'addition d'unités bicarbonées sur l'acide benzoïque issu de l'acide cinnamique (Hay, 2003 ; Bennett et Lee, 1989) (Figure27).

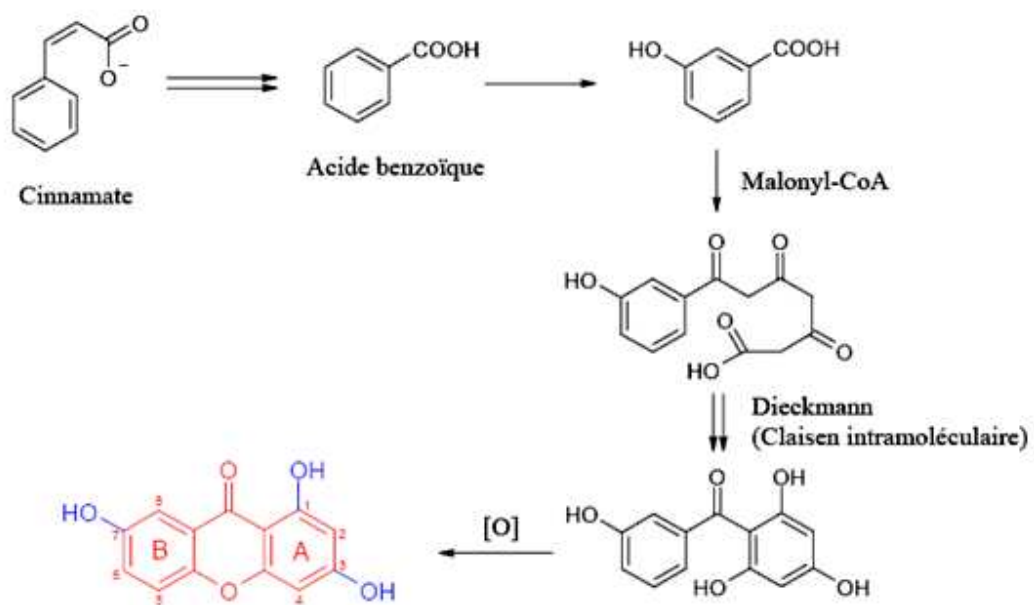


Figure 27. Schéma de biosynthèse des xanthones.

➤ Les tannins

Les tannins (ou tanins) sont des composés polyphénoliques utilisés pour tanner les peaux. Les tannins ont plusieurs activités biologiques. Des études ont montré que des nombreux tannins présentent des propriétés antioxydants. Ces composés présentent une grande capacité de piégeage des radicaux libres et aussi dans l'inactivation des ions pro-oxydants (Bruneton, 1999).

D'autres tannins présentent une activité antiseptique importante. En effet, ils présentent des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales assez spectaculaires (Chung *et al.*, 1998).

Selon leurs structures biochimiques, on distingue deux classes de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

- Les tannins hydrolysables

Ces tannins sont des dimères d'acide gallique condensés sur des dérivés glycosyles. Ces composés donnent après hydrolyse à chaud à l'aide de solutions acides étendues une fraction glucidique (glucose) et une fraction polyphénolique exemple la brevilagine 1 et 2 (Doat, 1978) (Figure28).

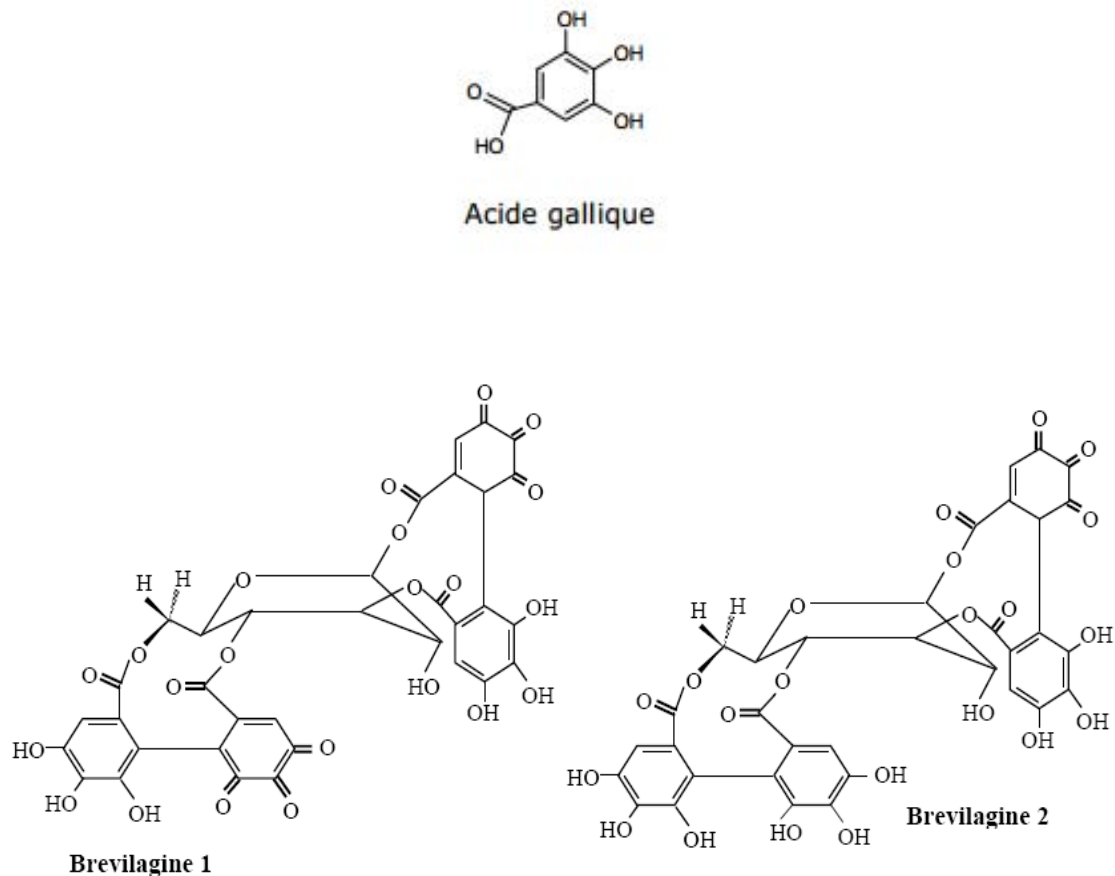


Figure 28. Structure de quelques tannins hydrolysables.

- Les tannins condensés

Ces composés sont appelés aussi proanthocyanidines. Ces composés possèdent comme structure de base le flavan-3-ol ou le flavan-3,4-diol (Bruneton, 1999). Ces tannins ne renferment pas de sucres dans leurs molécules. Ils ne sont pas hydrolysés par les acides comme c'est le cas des tannins hydrolysables. Ils se transforment en présence d'acide fort ou d'agents d'oxydation en substances rouges qui sont les phlobaphènes (Ngom, 2000). Les tannins condensés donnent une structure hérissée du groupement hydroxyle OH du composé phénolique pour former des liaisons avec les protéines (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006) exemple la profisetinidine et la proguibourtinidine (Figure 29).

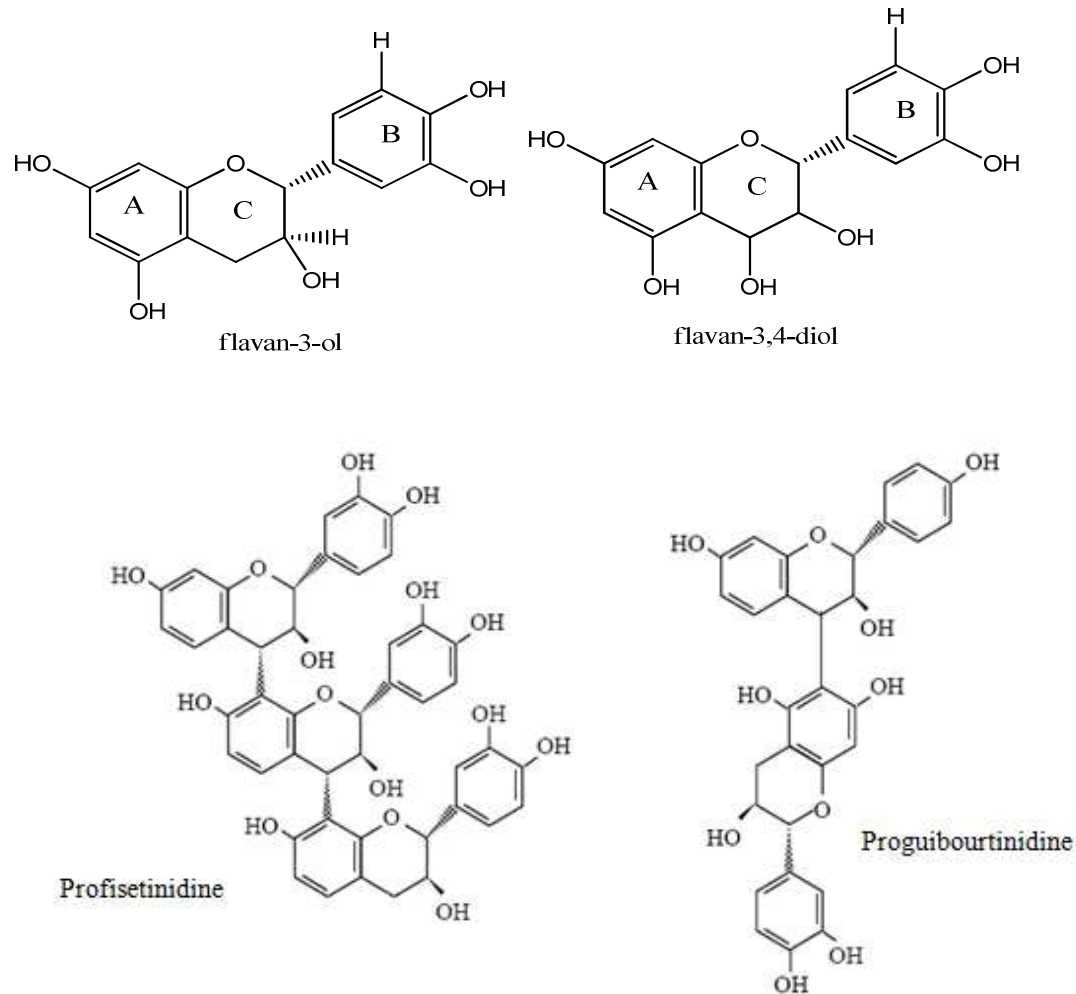


Figure 29. Structure de quelques tannins condensés.

III- Activités biologiques des polyphénols

Les polyphénols sont connus pour leurs activités biologiques qui sont en relation directe avec la santé de l'être humain. Ainsi, Halliwell (1994) confirme que les polyphénols sont connus par leurs activités anti-oxydantes. En effet, en conditions physiologiques, le dioxygène produit au niveau des mitochondries des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est toxique pour l'intégralité de la cellule. Dans ce cas l'activité anti-oxydante des polyphénols peut se faire par piégeage direct des ERO aussi bien en phase aqueuse qu'en phase organique. Ces polyphénols peuvent agir aussi par deux autres mécanismes d'actions : un premier consiste à l'inhibition des enzymes pro-oxydantes et la chélation des ions métalliques et un deuxième consiste à la protection des systèmes biologiques de défenses anti-oxydantes. L'étude de Halliwell a montré que l'activité anti-oxydante des polyphénols est déterminée par leurs structures, en particulier la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique. Par la suite Fuchs (1998) a montré que les polyphénols sont connus dans la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par les rayons solaires, raisons pour les quelles les polyphénols sont présents comme ingrédients dans plusieurs préparations cosmétiques utilisées dans le traitement du vieillissement cellulaire et la protection de la peau (Menaar *et al.*, 2014).

Des études plus récentes ont montré que les polyphénols présentent une activité anti-bactérienne importante (Ferrazzano *et al.*, 2011). Ces composés agissent par deux mécanismes d'actions : un premier consiste à l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique dans les bactéries (Wu *et al.*, 2013) et un deuxième provoquant l'endommagement des membranes cellulaires des bactéries (Tsuchiya et Linuma, 2000).

Les polyphénols et en particulier les flavonoïdes comme les xanthones, la quercétine, la gossypétine, la myricétine et l'epicatechin-3-gallate ont été révélés comme des inhibiteurs

efficaces de l'acétylcholinestérase (AChE) qui est l'enzyme cible dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Brühlmann *et al.*, 2004). Ces produits naturels agissent en inhibant l'AChE ce qui va corriger le déficit de l'acétylcholine et améliorer son niveau dans le cerveau. Ainsi, l'augmentation du niveau de l'acétylcholine est le premier précurseur du traitement de la maladie d'Alzheimer (Heinrich et Theoh, 2004).

Huang et Lin (2012) ont montré que les polyphénols sont aussi utilisés pour diminuer du taux de cholestérol dans le sang.

Les flavonoïdes ont été utilisés dans le traitement des affections hépatiques. Ainsi, un mélange constitué de composés de type flavolignane et flavanone appelé silymarine, testée sur un modèle expérimental animal, a montré qu'elle exerce un effet positif sur les hépatocytes intacts et sur les cellules hépatiques endommagées irréversiblement (Magliulo *et al.*, 1973).

Autre étude réalisée par Martin *et al.* (1994) montre que les flavonoïdes présentent un effet antiallergique. Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des cellules impliquées dans les réponses immunitaires : les mastocytes et les basophiles.

Les polyphénols présentent d'autres activités anti-inflammatoire (Sakurai *et al.*, 2010) et antivirale et en particulier anti-HIV (Liu *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes et en particulier la naringine, la quercétine et l'hypolaétine-8-glucose isolé des espèces du genre *Sideritis*, présente une activité antiulcéreuse importante, ils sont capables de protéger la muqueuse gastrique contre divers agents ulcérogènes (Villar *et al.*, 1987).

D'autres études ont montré que les flavonoïdes présentent des effets protecteurs vasculaires. Ils agissent sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique (Berg et Daniel, 1988). Cette activité intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale (Shih *et al.*, 2004 ; Youdim *et al.*, 2002). Les flavonoïdes présentent une activité antidiabétique, ils

agissent par inhibition de l'aldose réductase du cristallin (Chaudhry *et al.*, 1983), exemple lamyricétine qui présente des effets hypoglycémians et hypotriglycéridémians chez les animaux diabétiques (Ong et Khoo, 1997).

Plus récemment, Mena *et al.* (2014) indiquent que les polyphénols isolés des extraits des végétaux peuvent être utilisés dans la chimiothérapie. D'autres études ont montré qu'une alimentation riche en polyphénols et en particulier en flavonoïdes diminue le risque de cancer (Block *et al.*, 1992). Ainsi, ces flavonoïdes peuvent agir en affectant la promotion des tumeurs au début de la cancérogenèse par une augmentation des processus de désintoxication exemple les flavonoïdes d'agrumes qui sont connus comme des inhibiteurs d'ornithine décarboxylase promoteur du cancer de la peau (Manach *et al.*, 1996).

Chapitre III: Méthodes d'analyse physico-chimiques

I- Etude par spectrophotométrie (UV-visible)

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode d'analyse couramment utilisée dans les laboratoires. Elle est basée sur la capacité des molécules à absorber les radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. Le domaine UV-visible s'étend environ de 10 à 800 nm avec l'UV lointain entre 10 et 200 nm, le proche UV entre 200 et 400 nm et le visible entre 400 et 800 nm. La spectroscopie UV-visible présente un large domaine d'application. Elle est utilisée en chimie minérale, chimie organique, biochimie, analyses médicales et analyses quantitatives. Cette large utilisation est surtout due à sa grande sensibilité (limite de détection 10^{-5} M), sa précision (1-5% d'erreur), sa rapidité et sa simplicité d'utilisation (Guedira, 2009).

I-1 Principe

La spectrophotométrie consiste surtout à mesurer l'absorbance dans le domaine UV/Visible. Cette absorption est due au passage d'un électron d'un niveau énergétique à un niveau énergétique supérieur avec une modification des états de vibration et de rotation. Ainsi, l'électron passe d'une orbitale moléculaire à une autre (Galez, 2011).

D'une manière générale, la solution dont on désire étudier l'absorption est placée dans une cuve en quartz à faces transparentes et parallèles, et qui est traversée par un faisceau optique perpendiculairement à ces faces. Après avoir fixé une longueur d'onde, la lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 traverse la cuve contenant la solution et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. La valeur affichée par l'appareil est l'absorbance à cette longueur d'onde (Ludovic, 2006).

I-2 Appareillage

Pour la plupart des spectrophotomètres UV-visible, les lampes utilisées sont des lampes au deutérium. Ces lampes au deutérium émettent un rayonnement dont les longueurs d'onde sont comprises entre 180 et 400 nm. Pour la partie visible du spectre, les plus utilisées sont les lampes halogène au quartz à filaments de tungstène dont le rayonnement est compris entre 350 et 1300nm. La présence de l'halogène augmente sensiblement la durée de vie de la lampe (1500 à 2000 heures). Ces deux lampes sont donc utilisées de façon complémentaire et simultanée pour couvrir la totalité du spectre UV-visible (Clark *et al.*, 1993).

Les monochromateurs sont utilisés pour sélectionner une longueur d'onde parmi le spectre de raies du rayon incident. En général, le monochromateur est placé entre l'échantillon et la source, ce qui protège les échantillons du rayonnement. Il est avéré que ce montage optique est complexe ce qui ralentit le système de balayage. Les monochromateurs sont caractérisés par un large domaine spectral et une haute résolution. Le type de détecteur utilisé est monocanal.

En ce qui concerne les polychromateurs, ils sont utilisés dans les spectrophotomètres à détecteurs multiples. Le polychromateur est placé derrière l'échantillon d'où l'échantillon reçoit tout le rayonnement UV. Contrairement au montage avec le monochromateur, il s'agit dans ce cas d'un montage sans pièces mobiles donnant une bonne reproductibilité des mesures. Ces polychromateurs sont caractérisés par un domaine spectral peu étendu et une diminution de la résolution (Clark *et al.*, 1993). Dans ce cas, le type de détecteur est à multicanaux.

Le signal est recueilli grâce à un microprocesseur à la sortie de chacun des détecteurs.

I-3 Analyses qualitatives

Le spectre UV-visible ne permet pas l'identification d'un produit mais celle du groupement chromophore qu'il contient. En effet, le groupement chromophore est définit

comme étant l'entité la plus simple qui permet l'absorption d'un photon. En milieu organique, il s'agit principalement des molécules contenant un ou plusieurs noyaux aromatiques, des poly-insaturés conjugués et dans une moindre mesure, des groupements C=O, N=O ou N=N. Dans le cas des phénols, le doublet libre de l'oxygène se conjugue avec les systèmes d'électrons π du noyau aromatique ce qui provoque une absorption dans la région 210-300 nm. Dans l'eau, le phénol possède deux bandes à 270 nm et à 210 nm. En solution basique, les phénols se transforment en ions phénates et il en résulte un fort effet bathohyperchrome utilisable au point de vue analytique (Guedira, 2009).

I-4 Analyses quantitatives

La spectrophotométrie par absorption UV-visible peut être utilisée pour effectuer des mesures quantitatives. En effet, l'absorbance des composés est exploitée en analyse quantitative par l'application de la loi de Beer-Lambert. Ainsi, plus un composé est absorbant, plus la transmittance est faible et plus l'absorbance est élevée.

L'absorbance, notée A, est donnée par la relation suivante : $A = \text{Log} (I_0 / I) = \epsilon l C$ avec I_0 est l'intensité lumineuse incidente, I est l'intensité lumineuse transmise par l'échantillon, le Log est un logarithme décimal, ϵ est le coefficient d'absorption molaire, l est la largeur de la cuve et C est la concentration de la solution.

Pour la transmittance, notée T, est donnée par la formule suivante: $T = I_0 / I$ d'où $A = -\text{Log}(T)$ (Galez, 2011).

I-5 Mesures cinétiques

La cinétique d'une réaction peut être déterminée par la mesure de la variation de la concentration à la fois d'un réactif ou d'un produit en fonction du temps. Ainsi, vu que l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration, la spectrométrie d'absorption constitue une bonne méthode pour suivre le déroulement d'une réaction.

Ainsi, soit la réaction $A + B \rightarrow C + D$

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^m k[B]^n = k[C]^{m'} k[D]^{n'}$$

Avec k est la constante de vitesse pour la réaction considérée.

m, m', n et n' sont les ordres partiels de la réaction par rapport à A, B, C et D respectivement.

En suivant l'évolution de A = f(t), on détermine C = f(t), ceci permet de tracer C = f(t) et de déduire l'ordre de la réaction à partir de l'allure de la courbe.

II- Etude par chromatographie

II-1 Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation des constituants d'un mélange. Cette séparation est basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, une phase stationnaire ou fixe et une phase mobile (Lavallaz et Délétroz, 1994).

II-2 Principe

La chromatographie consiste à entrainer les différentes molécules contenues dans un mélange pour les séparer en fonction de leurs vitesses d'élutions. Les molécules sont adsorbées sur un support fixe qui est la phase stationnaire et désorbées par l'éluant. Il y a donc une distribution ou partition des composants du mélange plus ou moins rapide entre ces deux phases. Les différents constituants du mélange sont récupérés séparément dans plusieurs fractions (Panaiva, 2006).

Au cours de notre étude nous avons utilisé deux types de chromatographies : la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS).

II-3 La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance consiste à exploiter les interactions des solutés avec deux phases l'une mobile et l'autre stationnaire sous haute pression. Les

solutés derniers sont séparés en fonction de plusieurs paramètres tels que l'affinité du soluté dans l'éluant, la polarité ou la charge électrique. Après leur séparation, les solutés sont identifiés et dosés à l'aide d'un détecteur couplé à la colonne chromatographique (Panaiva, 2006).

Le mode de fonctionnement de la HPLC est largement décrit. Ainsi, à un instant donné, le mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne, et se trouve entraîné par la phase mobile. Les constituants du mélange sont ensuite recueillis et identifiés en fonction de leurs vitesses d'adsorption et de désorption.

La chromatographie aboutit à un tracé représentatif de constituant (pic) en fonction de leur temps de rétention à la sortie de la colonne : c'est un chromatogramme (Panaiva, 2006).

II-3-1 Appareillage

Selon Panaiva (2006), la HPLC est composée des éléments suivants :

La colonne : généralement c'est un tube en acier de 5 à 15 cm de longueur et de diamètre de 5 mm qui contient une phase stationnaire. Il existe plusieurs types de phases stationnaires parmi les quelles on trouve principalement

- Les silices non greffées
- Les silices greffées par des groupements polaires pour les quelles l'éluant utilisé est apolaire. On parle alors de chromatographie en phase normale.
- Les silices greffées par des groupements apolaires (chaines carbonées linaires plus ou moins longues), pour les quelles l'éluant utilisé est polaire, dans ce cas il s'agit de chromatographie en phase inverse.

Injecteur : il est constitué d'une vanne haute pression appelé vanne rhéodyne et d'une boucle d'échantillonnage d'une capacité comprise entre 10 et 50 μ l. Cette boucle permet une fois remplie de déposer l'échantillon à l'entré de la colonne sans perte de pression.

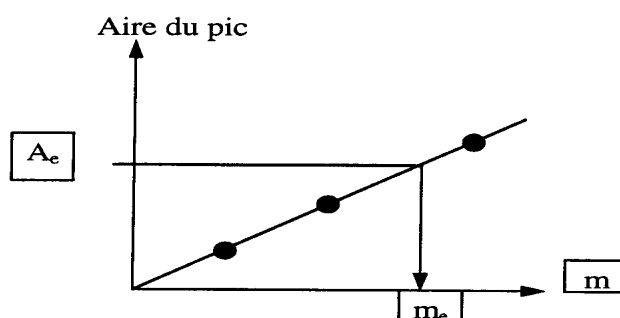
La pompe : elle permet d'introduire la phase mobile dans l'appareil sous un débit constant et à forte pression.

Détecteur : il existe plusieurs types de détecteurs. Parmi les quels, des détecteurs à absorptiométrie dans l'UV-Visible, des réfractomètres différentiels ou des détecteurs électrochimiques.

II-3-2 Analyses

L'analyse qualitative permet d'identifier les différents constituants d'un mélange. Elle est réalisée par comparaison des temps de rétentions (t_R en min) à ceux d'étalons commerciaux élues dans les mêmes conditions.

L'analyse quantitative est basée sur le calcul des aires des pics du chromatogramme. Ces aires sont proportionnelles aux concentrations des produits analysés. Pour un composé déterminé, la comparaison de l'aire à celle de l'étalon correspondant permet de le quantifier. A cet effet, une courbe d'étalonnage qui présente l'aire en fonction de la concentration est établie. L'injection ultérieure du même volume (v) de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de déterminer la masse ou la concentration de l'échantillon.



Avec $A_e / m_e = A_{et} / m_{et}$ dont A c'est l'aire des pic, e c'est l'échantillon, et c est l'étalon et m c'est la masse du produit.

II-4 La chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS)

La Chromatographie en Phase Gazeuse permet de séparer les molécules d'un mélange. Cette technique s'applique aux composés susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Le mélange de solutés à analyser est vaporisé à l'intérieur d'une colonne par un injecteur qui est porté à une température appropriée à la volatilité de l'échantillon. Le mélange est transporté à l'intérieur de la colonne grâce à un gaz vecteur. Dans cette colonne, une substance active appelé phase stationnaire qui peut être liquide ou solide est présente. Le gaz porteur est inerte vis-à-vis des solutés et de la phase stationnaire. Les différentes molécules vont se séparer en fonction de leurs vitesses d'adsorption et de désorption puis sortir de la colonne les unes après les autres, ce temps de rétention dépendant de leur affinité avec la phase stationnaire. A la sortie de la colonne, un détecteur qui dans notre cas est un spectromètre de masse caractérise et quantifie chacun des constituants (Bouchonnet et Libong, 2004).

II-4-1 Appareillage

Selon Panaiva (2006), la GC-MS est formé de trois parties : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur qui est dans ce cas un spectromètre de masse.

L'injecteur : il s'agit d'une zone chauffé où le mélange à étudier est injecté à l'aide d'une seringue. Le mélange est ensuite vaporisé puis il est véhiculé par le gaz vecteur jusqu'au détecteur.

La colonne capillaire : appelée aussi colonne analytique, est placée dans un four. La colonne est le composant le plus important pour la séparation chromatographique. Elle est formée d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est couverte d'un film chimique qui forme la phase stationnaire alors que la paroi externe forme un revêtement en polyimide qui assure la souplesse de la colonne. Le choix de la phase stationnaire dépend du type de solutés à séparer.

Ainsi une phase stationnaire polaire assurera une bonne séparation des composés polaires et une phase stationnaire apolaire assurera une bonne séparation des composés apolaires.

Le détecteur : il peut être un spectromètre de masse, qui contrairement aux autres détecteurs, fournit des informations structurales sur les molécules étudiées et permet par la suite de les caractériser soit à l'aide de bibliothèque des spectres soit par une étude de leurs fragments.

II-4-2 Analyses

Quantitativement, les données du GC-MS permettent d'identifier les différents composés du mélange à analyser par comparaison du spectre de masse obtenu à celui contenu dans une bibliothèque de spectres de composés.

Qualitativement, les aires des différents pics permettent de déterminer la concentration de chacun des composés présents dans le mélange étudié.

2^{ème} Partie: Matériels et méthodes

I- Echantillonnage

I-1 Partie expérimentale

Les travaux se sont déroulés en deux temps avec une phase de terrain et l'autre en laboratoire. Concernant la phase de terrain, elle a consisté à la collecte des feuilles, des graines matures ainsi que des racines des deux espèces étudiées : *Ricinus communis* L. et *Jatropha curcas* L. Quant aux travaux de laboratoire, ils ont été conduits au Laboratoire de Chimie et Physique Approche Multi-échelles des Milieux Complexes (LCP-A2MC) à l'Université de Lorraine (France) et à la Faculté des Sciences de Bizerte relevant à l'Université de Carthage (Tunisie). L'identification des plantes des deux espèces étudiées a été réalisée au sein du Laboratoire d'Ecologie forestière à l'Institut National de Recherche en Génie Rural Eaux et Forêts (INRGREF-Tunisie).

I-1-1 *Ricinus communis* L.

L'échantillonnage a concerné une dizaine d'individus de ricin appartenant à huit régions de la Tunisie, à savoir : Riadh Andalous (RA), Nefza (N), Béja (B), Nabeul (Nb), Hammamet (H), Bouficha (Bf), Khanguet Hajej (KH) et Aouled Amer (AA). Ces provenances sont réparties au nord et au centre du pays dans des étages bioclimatiques allant de l'humide vers l'aride supérieur (Abdelkefi et *al.* 1996) (Tableau 1 et Figure 30).

I-1-2 *Jatropha curcas* L.

La collecte du matériel végétal a été réalisée dans la station expérimentale de Nabeul (Tunisie) sur une dizaine d'individus. Dans cette station, huit populations de jatropha provenant d'Arusha Tanzanie (P1), Mozambique (P2), Paraná Brésil (P3), Norte de Minas Brésil (P4), Mato Grosso Brésil (P5), Regiao sudeste Brésil (P6), Vale do Jequitinhonha Brésil (P7) et Suriname (P8) ont été retenues pour cette étude (Tableau 2).

Tableau 1. Données sur les sites d'échantillonnage du ricin.

Localisation	Nom du site	Coordonnées géographiques	Altitude (m)	Etage bioclimatique	Date de récolte
Nord	Riadh	Latitude 36°52'38''N	48	Semi-aride	03/11/2011
	Andalous	Longitude 10°10'08''E			
Nord ouest	Nefza	Latitude 36°59'38''N	27	Humide	06/11/2011
		Longitude 9°03'25''E			
	Béja	Latitude 36°43'31''N	212	Subhumide	06/11/2011
		Longitude 9°11'31''E			
Nord est	Nabeul	Latitude 36°27'15''N	12	Semi-aride	01/11/2011
		Longitude 10°44'05''E			
	Hammamet	Latitude 36°24'03''N	15	Semi-aride	01/11/2011
		Longitude 10°36'52''E			
	Bouficha	Latitude 36°18'00''N	10	Semi-aride	03/11/2011
		Longitude 10°27'18''E			
	Khanguet	Latitude 36°37'00''N	47	Semi-aride	02/11/2011
	Hajej	Longitude 10°24'59''E			
Centre	Aouled Amer	Latitude 35°37'06''N	13	Aride supérieur	07/11/2011
		Longitude 9°55'56''E			



Figure 30. Répartition de différentes populations de ricin étudiées sur la carte de la Tunisie.

Tableau 2. Données sur l'origine géographique des provenances de jatropha.

Provenance	Origine géographique	Coordonnées géographiques	Altitude (m)	Date de récolte
Arusha	Tanzanie	Latitude 3°22'00''S Longitude 36°41'00''E	1413	24 Août 2011
Mozambique	Mozambique	Latitude 18°31'07''S Longitude 35°28'51''E	83	24 Août 2011
Paraná	Brésil	Latitude 25°12'18''S Longitude 52°02'13''O	859	24 Août 2011
Norte de Minas	Brésil	Latitude 20°58'00''S Longitude 41°59'00''O	1069	24 Août 2011
Mato Grosso	Brésil	Latitude 12°29'52''S Longitude 56°53'34''O	361	24 Août 2011
Regiao sudeste	Brésil	Latitude 20°10'20''S Longitude 40°15'19''O	778	24 Août 2011
Vale do Jequitinhonha	Brésil	Latitude 16°26'07''S Longitude 41°00'11''O	225	24 Août 2011
Suriname	Suriname	Latitude 3°55'43''S Longitude 56°02'22''O	271	24 août 2011

I-2 Matériel végétal

I-2-1 Les feuilles

Une fois récoltées les feuilles des deux espèces étudiées sont lavées à l'eau distillée et séchées à l'abri de la lumière pour éviter la perte des substances actives. Ce séchage est effectué dans un endroit protégé afin d'éviter la contamination causée par la poussière, les insectes ravageurs ou les rongeurs. Les feuilles sont étalées en couches minces pour optimiser le séchage afin d'éviter les moisissures.

Après séchage les feuilles sont broyées dans un broyeur à marteaux. 200 grammes de poudre obtenue pour chaque population sont stockés dans de petits sacs en plastique et étiquetés en fonction de leur provenance puis conservés à l'ombre.

I-2-2 Les racines

Juste près leur récolte, les racines des deux espèces sont débarrassées des salissures à l'eau du robinet puis lavées à l'eau distillée. On procédera ensuite à un séchage réalisé dans une chambre aérée. Dès que les racines sont bien séchées, elles sont débitées en petits

morceaux puis broyées. 100 grammes de poudre obtenue pour chaque population sont stockés et étiquetés en fonction de leur provenance puis conservés à l'ombre jusqu'à l'utilisation.

I-2-3 Les graines

Pour les deux espèces, après la période de fructification, la récolte a concerné surtout des fruits matures. A partir de ces fruits secs, des graines matures de ricin et de jatropha ont été récoltées. Les graines des deux espèces sont utilisées pour l'extraction des huiles fixes de ricin et de jatropha. Pour cela, les graines des deux espèces sont nettoyées et séchées au soleil à l'air libre pour réduire leurs teneurs en humidité puis sont décortiquées. 20 grammes de graines décortiquées sont broyées dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une sorte de pâte. Cette étape sert à la rupture des parois cellulaires pour libérer la graisse contenue dans les graines (Akapan et *al.*, 1999). Les pâtes obtenues sont utilisées après pour l'extraction des huiles.

II- Dosages des composés phénoliques

La détermination des composés phénoliques : polyphénols totaux (PPT), flavonoïdes totaux (FVT) et tannins condensés (TC) présents au niveau des différentes parties des plantes étudiées a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type Cary 50.

II-1 Réactifs chimiques

Une série de produits chimiques ont été utilisés pour doser les composés phénoliques des différents extraits des plantes. Le réactif de Folin-Ciocalteu est fourni par VWR international (France), l'acide gallique, la catéchine, le nitrite de sodium (NaNO_2) et la vanilline sont fournis par Sigma-Aldrich Chimie (France), le carbonate de sodium (Na_2CO_3), le chlorure d'aluminium (AlCl_3) et l'hydroxyde de sodium (NaOH) proviennent d'Across organics (Belgique).

II-2 Préparation des extraits

Pour la préparation des extraits végétaux, la méthode qui utilisée est celle proposée par Kim *et al.* (2002) puis par N'Guessan *et al.* (2011) avec quelques modifications. Ainsi, 10g de poudre fine ont été macérés dans 2 x 100 ml d'une solution de méthanol-eau (80:20 v/v). Le mélange est mis sous agitation permanente pendant 24 h. Après filtration, le filtrat obtenu a été concentré sous pression réduite à 38 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Après évaporation, le résidu est dissous dans 50 ml de méthanol et le mélange est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée. Enfin, le mélange obtenu est centrifugé (1536 x g) pendant 20 minutes puis complété à 100 ml avec une solution de méthanol-eau (50:50 v/v). Le mélange est conservé au frais (+4 °C) en attente d'utilisation pour les analyses.

II-3 Dosage des polyphénols totaux (PPT)

II-3-1 Méthode utilisée pour doser les PPT

Le dosage des polyphénols est réalisé à l'aide du réactif de « Folin-Ciocalteu » (Waterhouse, 1999) en présence de Na_2CO_3 . Il s'agit d'une solution d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) dont la réduction par l'action des polyphénols donne un mélange de complexes de sels de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) de couleur bleue. Cette solution absorbe à une longueur d'onde de 725 nm. Ainsi, le dosage des PPT se fait par comparaison de l'absorbance de la solution étudiée par rapport à celle obtenue par un étalon qui est l'acide gallique.

D'abord une courbe d'étalonnage a été réalisée. Pour cela 500 mg d'acide gallique sont dilués dans 10 ml d'éthanol puis le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée (Solution stock). Des solutions diluées de concentrations connues en acide gallique ont été préparées (0, 50, 100, 150, 250 et 500 mg/L).

Le dosage des PPT de chacun des échantillons se fait par comparaison de leur absorbance à celle de la courbe d'étalonnage.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (EAG/g MS)

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique représente l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique. Elle est obtenue avec un coefficient de corrélation de 0,9997 (Figure 31).

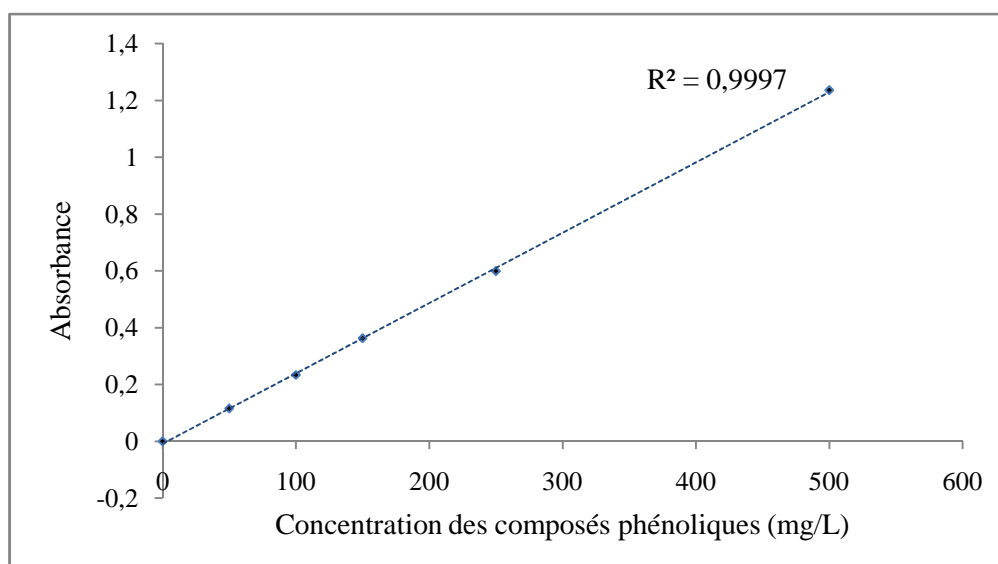


Figure 31. Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.

II-3-2 Mesures

Pour le dosage des PPT la méthode utilisée est celle décrite par Waterhouse (1999) avec quelques modifications. Ainsi, dans des tubes à essai on a placé 40 μ l de chaque solution à étudier puis 3,16 ml d'eau distillée sont ajoutés, ensuite 200 μ l de réactif de « Folin-Ciocalteu ». Le mélange est agité pendant 8 minutes auquel on ajoute par la suite 600 μ l de Na_2CO_3 (20%). La solution finale est agitée une deuxième fois puis incubée pendant 40

minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance de chaque solution est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 725 nm.

En ce qui concerne la courbe d'étalonnage, on va utiliser l'acide gallique et les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (EAG/g MS).

II-4 Détermination des flavonoïdes totaux (FVT)

II-4-1 Méthode utilisée pour doser les FVT

Pour le dosage des flavonoïdes totaux, la méthode utilisée est celle développée par Zhishen *et al.* (1999) puis par Chen et Chen (2011) avec quelques modifications.

D'abord, une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la catéchine. Des solutions de l'ordre de 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L ont été préparées. Les réactifs utilisés sont : le nitrite de sodium (NaNO_2 , 5%), le chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%) et l'hydroxyde de sodium (NaOH , 1N).

La courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en catéchine a été réalisée. Elle présente un coefficient de corrélation de l'ordre de 0,9505.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de la catéchine par gramme de matière sèche (EC/g MS) (Figure 32).

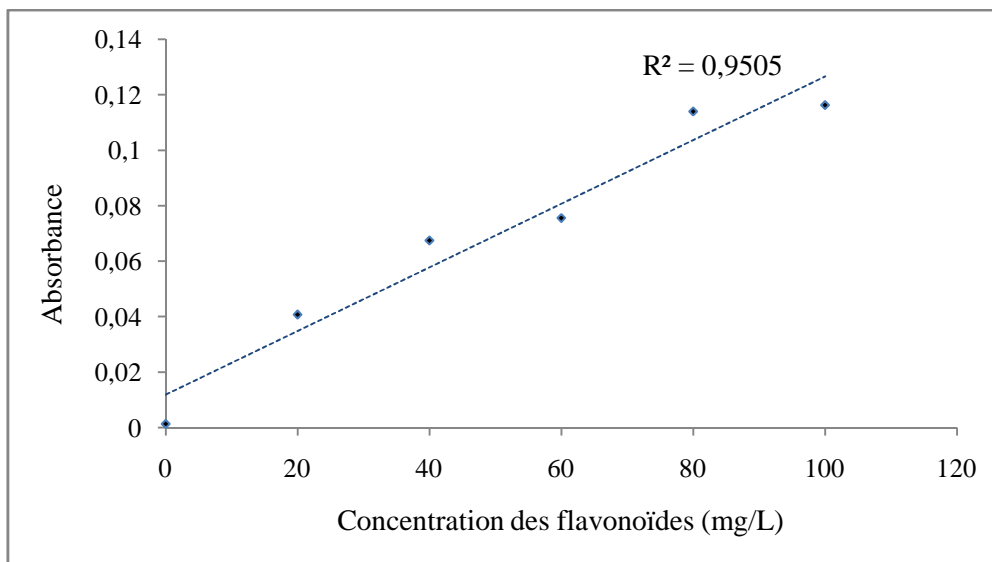


Figure 32. Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes totaux.

II-4-2 Mesures

La méthode consiste à placer dans des tubes à essais et d'une manière successive, 250 μ l de l'extrait étudié et 1 ml d'eau distillée. A un temps initial (0 minute) on ajoute 75 μ l d'une solution de NaNO_2 (5%), après 5 minutes 75 μ l de AlCl_3 (10%) sont ajoutés. 6 minutes après 500 μ l de NaOH (1N) sont ajoutés ainsi que 2,5 ml d'eau distillée.

L'absorbance de chaque mélange obtenu est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 510 nm. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent de la catéchine par gramme de matière sèche (EC/g MS).

II-5 Dosage des tannins condensés (TC)

II-5-1 Méthode utilisée pour doser les TC

Pour doser les tannins condensés, la méthode de la vanilline a été utilisée (Scalbert, 1992 ; Sun *et al.*, 1998 ; Schofield *et al.*, 2001). Au cours de cette réaction, la vanilline va réagir avec les tannins condensés pour donner des complexes colorés qui absorbent à 500 nm.

Le dosage des quantités de TC est réalisé à partir d'une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en catéchine. La courbe d'étalonnage présente un coefficient de corrélation de 0,9782 (Figure 33).

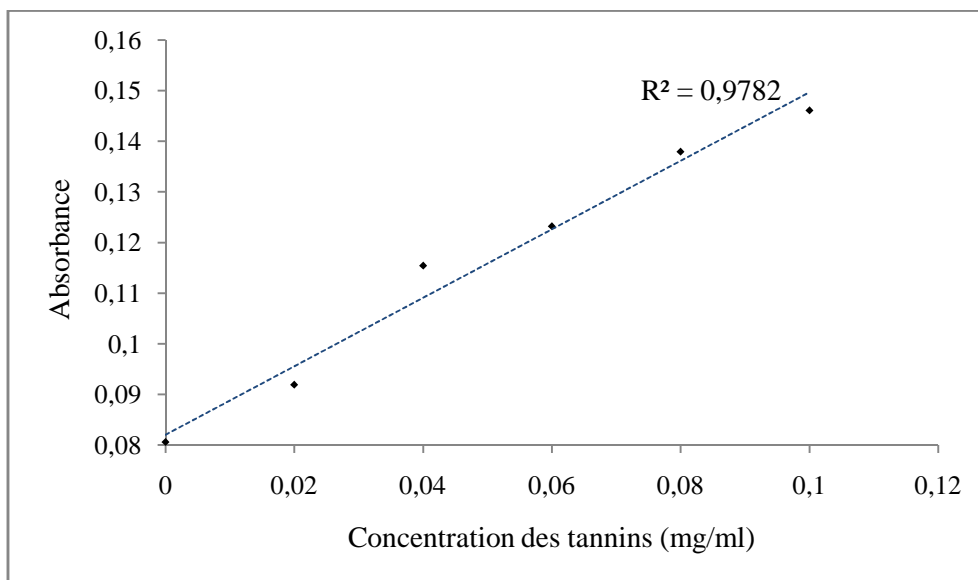


Figure 33. Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins totaux.

II-5-2 Mesures

5 g de matière sèche de chaque échantillon a été lixivié dans le n-hexane, le résidu obtenu est séché à température ambiante. Ensuite, un mélange formé de 0,5 g de résidu avec 15 ml d'une solution de méthanol-HCl (1 %) est préparé. Le mélange obtenu est placé dans un tube à essai, vortexé puis placé dans un bain marie à 35°C pendant 20 minutes. Après incubation le tube est centrifugé à 1532 x g puis et le surnageant est récupéré. 1 ml du surnageant est mélangé avec 3 ml d'une solution de la vanilline. Cette dernière est formée de 4 g de vanilline et 100 ml de méthanol-HCl (8%). Toutes les solutions ainsi que les blancs sont préparés dans les mêmes conditions. Les tubes obtenus sont de nouveau incubés à 35°C pendant 20 minutes. Après cette deuxième incubation l'absorbance de chaque solution obtenue est directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 500 nm.

La courbe d'étalonnage établie à partir des solutions de différentes concentrations de catéchine permet d'exprimer la concentration des tannins condensés en mg équivalent de catéchine par gramme de matière sèche (EC/g MS).

III- Identification des composés phénoliques

Dans cette partie de l'étude, nous avons utilisé une RP-HPLC (HPLC en phase inverse) de type Waters 600E couplé à un détecteur UV Waters 486 équipé d'une boucle d'injection de 20 μ l. La colonne, de 150 mm de longueur et de 4,6 mm de largeur, est remplie d'une phase de silice greffée C18 de 5 μ m de taille de particule. La détection a été réalisée à deux longueurs d'ondes 280 et 320 nm. La séparation des solutés de nos échantillons a été réalisée en mode gradient d'élution.

III-1 Réactifs chimiques

Tous les produits utilisés pour les analyses par HPLC ainsi que les solvants ont été fournis par Sigma Aldrich (France). Il s'agit d'une série d'étalons commercialisés et qui sont utilisés en des références : acide gallique, acide protocatechique, épicatechine, acide gentsique, catéchine, acide chlorogénique, acide caféique, acide vanillique, acide p-coumarique, rutine, vitexine, naringine et acide cinnamique.

III-2 Gradient d'élution

- Solvant A : composition 50 mM de phosphate d'ammonium ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) à pH 2,6 ajusté avec l'acide orthophosphorique (H_3PO_4).
- Solvant B : composition acétonitrile / solvant A 80 : 20 (v/v).
- Solvant C : composition 200 mM d'acide orthophosphorique (H_3PO_4) à pH 1,7.

Avant chaque utilisation, les solvants sont préparés et filtrés sur papier Whatman N°3 puis mis en sonication dans un bain ultrason pendant 25 minutes.

Deux profils de gradients ont été utilisés pour analyser les extraits méthanoliques des feuilles et des racines des deux espèces étudiées : un premier gradient est donné dans le tableau 3, utilisé pour analyser les extraits de ricin quant au gradient utilisé pour analyser les extraits de jatropha est donné dans le tableau 4.

Tableau 3. Profil du gradient utilisé pour l'analyse HPLC des extraits de ricin.

Temps (min)	Débit (ml)	Courbe	Solvants utilisés en %		
			A	B	C
Initial	1	1	100	0	0
4	1	1	95	5	0
10	1	1	92	8	0
15	1	1	90	10	0
25	1	1	0	14	86
45	1	1	0	20	80
50	1	1	0	30	70
55	1	1	0	60	40
60	1	1	100	0	0

Tableau 4. Profil du gradient utilisé pour l'analyse HPLC des extraits de jatropha.

Temps (min)	Débit (ml)	Courbe	Solvants utilisés en %		
			A	B	C
Initial	1	1	100	0	0
4	1	1	95	5	0
10	1	1	92	8	0
15	1	1	90	10	0
25	1	1	0	14	86
45	1	1	0	16	84
70	1	1	0	25	75

III-3 Préparation des extraits

Pour l'extraction des composés phénoliques, 2 g de la matière végétale (feuilles et racines des populations des deux espèces étudiées) sont ajoutés à 2 x 20 ml d'une solution de méthanol-eau 50:50 (v/v). Le mélange est mis sous agitation pendant 6 heures puis centrifugé (1536 x g) et filtré. Le filtrat est récupéré et mis au frais (+4°C) jusqu'à utilisation. Avant

chaque injection dans la boucle, le filtrat est filtré une deuxième fois à l'aide d'un filtre (PTEF) de 0,45 μm .

IV- Etude de la composition chimique des huiles

Pour réaliser l'étude de la composition chimique des huiles nous avons utilisé un GC-MS de type Perkin Elmer-MS Clarus 500. La colonne utilisée est une Elite 5 MS d'une longueur de 30 m, d'un diamètre de 0,25 mm et d'une épaisseur de film de phase stationnaire de 0,25 μm . La phase stationnaire est formée de 5% de diphényle et 95% de diméthyle polysiloxane. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium dont le débit est de 0,75 ml/min. Le gradient de température du four varie de 150 °C à 300 °C avec une augmentation de 10 °C par minute. Le détecteur utilisé pour l'enregistrement des spectres est couplé à un spectromètre de masse quadripôle avec une gamme qui varie entre 40 et 600 m/z avec 0,1 scan/s et une énergie d'ionisation d'électrons de 70 eV. La température de la source, de la ligne de transfert et du détecteur est de 250 °C.

IV-1 Préparation des extraits

L'extraction des huiles fixes est réalisée à l'aide d'un soxhlet avec de l'hexane comme solvant et selon la procédure décrite par Abitogun *et al.* (2009). Ainsi 20 g de chaque échantillon ont été placés dans une cartouche qui sera ensuite insérée au centre de chaque extracteur (extracteur à 6 sorties). Lorsque le solvant atteint le degré d'ébullition, la vapeur monte à travers un circuit d'évaporation, se condense au niveau du condensateur et après son contact direct avec le réfrigérant, il retombe sur l'extracteur faisant macérer l'échantillon dans le solvant. Ce dernier s'enrichit progressivement de composés solubles. Enfin, les mélanges obtenus sont placés dans un évaporateur rotatif afin de récupérer l'huile résiduelle qui va être conservée au frais (+4°C) dans de petits piluliers en verre et utilisée pour le reste du travail analytique.

IV-2 Transestérification

Les acides gras appelés encore triglycérides, de par leur point d'ébullition trop élevé, sont des composés non volatiles. Ils ne peuvent pas être analysés directement par la GC. Pour pallier cet inconvénient ils sont décomposés en leurs acides gras correspondants et ces derniers sont dérivatisés en leurs esters méthyliques par la méthode FAME (Fatty Acids Methyl Esters). Cette méthode permet d'atteindre les esters méthyliques des acides gras en une seule étape (Figure 34).

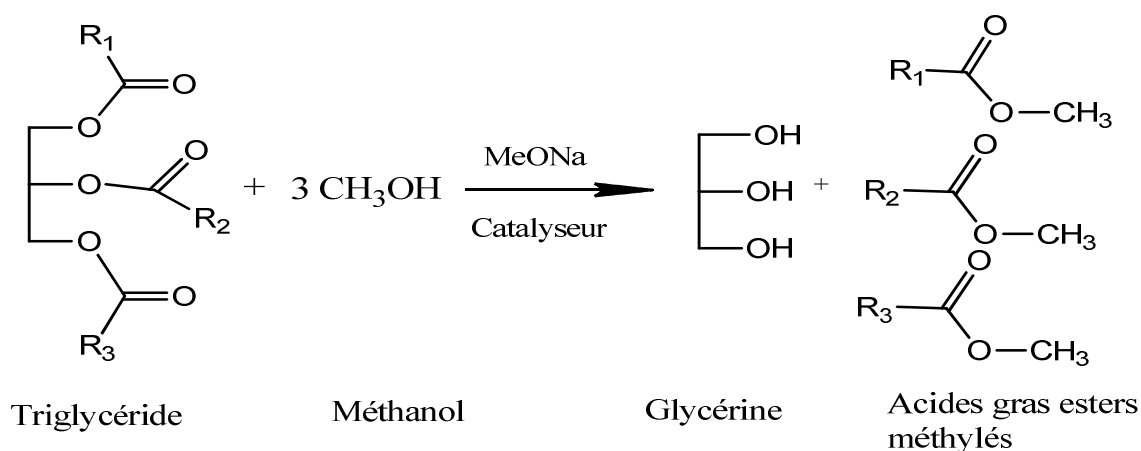


Figure 34. Schéma simplifié de la réaction de transestérification.

Dans notre étude, les acides gras méthyles esters (FAME) sont préparés selon la méthode de PORIM (1995) avec quelques modifications. Ainsi, 0.05 g d'huile ont été dissous dans 1.8 ml d'éther de pétrole, puis 0.2 ml de méthylate de sodium a été ajouté. Le mélange obtenu est agité pendant une minute à l'aide d'un auto-vortex. Après quelques minutes, 1 µl du surnageant qui contient le FAME a été injecté à la GC-MS. L'essai a été répété 3 fois.

V- Etude des activités anti-oxydantes

V-1 Evaluation de l'activité anti-oxydante par deux tests DPPH et ABTS

L'évaluation de l'activité anti-oxydante d'un produit peut se réaliser selon plusieurs méthodes. Au cours de cette étude nous avons choisi d'évaluer l'activité anti-oxydante par deux tests : le test DPPH et le test ABTS. L'intérêt de ces deux tests est que le premier

(DPPH) permet de déterminer l'activité anti-oxydante en milieu organique tandis que le deuxième (ABTS) s'adresse uniquement à des solutions aqueuses.

V-1-1 Principe du test DPPH

Le test DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle) a été utilisé par Blois (1958), ce test consiste en la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire DPPH[•] en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire DPPH-H (Figure 35). En effet, la présence des radicaux DPPH[•] donne une coloration pourpre foncée à la solution et qui absorbe fortement à 517 nm. Au cours de la réaction, la colorimétrie de la solution change sous l'effet d'un agent antioxydant qui entraîne la décoloration de la solution.

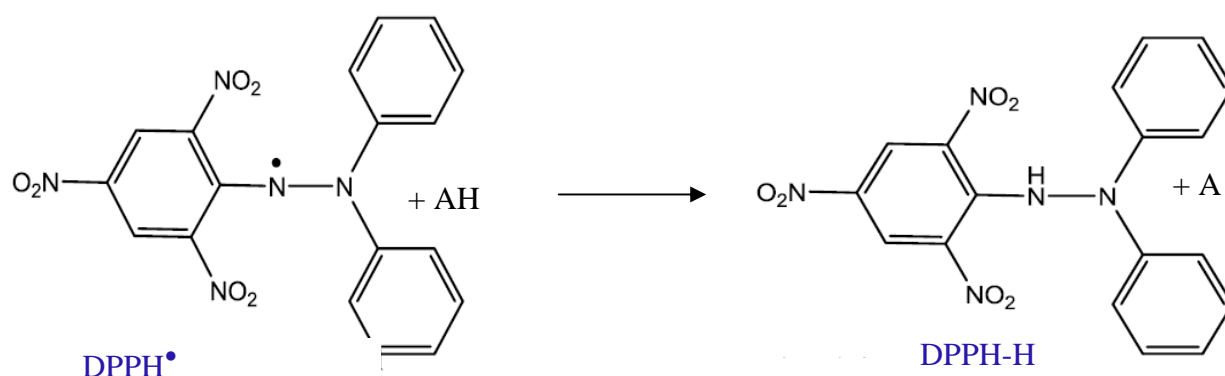


Figure 35. Mécanisme d'action de DPPH.

V-1-2 Principe du test ABTS

Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} (sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) de coloration bleu verdâtre. Ce radical cationique est formé suite à l'oxydation de l'ABTS initialement incolore avec les différents composés comme le phosphate de potassium (KH₂PO₄) et le 2,2'-azo-bis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH). Ainsi, la réaction se déroule en deux étapes : au cours de la première étape le radical ABTS^{•+} est formé par arrachement d'un électron e⁻ à un atome d'azote de l'ABTS. La deuxième se déroule en

présence de vitamine C (ou d'antioxydant donneur de H^\bullet), le radical d'azote concerné piège un H^\bullet , conduisant à l'ABTSH⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution (Figure 36).

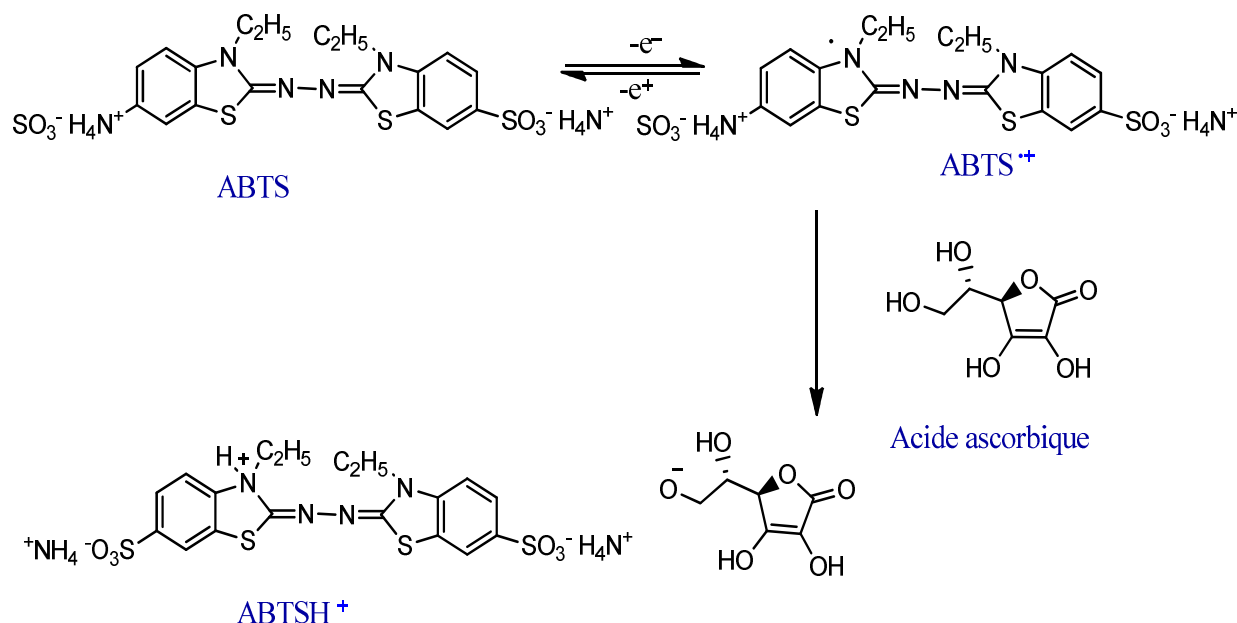


Figure 36. Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H^\bullet

V-2 Méthodes utilisées

V-2-1 Test DPPH

La méthode utilisée est celle de Brand *et al.* (1995) avec quelques modifications. D'abord, une solution méthanolique de DPPH (200 μ M) a été préparée à chaque fois et maintenue à l'obscurité. 2,90 ml de la solution du méthanol (200 μ M DPPH) est ajouté à 100 μ l de l'extrait à étudier. La solution est mélangée et incubée à 37 C° pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

L'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc formé de 2,90 ml de la solution méthanolique de DPPH (200 μ M) et 100 μ l de méthanol.

Les échantillons à étudier et le témoin sont préparés dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV/visible. Ainsi, le pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH est calculé selon l'équation suivante :

$$\%Inhibition = \frac{(A \text{ controle } 517nm - A \text{ extrait } 517nm)}{(A \text{ controle } 517nm)} \times 100$$

En modifiant les concentrations des extraits et en calculant les pourcentages d'inhibition, on va établir une courbe de régression linéaire qui relie les différentes concentrations et les pourcentages d'inhibition. A partir de cet abaque, on détermine l'IC50 qui correspond à la concentration de l'échantillon qui entraîne 50% d'inhibition. Notons que l'activité anti-oxydante est inversement proportionnelle à la valeur de l'IC50. Ainsi, l'échantillon qui présente l'IC50 la plus faible est celui qui présente l'activité anti-radicalaire la plus importante.

Pour exprimer directement l'activité anti-oxydante en fonction de la concentration, une courbe d'étalonnage est réalisée en projetant l'absorbance en fonction des différentes concentrations d'acide ascorbique. Les concentrations d'acide ascorbique utilisées sont de l'ordre de 0,002, 0,004, 0,008, 0,012, 0,016 et 0,020 mg/ml (Figure 37). Une bonne corrélation est observée (0,99). Les résultats obtenus pour les échantillons sont exprimés en mg équivalent vitamine C par gramme de matière sèche (EVC/g MS).

En ce qui concerne l'étude de l'activité anti-oxydante de l'huile de jatropha, compte tenu de sa mauvaise solubilité dans le méthanol, une solution de toluène-méthanol (50:50 v/v) a été utilisée pour préparer la solution de DPPH (200µM) et de même pour la courbe d'étalonnage avec la vitamine C (Figure 38).

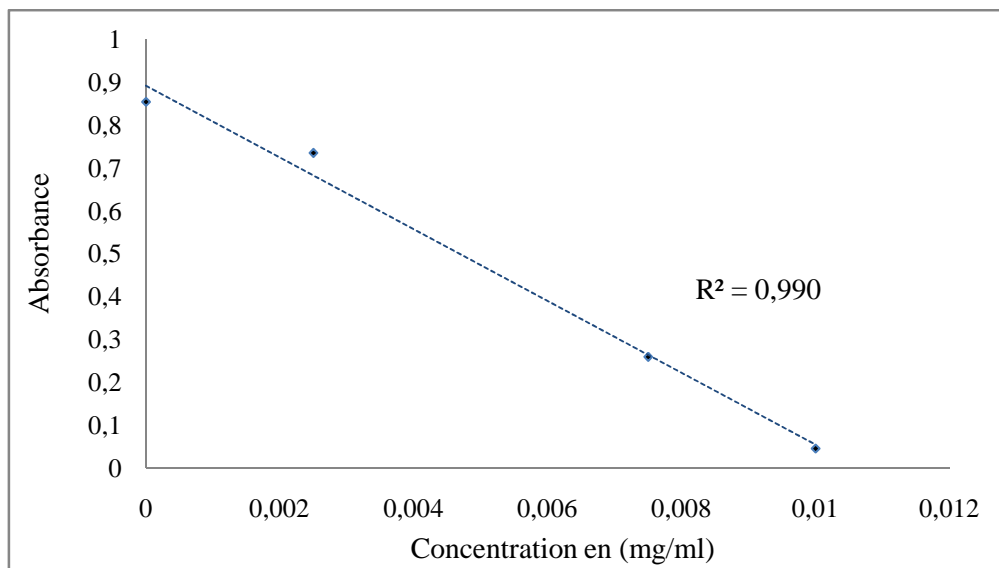


Figure 37. Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de vitamine C dans une solution méthanolique de DPPH.

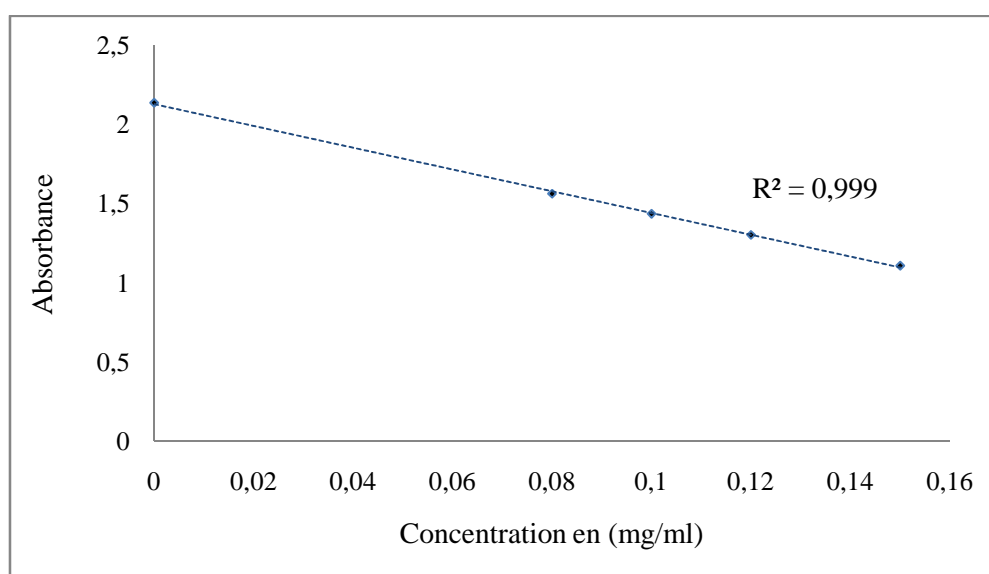


Figure 38. Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de vitamine C dans une solution toluène-méthanol de DPPH.

V-2-2 Test ABTS

La méthode utilisée est celle décrite par Muanda *et al.* (2009) avec quelques modifications. Ainsi, 1 mM de AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propane) dihydrochloride) et 2,5 mM d'ABTS ((sel d'ammonium de l'acide 2, 2'- azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-

sulfonique) sont préparés en utilisant une solution tampon formée de 100 mM de phosphate de potassium (KH_2PO_4) et de 150 mM de chlorure de sodium (NaCl) à $\text{pH} = 7,4$. La solution obtenue est incubée dans un bain marie à 68°C pendant 30 min jusqu'à l'obtention d'une solution bleu-verdâtre. L'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 734 nm puis réglée avec du méthanol jusqu'à avoir une absorbance de $0,7 \pm 0,05$.

2,94 ml de la solution $\text{ABTS}^{\bullet+}$ sont ajoutés à 60 μl de chaque échantillon à tester puis incubés pendant 30 min à 37°C à l'abri de la lumière. Le témoin est préparé de la même manière mais avec 60 μl de méthanol. Ainsi, la décroissance de l'absorbance est mesurée à 734 nm.

La courbe d'étalonnage est réalisée à partir des absorbances en fonction des différentes concentrations de vitamine C. La courbe présente une bonne corrélation de 0,996 et les résultats obtenus sont exprimés en équivalence de vitamine C par gramme de matière sèche (EVC/g MS) (Figure 39).

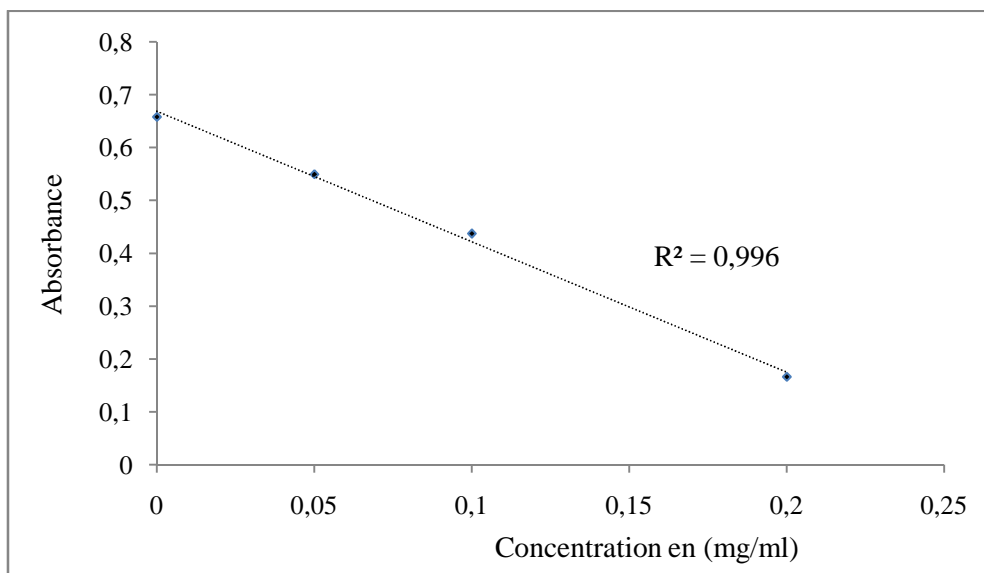


Figure 39. Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de vitamine C dans une solution ABTS.

VI- Etude de l'activité anti-acétylcholinestérase (anti-AChE)

VI-1 Méthode utilisée

L'évaluation des activités anti-AChE d'un produit peut se réaliser selon plusieurs méthodes dont la plupart sont des méthodes colorimétriques telles que la méthode d'Ellman et la méthode bioautographique au Fast Blue B. Au cours de cette étude, nous avons choisi d'évaluer cette activité par le test d'Ellman.

VI-1-1 Principe du test d'Ellman

Ce test est appelé aussi méthode de la détermination quantitative des peptides par Sulfhydryle (-SH). Il s'agit d'un protocole standard pour la détermination des thiols libres.

Le test d'Ellman est basé sur le clivage de l'acétylthiocholine par l'AChE pour produire de la thiocholine. Cette dernière va réagir avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion de couleur jaune (Ellman *et al.*, 1961) (Figure 40). En présence d'un inhibiteur enzymatique, cette réaction permet d'étudier les paramètres cinétiques et par la suite de quantifier l'inhibition exprimée par son IC₅₀ (concentration diminuant l'activité enzymatique de moitié).

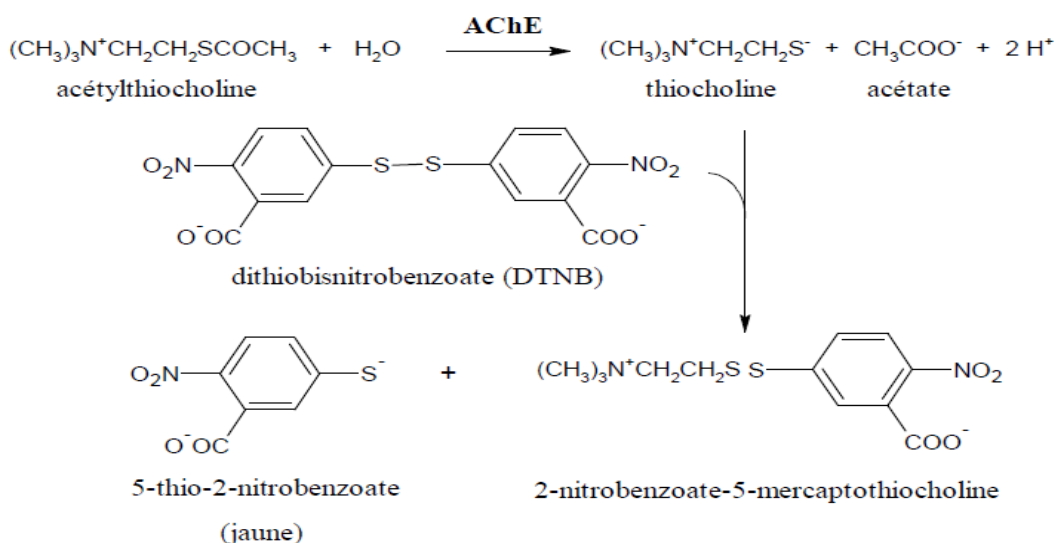


Figure 40. Réaction colorimétrique d'Ellman.

VI-1-2 Démarche expérimentale

L'étude de l'activité anti-AChE est menée selon la méthode développée par Ferreira *et al.* (2006) puis plus récemment par Ouchemoukh *et al.* (2014) avec quelques modifications. Ainsi, dans des tubes Eppendorf, on place successivement 650 µl d'une solution tampon de Tris-HCl (50 mM d'hydroxyméthyl aminométhane à pH = 8), 50 µl de l'extrait méthanolique de la plante à différentes concentrations et 5µl de la solution enzymatique contenant 0,26 unités/ml et préparée dans une solution tampon de Tris-HCl à pH = 7,5. Les tubes sont incubés pendant 15 minutes à 25°C. La réaction est déclenchée par l'addition de 75 µl de la solution ATCI (15mM d'acétylthiocholine iodide) et de 250 µl de réactif d'Ellman DTNB (3mM de 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoate). Après 10 minutes, l'absorbance du mélange est déterminée à 405 nm. Le contrôle négatif est préparé de la même manière avec du méthanol au lieu de l'extrait de la plante. Quant à la galantamine hydrobromide de l'espèce *Lycoris sp.* est utilisée comme un contrôle positif.

Les pourcentages d'inhibition (I) sont calculés selon l'équation suivante :

$$I (\%) = 100 - \frac{(A \text{ extrait } 405 \text{ nm})}{(A \text{ controle } 405 \text{ nm})} \times 100$$

La concentration qui produit 50 % d'inhibition est obtenue à partir de la courbe qui présente les pourcentages d'inhibitions contre les différentes concentrations de l'échantillon étudié.

Les résultats obtenus présentent les moyennes avec les écarts types de trois répétitions.

VII- Analyses statistiques

Les différentes analyses quantitatives et qualitatives ont été réalisées au moins trois fois. Par la suite, des analyses de la variance ont été faites par le logiciel SAS et la différence entre les populations des deux espèces est considérée significative si $P < 0,05$.

3^{ème} Partie: Résultats et discussions

Chapitre I: Dosages des composés phénoliques

I- Dosage des polyphénols totaux (PPT)

I-1- Le ricin

Les résultats obtenus suite au dosage des PPT des extraits des différentes parties de ricin sont reportés dans la figure suivante.

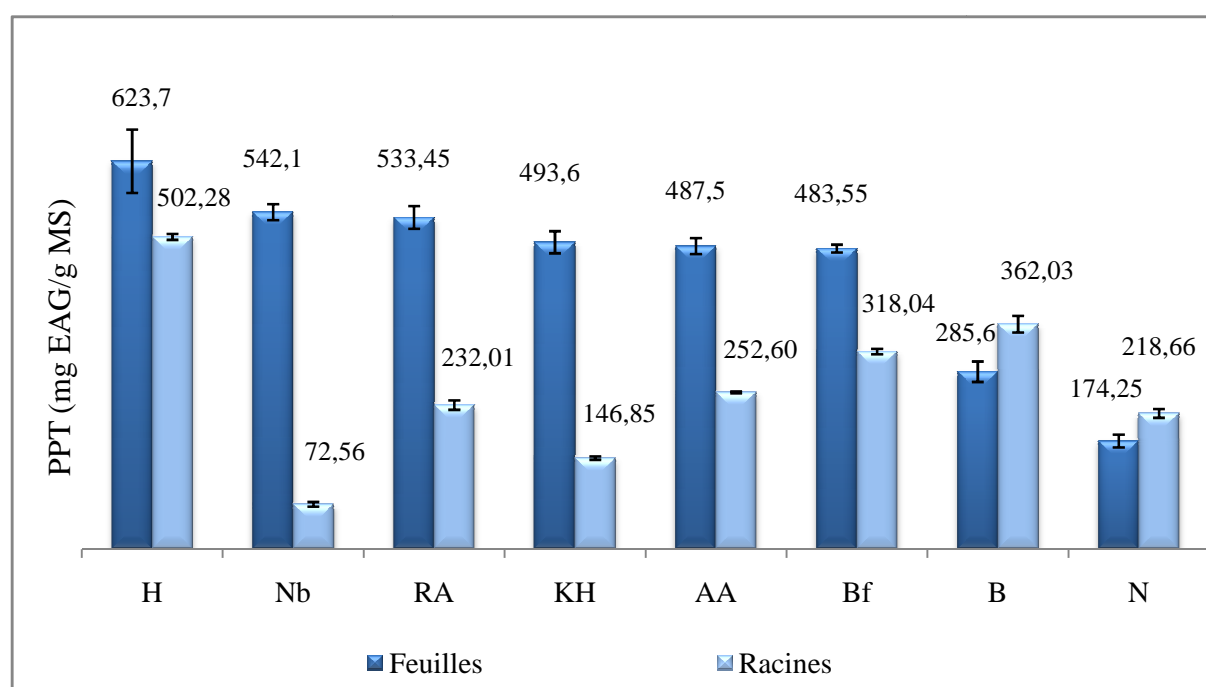


Figure 41. Composition en PPT des extraits des feuilles et des racines de huit populations de ricin.

La figure 41 montre que les feuilles de ricin sont plus riches en PPT que les racines à l'exception de deux populations qui sont celles de Béja (B) et Nefza (N). Les dosages ont montré que la population de Hammamet (H) présente la teneur la plus élevée en PPT pour les feuilles et aussi pour les racines avec des moyennes respectives de 623,7 mg EAG/g MS et 502,28 mg EAG/g MS. La comparaison des teneurs des extraits des feuilles des autres populations a montré que la population de Nefza (N) présente la teneur la plus faible en PPT avec une valeur de 174,25 mg EAG/g MS. En ce qui concerne les extraits de racines, c'est la population de Nabeul (Nb) qui possède la quantité la moins importante en PPT avec une moyenne de 72,56 mg EAG/g MS.

I-2 Le jatropa

Les résultats du dosage des PPT des extraits des différentes parties de jatropa sont présentés dans la figure 42.

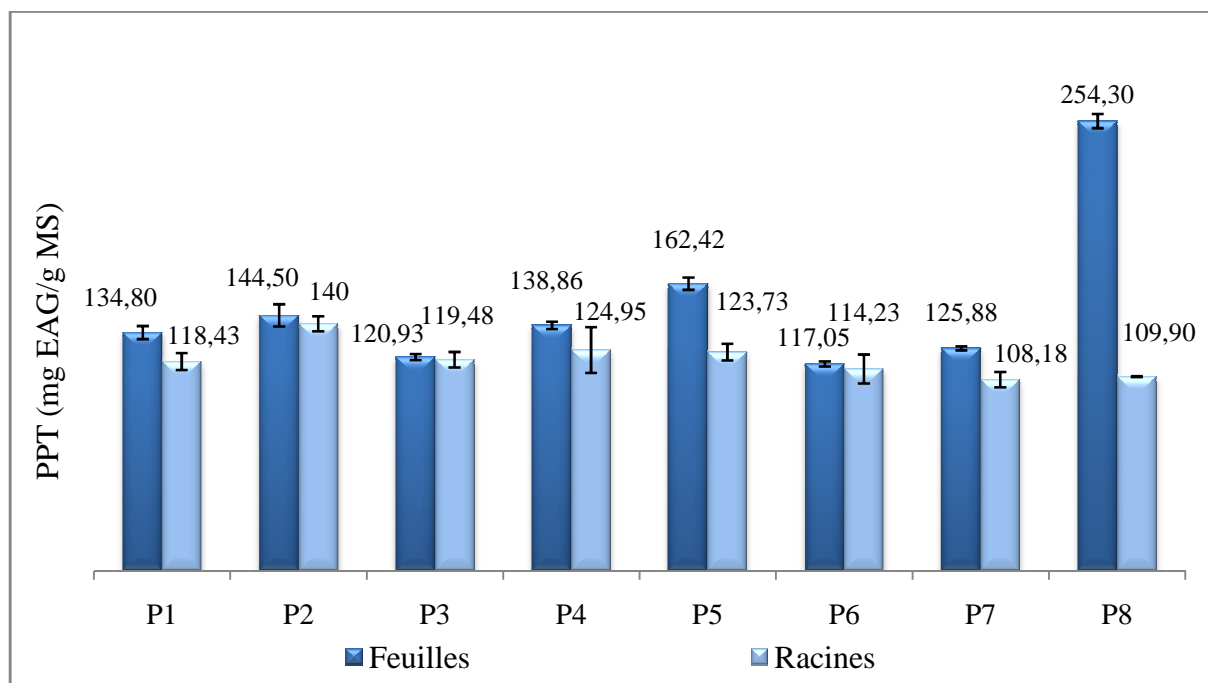


Figure 42. Composition en PPT des extraits des feuilles et des racines de huit populations de jatropa.

L'analyse quantitative des PPT au niveau des feuilles et des racines de huit populations de jatropa a montré que toutes les populations sont plus riches au niveau des feuilles que des racines.

Pour les extraits des feuilles, la population de Suriname (P8) présente la quantité la plus importante en PPT avec une moyenne de 254,30 mg EAG/g MS. La population de Regiao sudeste Brésil (P6) présente la quantité la plus faible avec une moyenne de 117,05 mg EAG/g MS. Pour les extraits des racines, la population de Mozambique (P2) est la population la plus riche en PPT avec une teneur de 140 mg EAG/g MS quant à la population la moins riche, Vale do Jequitinhonha Brésil (P7) a une teneur de 108,18 mg EAG/g MS.

II- Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)

II-1 Le ricin

Les résultats de l'étude quantitative des teneurs en FVT des extraits des feuilles et des racines de différents extraits de ricin sont présentés dans la figure 43.

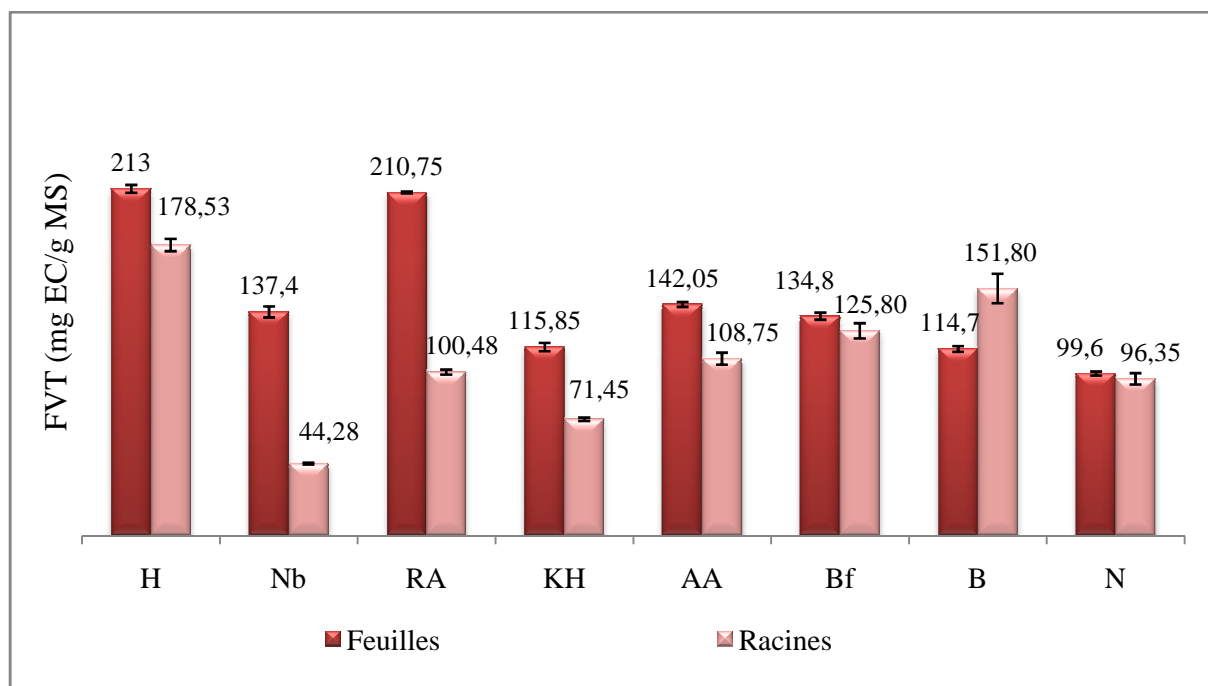


Figure 43. Composition en FVT des extraits des feuilles et des racines de huit populations de ricin.

La figure 43 montre que les extraits des feuilles sont plus riches en FVT que les extraits des racines à l'exception de la population de Béja (B). De même, la population de Hammamet (H) présente la teneur la plus élevée en FVT aussi bien pour les feuilles que pour les racines avec des moyennes respectives de 213 mg EC/g MS et 178,53mg EC/g MS. Au niveau des feuilles, l'extrait de Nefza (N) présente la teneur la plus faible en FVT avec une valeur de 99,6 mg EC/g MS. Concernant les racines, c'est la population de Nabeul (Nb) qui est la moins riche avec une teneur de 44,28 mg EC/g MS.

II-2 Le jatropa

Les résultats obtenus suite au dosage des FVT des différents extraits de huit populations de jatropa sont présentés dans la figure 44 suivante.

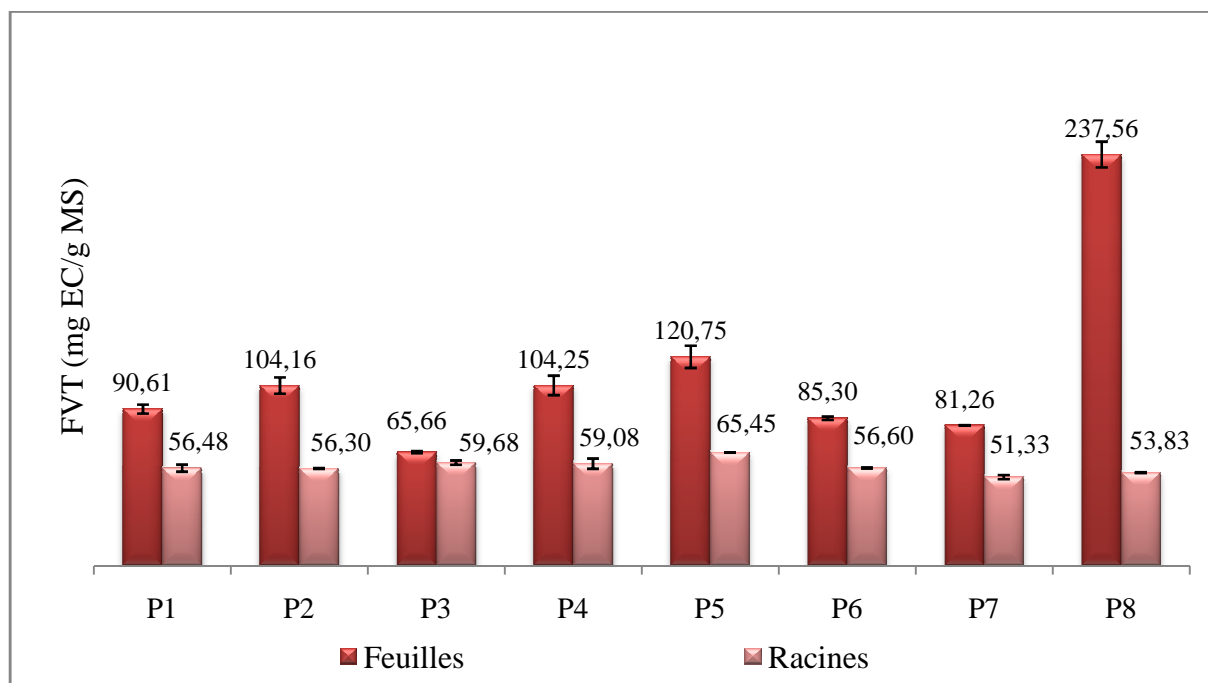


Figure 44. Composition en FVT des extraits des feuilles et des racines de huit populations de jatropa.

La figure 44 a montré que les extraits des feuilles sont plus riches en FVT que les extraits des racines pour toutes les populations étudiées.

Au niveau des feuilles, la population de Suriname (P8) est la plus riche en FVT avec une moyenne de 237,56 mg EC/g MS, par contre la population de Paraná Brésil (P3) est la moins riche avec une moyenne de 65,66 mg EC/g MS. Au niveau des racines, la population de Mato Grosso Brésil (P5) présente la plus grande quantité de FVT avec une valeur de 65,45 mg EC/g MS. La quantité la moins faible de FVT est déterminée chez la population de Vale do Jequitinhonha Brésil (P7) qui est de l'ordre de 51,33 mg EC/g MS.

III- Dosage des tannins condensés (TC)

III-1 Le ricin

Les résultats de l'étude quantitative des teneurs en TC des extraits des feuilles et des racines de différents extraits de ricin sont présentés dans la figure 45.

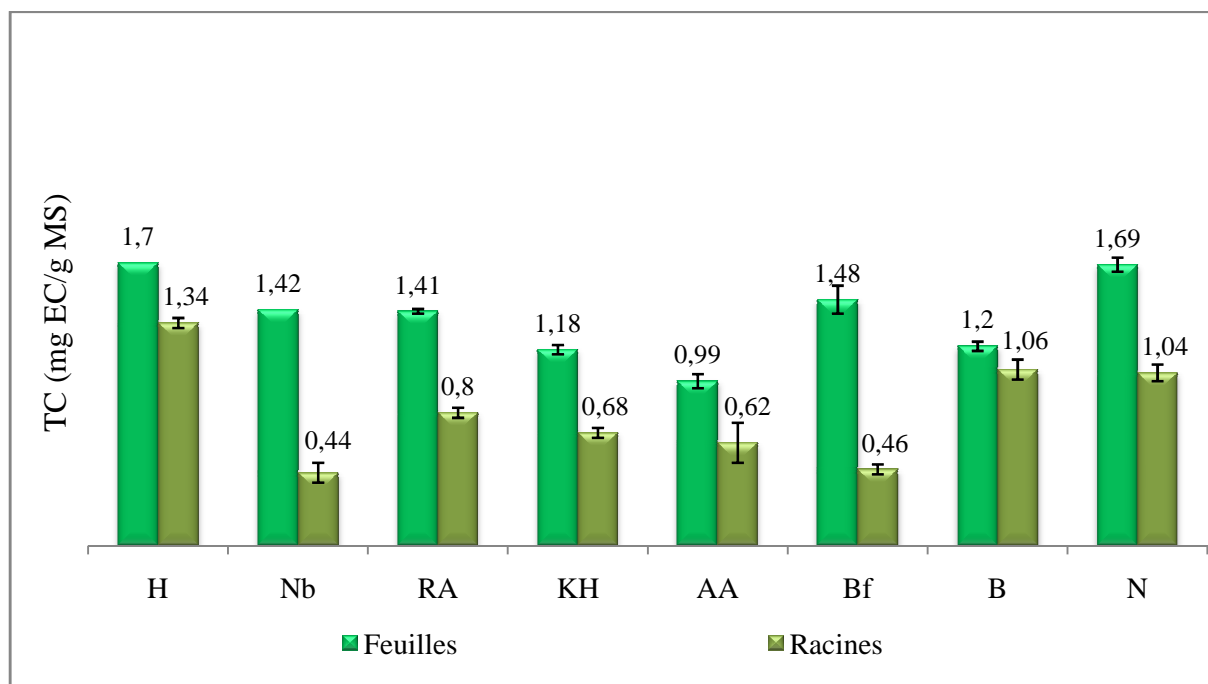


Figure 45. Composition en TC des extraits des feuilles et des racines de huit populations de ricin.

Les résultats ont montré que les feuilles ont des teneurs en TC plus importantes que les racines pour les huit populations étudiées. La population de Hammamet (H) est la population la plus riche en TC aussi bien pour les extraits des feuilles que ceux des racines avec des moyennes respectives de 1,7 mg EC/g MS et 1,34 mg EC/g MS. Les extraits des feuilles de la population d'Aouled Amer (AA) présente la teneur la plus faible en TC avec une valeur de 0,99 mg EC/g MS. Quant à l'extrait des racines de la population de Nabeul (Nb) est le moins riche avec 0,44 mg EC/g MS.

III-2 Le jatropha

Les résultats obtenus suite au dosage des TC des extraits des feuilles et des racines de différents extraits de jatropha sont présentés dans la figure 46.

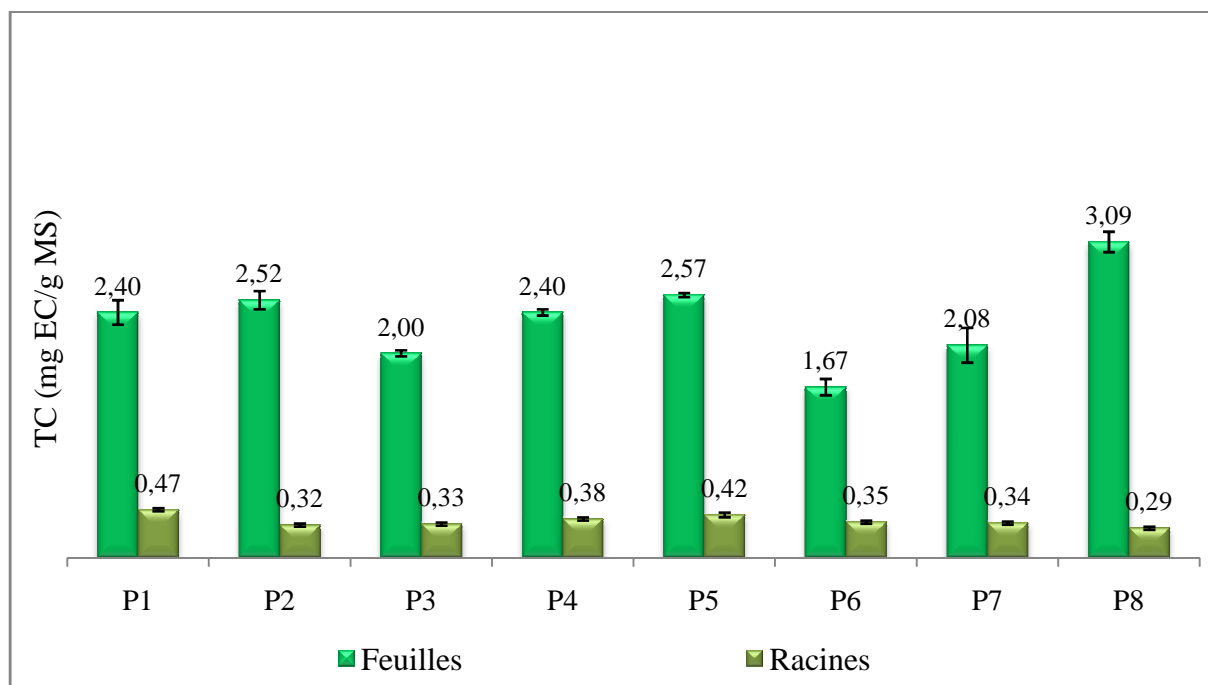


Figure 46. Composition en TC des extraits des feuilles et des racines de huit populations de jatropha.

La figure 46 a montré que les feuilles sont plus riches en TC que les racines pour toutes les populations. Ainsi, au niveau des feuilles, la population de Suriname (P8) est la plus riche en TC quant à la population de Regiao sudeste Brésil (P6) est la moins riche avec des valeurs respectives de l'ordre de 3,09 mg EC/g MS et 1,67 mg EC/g MS. Au niveau des racines, la population de Tanzanie (P1) est la plus riche en TC par contre la population de Suriname (P8) est la moins riche avec des valeurs respectives de l'ordre de 0,47 mg EC/g MS et 0,29 mg EC/g MS.

IV- Analyses statistiques

Suite aux dosages des différents composés phénoliques des extraits des feuilles et des racines des populations de ricin et de jatropha, une analyse de la variance a été réalisée par le

logiciel SAS. Ainsi, l'analyse de la variance a montré que la différence entre les populations des deux espèces étudiées est hautement significative pour tous les paramètres: PPT ($P < 0,0001$), FVT ($P < 0,0001$) et TC ($P < 0,0001$) aussi bien pour les extraits des feuilles que ceux des racines.

V- Conclusion

Les dosages par spectrophotomètre UV-visible ont montré que les extraits des feuilles des populations de ricin étudiées sont plus riches en composés phénoliques (PPT, FVT et TC) que les extraits des racines à l'exception des populations de Béja (B) et Nefza (N) dont les racines sont plus riches en PPT et en FVT. En ce qui concerne le jatropha, les résultats ont montré que les extraits des feuilles sont plus riches en composés phénoliques que les extraits des racines pour toutes les populations étudiées. Par la suite, il serait intéressant d'identifier et de quantifier les différents composés phénoliques présents dans les extraits testés.

Chapitre II: Identification des composés phénoliques

I- Analyses des extraits de ricin

I-1 Chromatogrammes des étalons

Les figures 47 et 48 montrent les profils des chromatogrammes du mélange d'étalons utilisés. Ces analyses sont enregistrées à deux longueurs d'ondes 280 nm et 320 nm. Le mélange est composé d'une solution méthanol-eau 50:50 (v/v) qui contient 12 étalons à des concentrations différentes : 0,25 mg/ml pour la vitexine, l'acide p-coumarique et l'acide caféique, 0,5 mg/ml pour l'acide chlorogénique, l'acide gallique, l'acide protocatéchine, la naringine et l'épicatéchine quant à l'acide vanillique, la rutine, la catéchine et l'acide gentisique sont à 0,75 mg/ml. L'identification puis la quantification des composés phénoliques présents dans les extraits testés sont faits par comparaison de leurs temps de rétention et des surfaces des pics obtenus avec ceux des étalons.

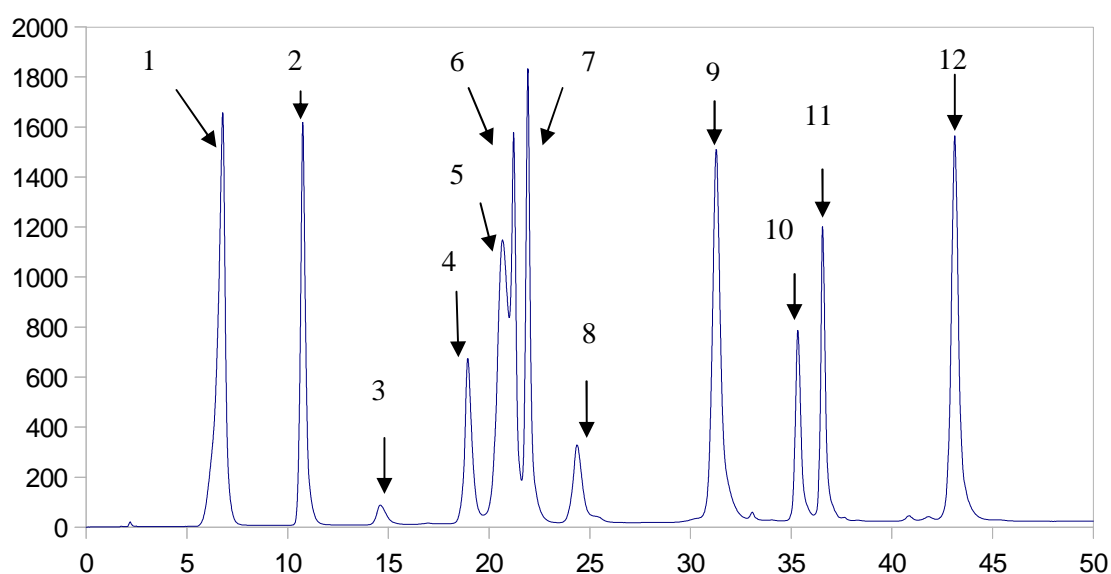


Figure 47. Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 5: acide chlorogénique, 6: acide vanillique, 7: acide caféique, 8: epicatechine, 9: acide p-coumarique, 10: rutine, 11: vitexine, 12: naringine.

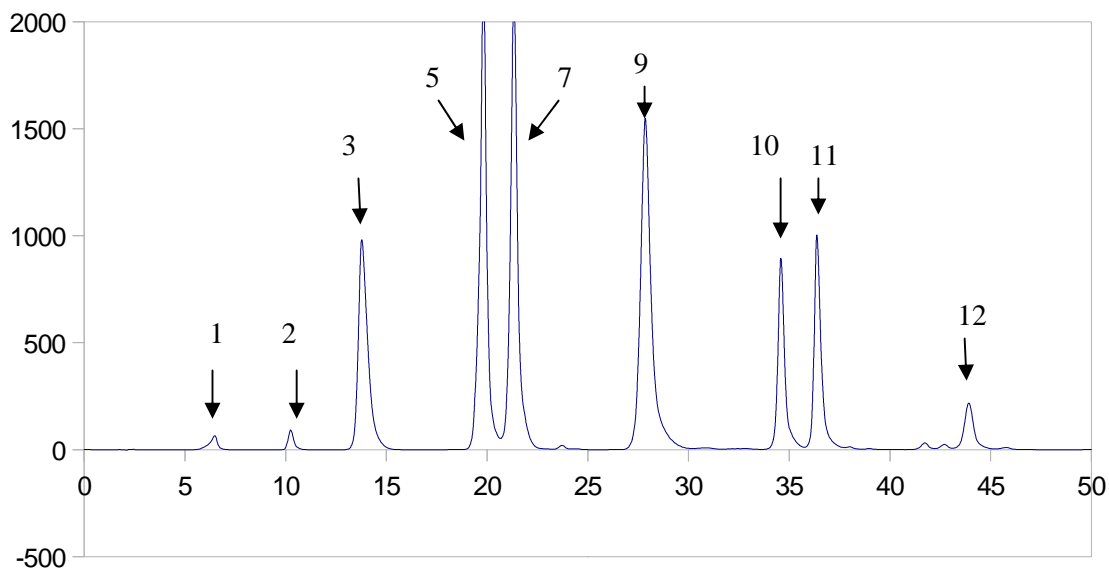


Figure 48. Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 320 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 5: acide chlorogénique, 7: acide caféique, 9: acide p-coumarique, 10: rutine, 11: vitexine, 12: naringine.

I-2 Analyse des extraits de ricin

Les résultats des analyses quantitatives des composés phénoliques identifiés dans les extraits méthanoliques des feuilles et des racines de *Ricinus communis* L. sont regroupés dans les tableaux 5 et 6. Les profils chromatographiques sont présentés dans les figures de 86 à 117 (voir annexe). Ainsi, l'analyse des extraits des feuilles a montré que l'acide gentisique est le composé phénolique majoritaire dans toutes les populations étudiées à l'exception de la population de nabeul (Nb) pour laquelle la catéchine est le composé le plus important (816,98 $\mu\text{g/ml}$). Ainsi, les teneurs en acide gentisique varient de 400,25 $\mu\text{g/ml}$ (Nefza) (N) à 1102,4 $\mu\text{g/ml}$ (Aouled Amer) (AA). La population de Hammamet (H) est la plus riche en composés phénoliques, elle contient tous les composés utilisés comme étalons. La population d'Aouled Amer montre des teneurs importantes en catéchine (466,16 $\mu\text{g/ml}$), rutine (422,53 $\mu\text{g/ml}$) et acide vanillique (417 $\mu\text{g/ml}$). La population de Khanguet Hajej (KH) présente des concentrations élevées de catéchine (572,87 $\mu\text{g/ml}$) et de rutine (342,67 $\mu\text{g/ml}$). La population de Riadh Andalous (RA) est riche en épicatechine (385,74 $\mu\text{g/ml}$) et en rutine (380,45 $\mu\text{g/ml}$).

La population de Nefza (N) montre une quantité importante d'acide vanillique (172,25 µg/ml). Concernant la population de Bouficha (Bf), l'extarait des feuilles est riche en épicatechine (517,65 µg/ml) et en rutine (317,91 µg/ml). La population de Béja (B) est riche en vitexine (157 µg/ml) et en catéchine (153,62 µg/ml). Enfin la population de Nabeul présente des teneurs importantes en acide gentsique (656,38 µg/ml) et épicatechine (352,64 µg/ml).

Les résultats des analyses quantitatives et qualitatives des extraits méthanoliques des racines de ricin ont montré que les teneurs en composés phénoliques sont plus importantes au niveau des feuilles qu'au niveau des racines. Ainsi la population d'Aouled amer présente une teneur importante d'acide vanillique (243,59 µg/ml). Pour la population de Hammamet l'acide gentsique est le composé majoritaire (717,16 µg/ml). Cette population présente aussi des teneurs importantes d'épicatechine (397,66 µg/ml) et d'acide vanillique (377,75 µg/ml). L'acide gentsique et la rutine sont les composés majoritaires dans l'extrait racinaire de la population de Riadh Andalous avec des valeurs respectives de 264,27 µg/ml et 222,19 µg/ml. La rutine est aussi le composé le plus important dans l'extrait des racines de la population de Khanguet Hajej (165,46 µg/ml). Quant à la catéchine est le composé majoritaire identifié dans l'extrait des racines de la population de Nefza (281,81 µg/ml).

Les analyses ont montré aussi que l'acide vanillique, l'acide gentsique et l'épicatechine sont les composés les plus importants dans l'extrait racinaire de la population de Bouficha avec des valeurs respectives de 496,01 µg/ml, 367,4 µg/ml et 289,24 µg/ml. La population de Béja est riche en deux composés majoritaires : l'épicatechine (346,94 µg/ml) et l'acide vanillique (314,01 µg/ml). Enfin, l'extrait racinaire de la population de Nabeul est le moins riche en composés phénoliques. Cette population est surtout riche en rutine (62,88 µg/ml).

Il est à noter qu'au cours de cette étude on n'a pas pu identifier certains composés phénoliques présents dans les extraits des feuilles et des racines des populations de ricin par manque des étalons adéquats.

En comparaison avec la littérature, nos résultats sont en bon accord avec les recherches qui ont montré que les extraits des feuilles et des racines de ricin sont riches en composés phénoliques (Chen et *al.*, 2008). Ainsi, les composés identifiés sont essentiellement l'acide gentsique, l'acide gallique, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique, l'acide caféique, l'epicatéchine, l'acide p-coumarique et la rutine (Singh and Chauhan, 2009 ; Ghosh et *al.*, 2013). Par contre notre étude montre pour la première fois la présence dans les extraits méthanolique des feuilles et des racines de ricin de l'acide protocatéchique, la catéchine, la vitexine et la naringine. Par ailleurs, des études ont identifié d'autres composés phénoliques mais qui n'ont pas été identifiés dans notre étude tels que le kaempferol et la quercetine (Kang et *al.*, 1985 ; Jena and Gupta, 2012).

Tableau 5. Analyse quantitative et qualitative des extraits des feuilles de huit populations de ricin.

Ref	T _R (min)	Nom du composé	Feuilles (µg/ml)							
			AA	H	KH	RA	N	Bf	B	Nb
1	6,6±0,2	acide gallique acide	74,7±0,28	38,58±0,4	55,36±0,22	66,4±28	34,4±0,21	47,42±0,59	20,39±0,31	37,45±0,19
2	10,55±0,3	protocatechique	56,54±0,34	10,66±0,08	29,95±0,62	32,7±0,1	18,74±0,07	157,79±0,41	-	6,75±0,7
3	14,05±0,5	acide gentisique	1102,4±0,07	1092,64±0,19	574,27±0,03	1001,61±0,07	400,25±0,14	842,33±0,47	515,14±0,3	656,38±0,73
4	18,4±0,8	Catechine	466,16±0,05	83,38±0,23	572,87±0,1	23,59±0,1	35,3±0,07	155,29±0,94	153,62±0,28	816,98±1,04
5	19,8±0,7	acide chlorogénique	-	12,32±0,07	-	103,33±0,09	-	-	-	-
6	20,6±0,95	acide vanillique	417±0,11	15,59±0,12	-	229,11±0,12	172,25±0,14	-	16,84±0,92	161,38±0,79
7	21,4±0,4	acide caféique	-	20,22±0,21	9,22±0,67	-	19,49±0,3	39,04±1,19	27,33±0,29	-
8	24,1±0,5	Epicatchine	185,63±0,26	53,37±0,17	75,35±0,07	385,74±0,07	82,36±0,19	517,65±1,06	57,13±0,6	352,64±0,65
9	29,5±0,98	acide p-coumarique	-	13,5±0,07	4,77±0,09	-	-	-	-	-
10	34,5±0,7	Rutine	422,53±0,23	329,56±0,14	342,67±0,1	380,45±0,2	72,8±0,04	317,91±0,16	46,35±0,12	-
11	36,4±0,2	Vitexine	100,37±0,28	20,26±0,36	-	85,27±0,1	-	-	157±0,7	-
12	43,4±0,6	Naringine	24,76±0,19	19,22±0,13	83,70±0,19	13,17±0,24	65,55±0,07	-	-	22,69±0,5

Tableau 6. Analyse quantitative et qualitative des extraits des racines de huit populations de ricin.

Ref	T _R (min)	Nom du compose	Racines (µg/ml)							
			AA	H	KH	RA	N	Bf	B	Nb
1	6,6±0,2	acide gallique	14,36±0,19	23,69±0,14	21,13±0,09	16,08±0,02	44,61±0,2	13,95±0,14	54,86±0,76	1,75±0,42
2	10,55±0,3	acide potocatechique	85,8±0,28	5,62±0,1	-	5,7±0,07	-	77,22±0,42	7,06±0,08	59,01±0,4
3	14,05±0,5	acide gentisique	193,4±0,2	717,16±0,19	70,8±0,14	264,27±0,3	60,48±0,28	367,4±0,57	172,5±0,28	36,96±0,38
4	18,4±0,8	Catechine	54,66±0,43	116,38±0,21	6,55±0,21	-	281,81±0,15	55,38±0,76	30,71±0,59	32,68±0,73
5	19,8±0,7	acide chlorogenique	16,26±0,3	-	10,93±0,8	-	-	50,7±0,79	-	-
6	20,6±0,95	acide vanillique	243,59±0,14	377,75±1,2	-	39,44±0,3	189,45±0,2	496,01±1,14	314,01±0,61	26,35±0,78
7	21,4±0,4	acide caféique	-	-	-	-	-	-	-	6,98±0,33
8	24,1±0,5	Epicatchine	187,40±0,07	397,66±0,21	-	120,08±0,07	45,05±0,07	289,24±0,76	346,94±0,19	-
9	29,5±0,98	acide p-coumarique	-	5,6±0,4	-	-	-	-	-	-
10	34,5±0,7	Rutine	81,38±0,24	95,88±0,12	165,46±0,04	222,19±0,07	50,22±0,17	-	82,88±0,82	62,88±0,87
11	36,4±0,2	Vitexine	-	158,48±0,11	15,8±0,14	-	43,44±0,12	-	-	-
12	43,4±0,6	Naringine	-	9,14±0,1	-	-	-	-	-	-

II- Analyses des extraits de jatropha

II-1 Chromatogrammes des étalons

Les figures 49 et 50 présentent les profils chromatographiques du mélange d'étalons utilisé pour identifier la composition des extraits de jatropha. Les analyses sont faites à deux longueurs d'ondes 280 nm et 320 nm. Ce mélange est formé par 7 étalons dissous dans une solution méthanol-eau 50 :50 (v/v) à des concentrations différentes : 0,25 mg/ml pour l'acide p-coumarique et l'acide cinnamique, 0,5 mg/ml pour l'acide chlorogénique, 1 mg/ml pour l'épicatéchine et 1,25 mg/ml pour la rutine et la naringine. Il est à noter que la vitexine a été injectée toute seule pour une meilleure détection (Figure 51 et 52).

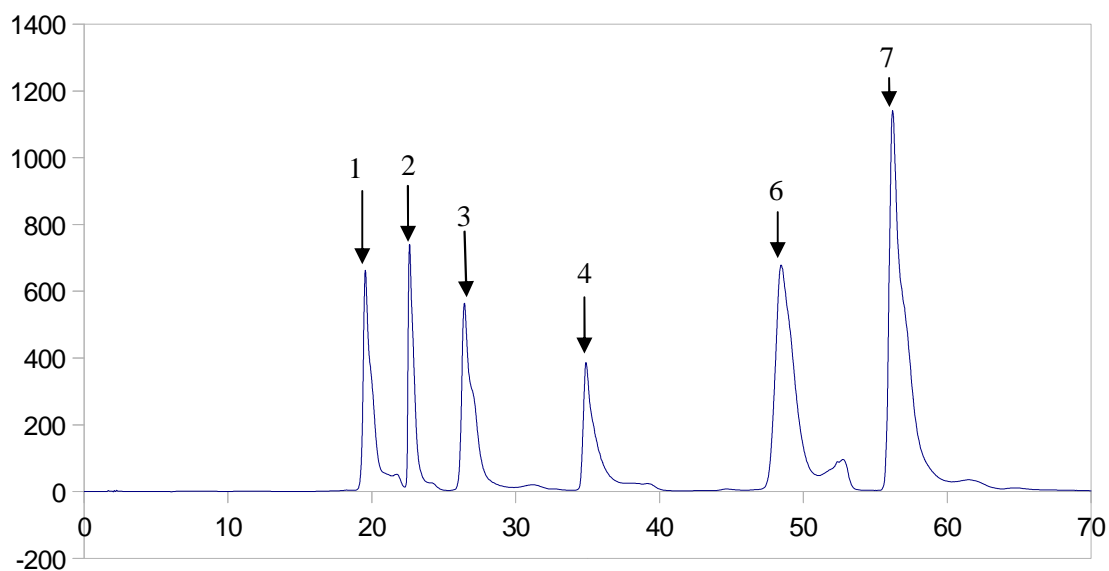


Figure 49. Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 280 nm.

1: acide chlorogénique, 2: epicatechine, 3: acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine, 7 : acide cinnamique.

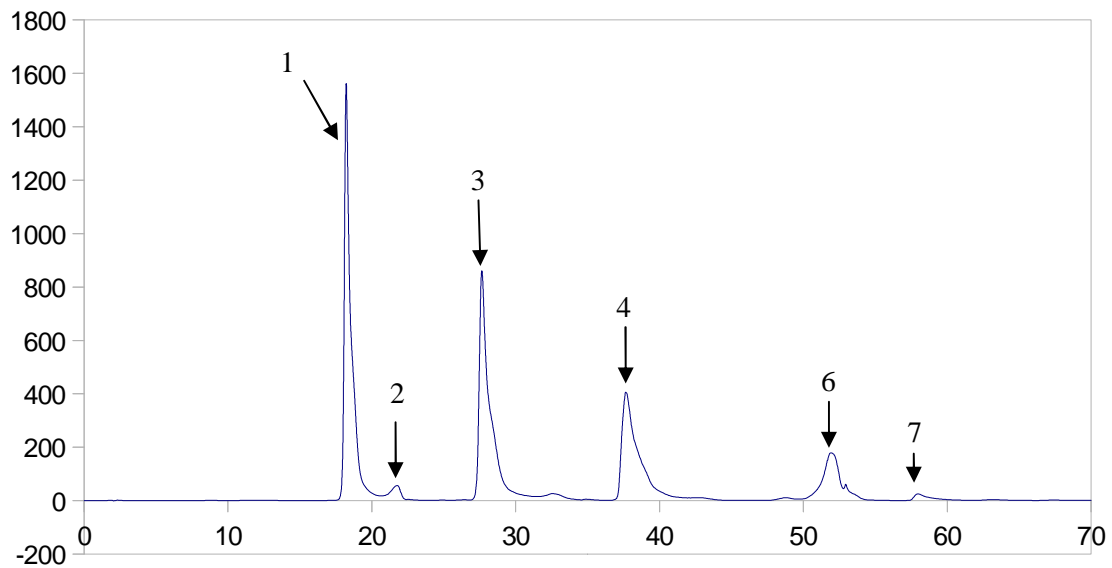


Figure 50. Profil du chromatogramme du mélange des étalons à 320 nm.

1: acide chlorogénique, 2: epicatechine, 3: acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine, 7 : acide cinnamique.

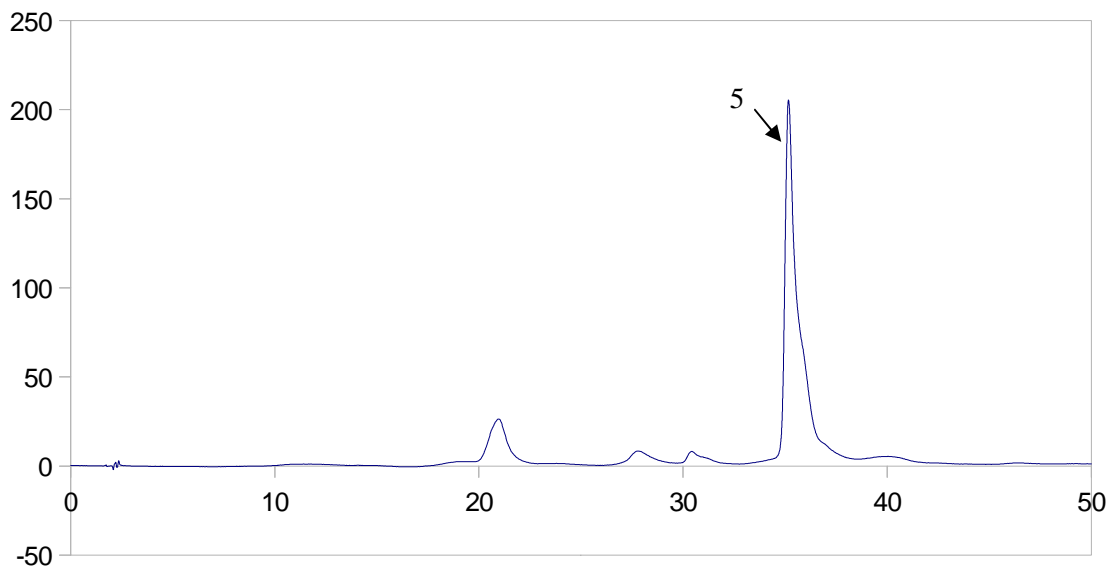


Figure 51. Profil du chromatogramme de la vitexine à 280 nm.

5 : vitexine

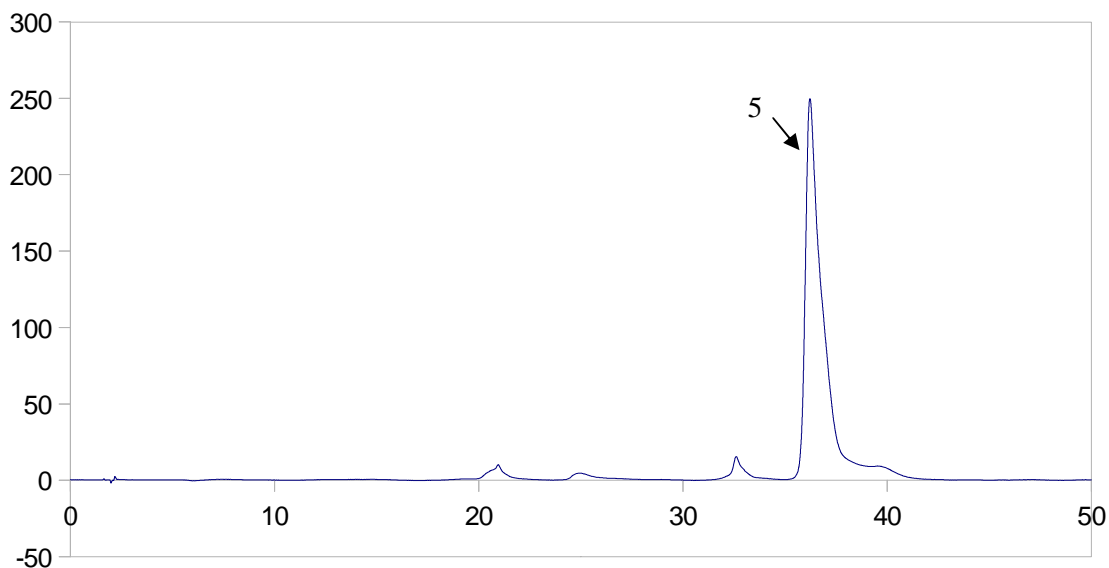


Figure 52. Profil du chromatogramme de la vitexine à 320 nm.

5 : vitexine

II-2 Analyse des extraits de jatropa

Les résultats obtenus à partir de l'étude quantitative et qualitative des extraits des feuilles et des racines de huit populations de jatropa sont regroupés dans les tableaux 7 et 8. Les chromatogrammes correspondants sont reportés dans l'annexe par les figures de 118 à 149. Cette étude a montré que les extraits des feuilles sont plus riches en composés phénoliques que les extraits des racines. L'étude a montré que les extraits des feuilles des populations Mato Grosso Brésil (P5), Região sudeste Brésil (P6), Vale do Jequitinhonha Brésil (P7) et Suriname (P8) sont surtout riches en épicatechine et en rutine. Ainsi les teneurs d'épicatechine sont de (175,84 µg/ml), (213,13 µg/ml), (210,04 µg/ml) et (215,73 µg/ml) respectivement pour les populations P5, P6, P7 et P8. Quant aux teneurs de la rutine sont de l'ordre de 310,12 µg/ml, 48,12 µg/ml, 75,65 µg/ml et 210,64 µg/ml respectivement pour les mêmes populations. En ce qui concerne le reste des populations, les analyses ont montré que la rutine (38,3 µg/ml) est aussi le composé majoritaire dans l'extrait méthanolique des feuilles de la population de Norte de Minas Brésil (P4). La population de Paraná Brésil (P3) présente deux composés majoritaires qui sont l'épicatechine (112,6 µg/ml) et la naringine (85,05

µg/ml). Pour l'extrait des feuilles de la population d'Arusha Tanzanie (P1), il est surtout riche en naringine (33,57 µg/ml) et en acide chlorogénique (23,75 µg/ml). Enfin la population de Mozambique (P2) est riche en épicatechine (90,11 µg/ml) puis en rutine (38,94 µg/ml).

Les résultats correspondant à l'étude quantitative et qualitative des extraits méthanoliques des racines de huit populations de jatropha montrent que l'épicatechine est le composé majoritaire identifié dans cinq populations : P2, P3, P4, P6 et P8. Ainsi, les teneurs d'épicatechine sont de l'ordre de (107,64 µg/ml), (31,83 µg/ml), (3,1 µg/ml), (33,95 µg/ml) et (31,72 µg/ml) respectivement pour les populations P2, P3, P4, P6 et P8. L'extrait des racines de la population P1 présente des traces d'acide chlorogénique (12,95 µg/ml), d'épicatechine (10,35 µg/ml) et d'acide cinnamique (0,88 µg/ml). Quant à l'extrait des racines de la population P5 est riche en naringine (45,84 µg/ml) et en épicatechine (26,33 µg/ml). Cet extrait présente aussi des traces d'acide chlorogénique, d'acide p-coumarique et de rutine. La population P7 présente au niveau des racines des traces de naringine et d'acide chlorogénique avec des valeurs respectives de 5,17 µg/ml et 3,23 µg/ml.

En comparaison avec la littérature, nos résultats sont en bon accord avec les recherches qui ont montré que les extraits des feuilles et des racines de jatropha sont riches en composés phénoliques essentiellement les polyphénols glycosylés (List and Horhammer, 1979). Ainsi, les recherches ont montré la présence dans ces extraits méthanoliques de jatropha de la rutine, la vitexine et la naringine (Abd-Alla *et al.*, 2009 ; Namuli *et al.*, 2011). Par contre, notre étude montre pour la première fois la présence dans ces extraits de l'acide chlorogénique, l'épicatechine, l'acide p-coumarique et l'acide cinnamique.

Par ailleurs, des recherches ont montré la présence dans les extraits de jatropha d'autres composés phénoliques mais qui n'ont pas été identifiés dans notre étude tels que l'acide gallique, l'acide vanillique, l'apigénine, l'isovitexine, l'orientine, l'acide ellagique et le nobiletin (Ling-yi *et al.*, 1996, Abd-Alla *et al.*, 2009 ; Manpong *et al.*, 2009 ; Namuli *et al.*, 2011).

Tableau 7. Analyse quantitative et qualitative des extraits des feuilles de huit populations de jatropha.

Ref	T _R (min)	Nom du composé	Feuilles (µg/ml)							
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
1	19,3±0,56	acide chlorogénique	23,75±0,91	-	23,17±0,67	-	-	45,95±0,63	-	-
2	22,2±0,6	Epicatéchine	-	90,11±1,10	112,69±1,01	-	175,84±0,91	213,13±0,04	210,04±0,24	215,73±1,03
3	27,04±0,85	acide p-coumarique	-	21,94±0,93	-	-	-	-	64,08±0,62	31,01±0,7
4	35,58±0,73	Rutine	12,23±0,5	38,94±1,2	-	38,3±1,15	310,12±0,53	48,12±0,74	75,65±0,42	210,64±1,02
5	36,95±0,42	Vitexine	-	-	-	-	32,1±0,56	16,48±0,59	-	-
6	51,82±0,21	Naringine	33,57±0,82	31,39±0,74	85,05±0,86	17,12±0,24	-	-	83,46±0,27	25,19±0,24
7	56,88±0,94	acide cinnamique	0,51±0,02	-	-	-	12,8±1,06	-	5,97±0,07	-

Tableau 8. Analyse quantitative et qualitative des extraits des racines de huit populations de jatropha.

Ref	T _R (min)	Nom du composé	Racines (µg/ml)							
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
1	19,3±0,56	acide chlorogénique	12,95±0,14	0,62±0,04	-	0,67±0,03	8,01±0,26	-	3,23±0,16	-
2	22,2±0,6	Epicatéchine	10,35±0,91	107,64±0,5	31,83±1,18	3,1±0,24	26,33±1,4	33,95±0,77	-	31,72±0,8
3	27,04±0,85	acide p-coumarique	-	1,21±0,13	-	-	0,13±0,02	-	-	-
4	35,58±0,73	Rutine	-	36,9±0,5	-	-	2,38±0,48	-	-	-
5	36,95±0,42	Vitexine	-	-	-	-	-	1,08±0,02	-	-
6	51,82±0,21	Naringine	-	26,8±0,84	2,9±0,84	0,88±0,02	45,84±0,53	1,46±0,07	5,17±0,14	6,97±0,1
7	56,88±0,94	acide cinnamique	0,88±0,05	4,67±0,3	-	0,08±0,007	-	-	1,4±0,07	-

III- Analyses statistiques

Suite à l'étude quantitative et qualitative par HPLC des extraits des feuilles et des racines de huit populations de ricin et de jatropha, une analyse de la variance par le programme SAS a été réalisée. Cette analyse a montré que la différence entre les teneurs en composés phénoliques identifiés est hautement significative aussi bien pour les extraits des feuilles et des racines de toutes les populations des deux espèces ($P < 0,0001$) pour tous les composés identifiés et quantifiés.

IV- Conclusion

L'étude phytochimique par HPLC des extraits méthanoliques des feuilles et des racines des deux espèces étudiées a montré que les extraits des feuilles et des racines de ricin présentent plus de composés phénoliques identifiés et quantifiés comparativement aux extraits de jatropha. La même étude a montré la présence des composés phénoliques communs entre les deux espèces et d'autres qui sont spécifiques pour chaque espèce. Ainsi, les extraits méthanoliques des feuilles et des racines de ricin sont caractérisés essentiellement par des quantités importantes d'acide gentisique et qui est totalement absent dans les extraits de jatropha. Les extraits de ricin sont caractérisés aussi par d'autres composés phénoliques et qui sont présents avec des quantités moins importantes tels que l'acide gallique, l'acide protocatechique, la catéchine, l'acide vanillique et l'acide caféique. Quant aux extraits méthanoliques des feuilles et des racines de jatropha, ils diffèrent des extraits de ricin par la présence de l'acide cinnamique. D'autres composés phénoliques sont identifiés dans les extraits des deux espèces. Il s'agit de l'épicatchine, l'acide p-coumarique, la rutine, la vitexine et la naringine.

Chapitre III: Etude de la composition chimique des huiles fixes

I- Etude des huiles fixes de ricin

- Cas de l'acide ricinoléique

Au cours de l'analyse des huiles fixes de ricin, on a constaté que pour toutes les populations étudiées, le composé majeur de l'huile de ricin qui est l'acide ricinoléique qui porte une fonction hydroxyle sur le carbone en position 12. Dans les conditions opératoires, la fonction hydroxyle réagit rapidement sur le groupement acide pour former une macrolactone (13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one) selon la réaction présentée par la figure 53. Par la suite, en présence de méthylate de sodium et d'un excès de méthanol, la macrolactone se transestérifie en son ester méthylé correspondant.

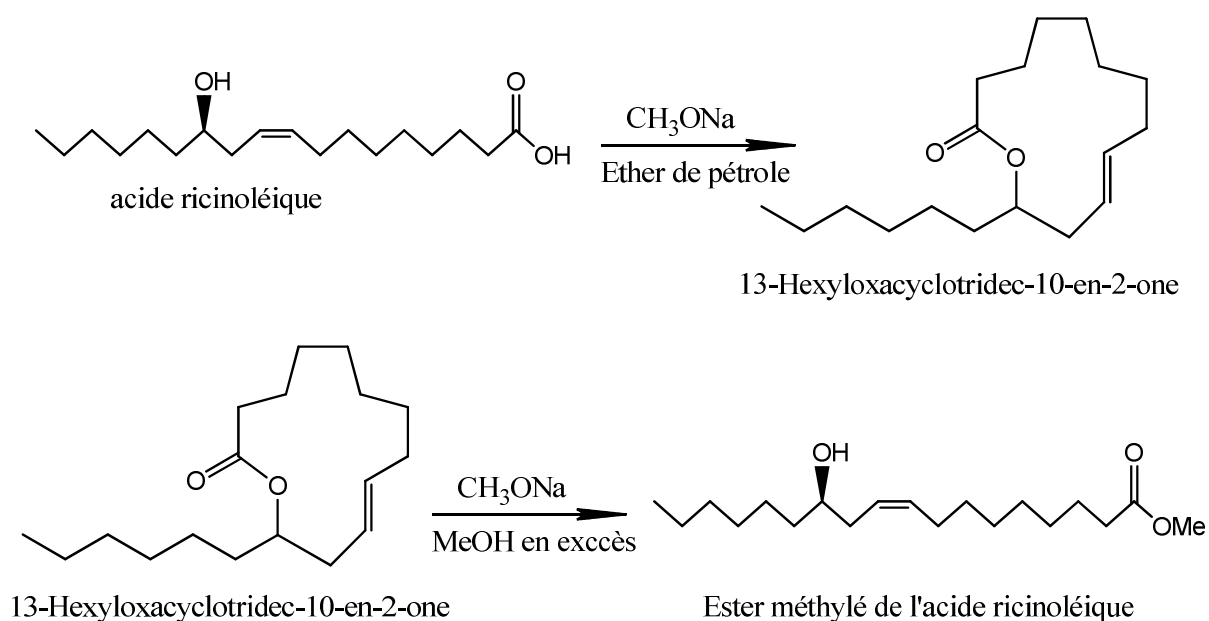


Figure 53. Schéma simplifié de la formation de macrolactone.

Les différentes étapes de formation de l'ester méthylique de l'acide ricinoléique ont été mises en évidence par la GC-MS. En effet, les figures 54 à 58 ainsi que le tableau 9 montrent le suivi de l'apparition de l'ester méthylique et de la disparition de la macrolactone en fonction du temps chez la population de Hammamet.

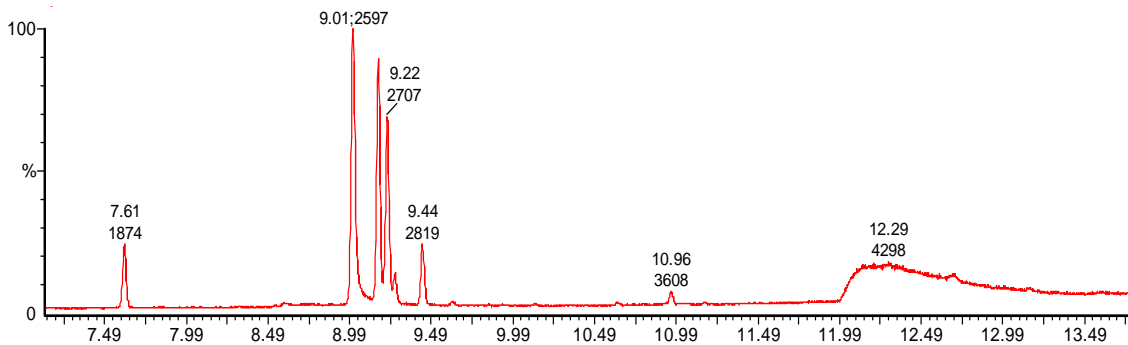


Figure 54. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet après 1 minute.

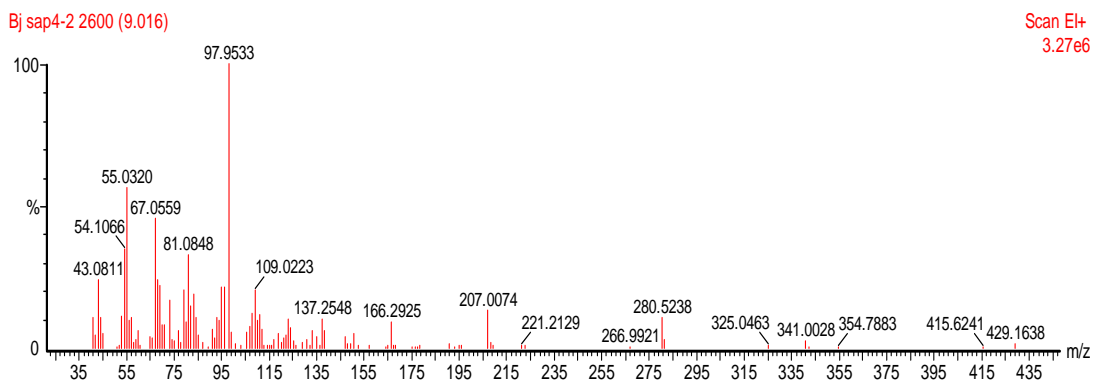


Figure 55. Spectre de masse de la macrolactone (13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one).

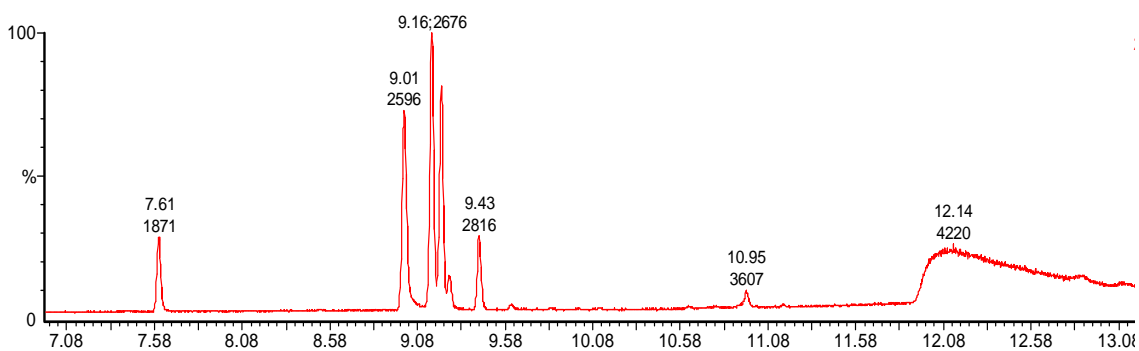


Figure 56. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet après 30 minutes.

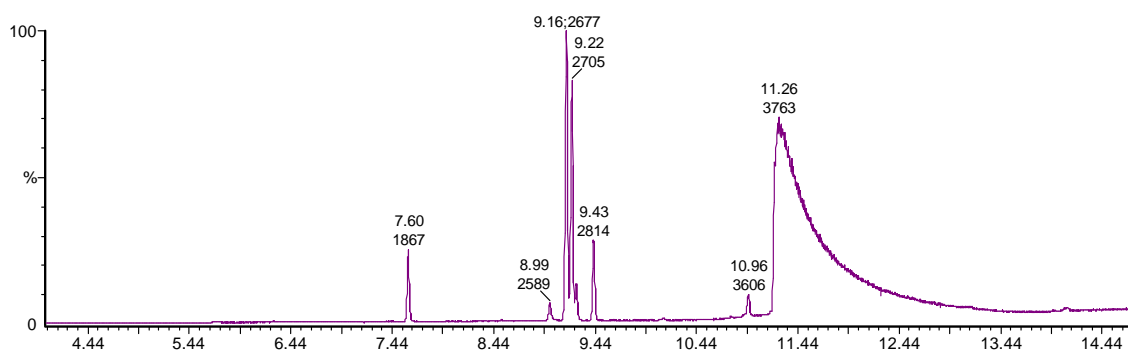


Figure 57. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet après 1 heure.

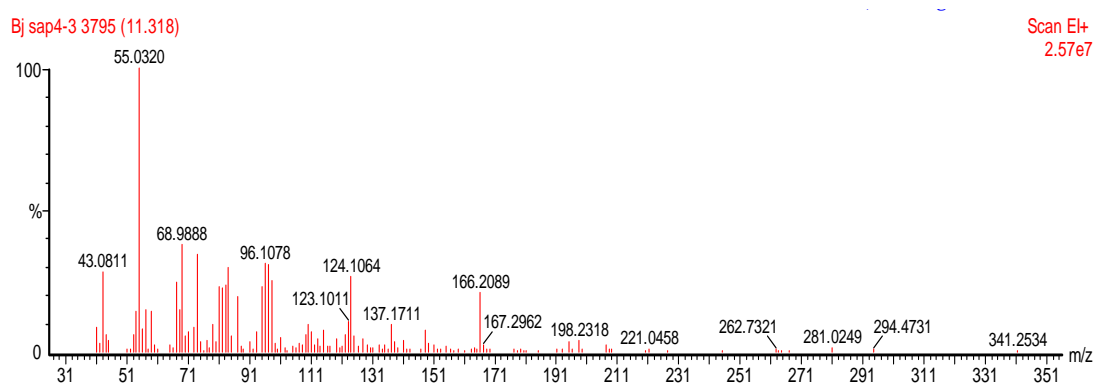


Figure 58. Spectre de masse de l'ester méthylique d'acide ricinoléique.

Tableau 9. Pourcentages des aires des pics correspondants à l'ester méthylé d'acide ricinoléique et à la macrolactone présentés par le chromatogramme enregistré par la GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet en fonction du temps.

Temps (min)	T _R (min)	Composé identifié	% de composé dans l'huile
1	9.00	13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one	71.0
	12.29	Ester méthylé d'acide ricinoléique	17.8
30	9.00	13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one	11.9
	12.14	Ester méthylé d'acide ricinoléique	57.0
60	9.00	13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one	0.4
	11.3	Ester méthylé d'acide ricinoléique	85.5

• Résultats de l'analyse chimique des huiles de ricin

Les huiles fixes de différentes populations de ricin ont été analysées (après 1h de la préparation) par GC-MS. Les résultats obtenus sont représentés par les figures des profils chromatographiques de 59 à 66 ainsi que le tableau 10. Les spectres d'analyses ont permis

d'identifier plusieurs composés ainsi que leurs quantités dans les extraits testés. Les acides gras qui ont été identifiés peuvent être groupés en trois familles.

La première famille regroupe la majorité des composés identifiés. Il s'agit des omégas 9 qui sont des acides gras mono-insaturés dont la double liaison C=C implique le neuvième carbone en partant de l'extrémité opposée au groupe acide. Dans cette famille on peut citer l'acide ricinoléique ($C_{18}H_{34}O_3$) dont les pourcentages varient entre 74.75 ± 4.5 % chez la population de Bouficha (Bf) et 85.9 ± 0.02 % chez la population de Nefza (N), l'acide oléique ($C_{18}H_{34}O_2$) avec des pourcentages variant entre 4.5 ± 0.07 % chez la population de Nefza et 7.65 ± 1.3 % chez la population de Bouficha et l'acide gadoléique ($C_{20}H_{38}O_2$) avec un pourcentage maximal qui ne dépasse pas 0.85 ± 0.2 % chez la population de Bouficha.

La deuxième famille est formée par l'acide linoléique ($C_{18}H_{32}O_2$), il s'agit d'un acide gras poly-insaturé oméga 6 et 9. Cet acide gras est présent chez toutes les populations analysées avec des pourcentages qui varient entre 5.75 ± 0.07 % chez la population de Nefza et 9.25 ± 1.6 % chez la population de Bouficha.

La dernière famille est formée par les acides gras saturés qui sont présents sous forme de traces. Il s'agit de l'acide palmitique ($C_{16}H_{32}O_2$) et de l'acide stéarique ($C_{18}H_{36}O_2$) dont les pourcentages maximaux ne dépassent pas 2.5 ± 0.4 % et 2.6 ± 0.4 % respectivement chez la population de Bouficha.

En comparaison avec la littérature, nos résultats sont en bon accord avec les recherches qui ont montré que l'acide ricinoléique est le composé majoritaire dans l'huile de ricin (Kang *et al.*, 1985). D'autres acides sont présents avec des faibles pourcentages tels que les acides linoléique, oléique, stéarique et palmitique (Da Silva *et al.*, 2009). Par contre notre étude montre pour la première fois la présence de l'acide gadoléique ou l'acide 11-eicosénoïque.

Après l'étude quantitative et qualitative des huiles fixes de ricin une analyse de la variance a été réalisée. L'analyse de la variance a montré que la différence est significative entre les populations pour les paramètres acide ricinoléique, acide 11-eicosénoïque et 13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one avec des valeurs de P respectivement de 0,0348, 0,0425 et 0,0005. Pour le reste des paramètres la différence entre les populations est non significative: acide palmitique ($P = 0,1085$), acide linoléique ($P = 0,0992$), acide oléique ($P = 0,0657$) et acide stéarique ($P = 0,1675$).

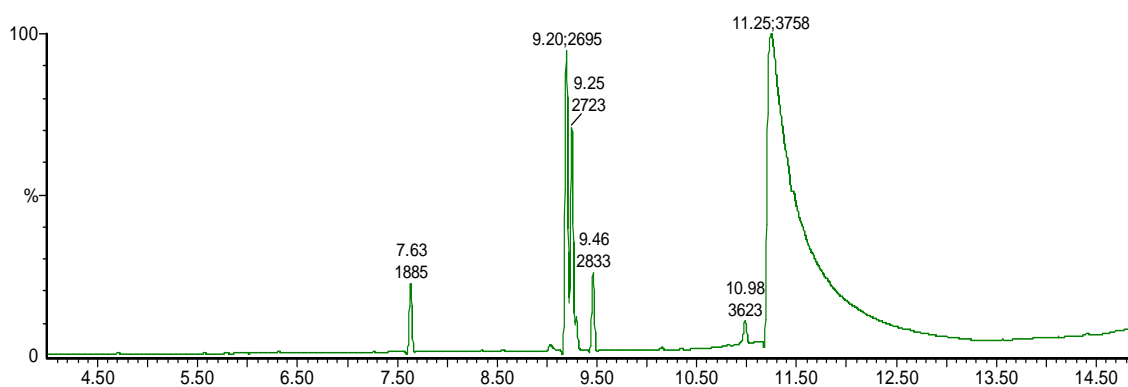


Figure 59. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Béja.

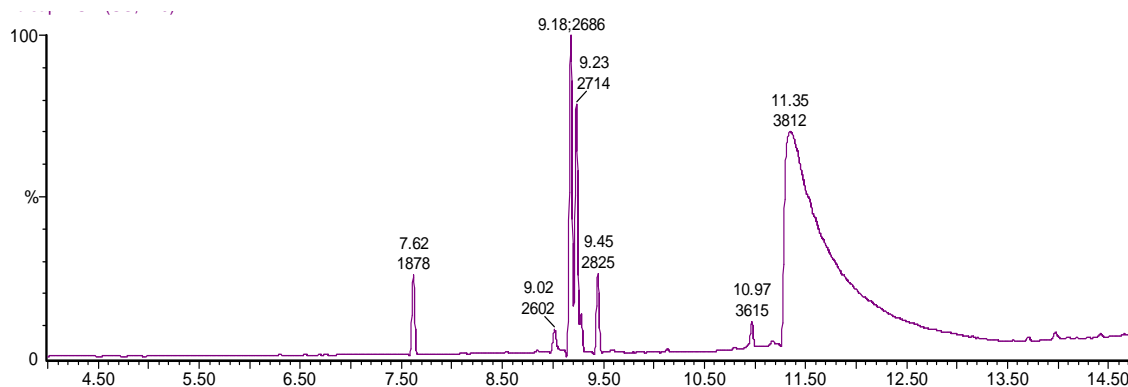


Figure 60. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Nabeul.

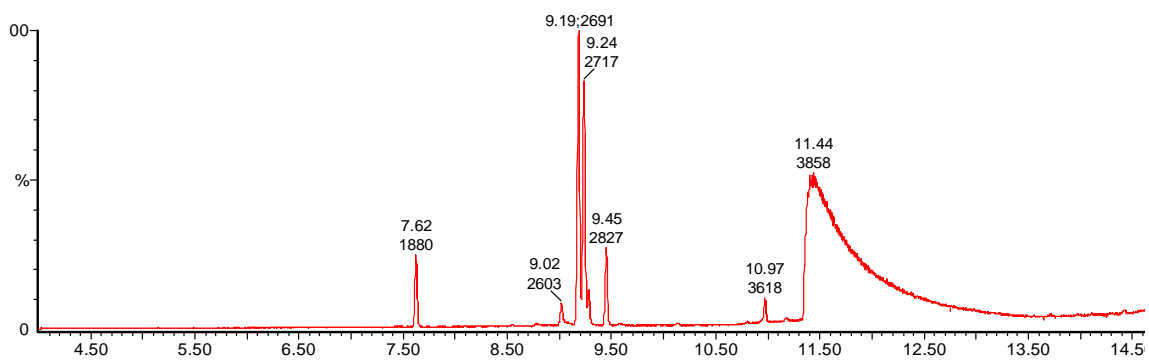


Figure 61. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Khanguet Hajej.

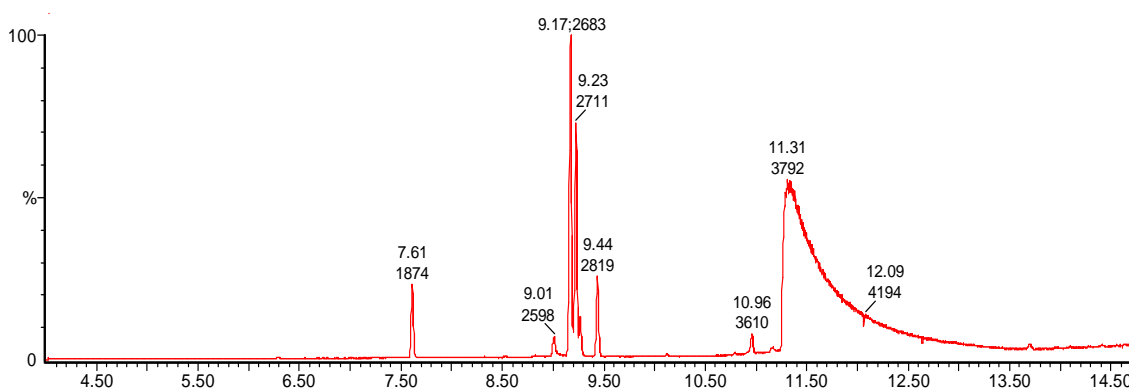


Figure 62. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Riadh Andalous.

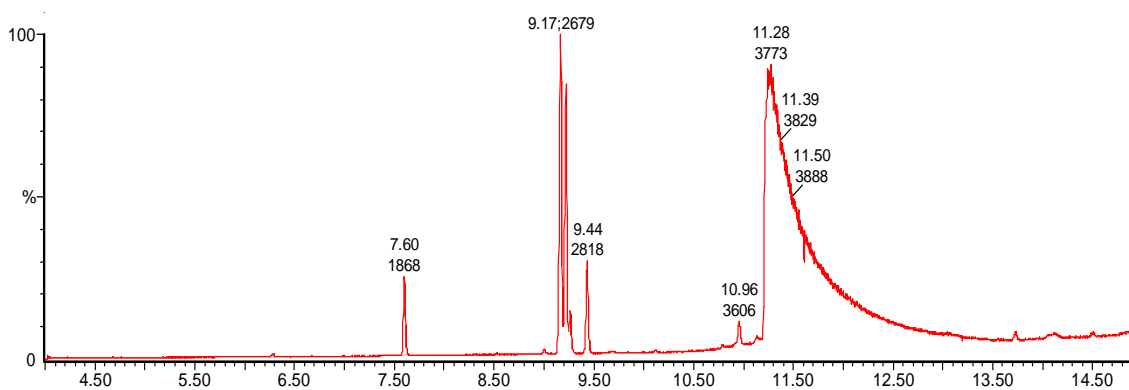


Figure 63. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Nefza.

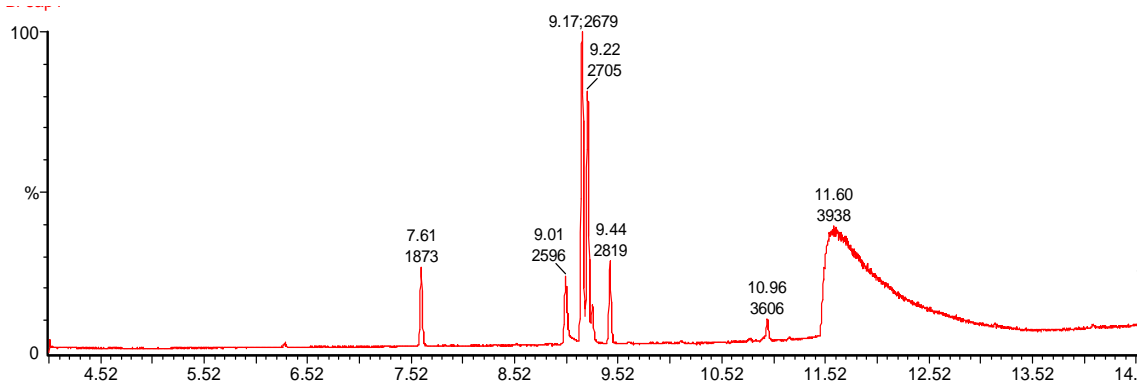


Figure 64. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Bouficha.

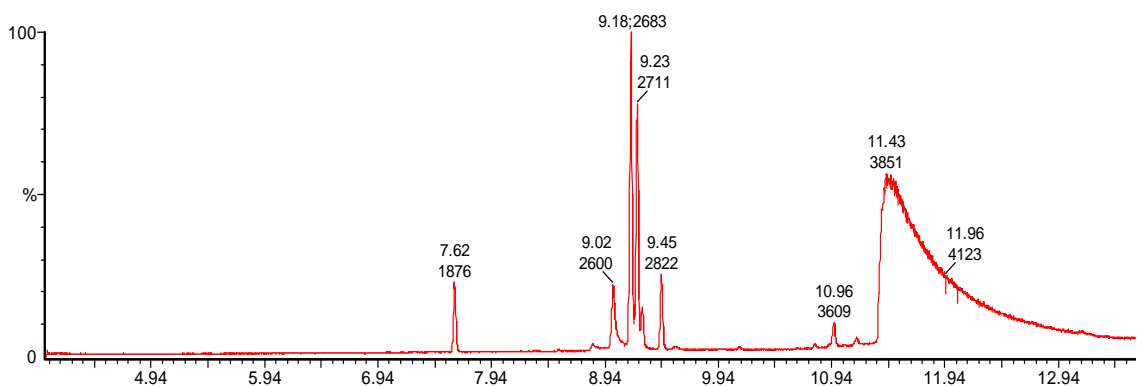


Figure 65. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Aouled Amer.

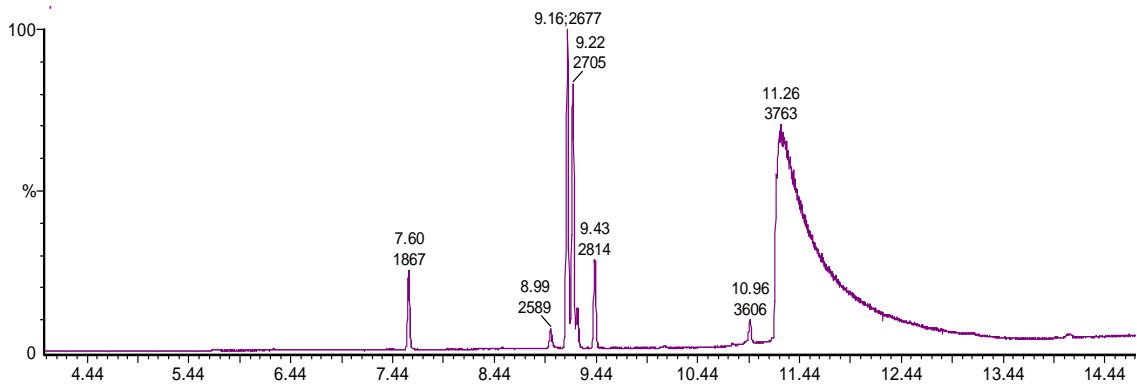


Figure 66. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de ricin de la population de Hammamet.

Tableau 10. Analyse quantitative et qualitative des huiles fixes de huit populations de ricin.

Ref	T _R (min)	Nom du composé identifié	% du composé dans l'huile							
			B	N	AA	Bf	H	RA	KH	Nb
2	7.6	Ester méthylé d'acide palmitique	1.6±0.2	1.45±0.07	2.05±0.4	2.5±0.4	1.55±0.2	1.75±0.3	2.1±0.2	2±0
3	9.00	13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one	0.4±0.2	-	2.1±0.2	2.4±0.7	0.45±0.07	0.55±0.07	0.9±0.2	0.65±0.07
4	9.2	Ester méthylé d'acide linoléique	6.7±0.8	5.75±0.07	7.9±1.6	9.25±1.6	6.05±0.4	7.05±0.7	7.95±0.7	7±0
5	9.3	Ester méthylé d'acide oléique	5±0.6	4.5±0.07	6.5±1.4	7.65±1.3	5±0.4	5.25±0.4	6.35±0.6	5.5±0.03
6	9.5	Ester méthylé d'acide stéarique	1.9±0.2	1.75±0.07	2.2±0.4	2.6±0.4	1.85±0.2	2.05±0.2	2.25±0.2	1.95±0.07
7	11.00	Ester méthylé d'acide 11-eicosénoïque ou ester méthylé d'acide gadoléique	0.6±0.06	0.55±0.07	0.75±0.07	0.85±0.2	0.5±0	0.6±0	0.7±0	0.7±0
8	11.4	Ester méthylé d'acide ricinoléique	83.5±2.2	85.9±0.02	78.45±3.8	74.75±4.5	84.6±1.2	82.75±1.9	79.75±2.1	82.1±0

II- Etude des huiles fixes de jatropha

Après transestérification, les huiles fixes de huit populations de jatropha ont été analysées par GC-MS. Les résultats obtenus sont représentés par les figures des profils chromatographiques de 67 à 74 ainsi que par le tableau 11. Les analyses ont permis d'identifier plusieurs composés ainsi que leurs quantités dans les extraits testés. Ainsi, on a constaté la présence de deux acides gras en proportions majeures qui sont l'acide oléique (oméga-9) et l'acide linoléique (oméga-6 et 9). Ces deux acides gras sont présents dans les huiles de jatropha avec un rapport entre eux qui varie selon les populations. Ce rapport est de l'ordre de 40/60 (acide linoléique /acide oléique) chez quatre populations qui sont Arusha Tanzanie (P1), Mozambique (P2), Paraná Brésil (P3) et Regiao sudeste Brésil (P6). Ce rapport a augmenté en passant de 42/58 chez les populations de Norte de Minas Brésil (P4) et de Suriname (P8) puis 46/54 chez la population de Mato Grosso Brésil (P5) jusqu'à atteindre 49/51 chez la population de Vale do Jequitinhonha Brésil (P7).

L'étude a montré la présence des acides gras saturés dans l'huile de jatropha. Ces acides gras sont l'acide palmitique avec des pourcentages qui varient entre $12.3 \pm 0.1\%$ chez la population P1 et $14.85 \pm 2.4\%$ chez la population P3 et l'acide stéarique présent avec des pourcentages qui sont autour de 6 % pour toutes les populations. L'huile de jatropha contient aussi des traces d'acide palmitoléique qui est un acide gras mono-insaturé ($C_{16}H_{30}O_2$).

En comparaison avec la littérature, nos résultats sont en bon accord avec les recherches qui ont montré que l'huile de jatropha est essentiellement formée par deux acides gras qui sont l'acide oléique et l'acide linoléique (Akbar *et al.*, 2009). D'autres acides gras sont présents dans cette huile mais avec des concentrations faibles tels que les acides stéarique, palmitique et palmitoléique (Gubitz *et al.*, 1999 ; Martinez-Herrera *et al.*, 2006 ; Rodrigues *et al.*, 2013). Ces derniers auteurs ont montré la présence dans l'huile de jatropha d'autres acides gras mais qui

n'ont pas été identifiés dans notre étude tels que les acides myristique, arachidique et béhénique.

Après l'étude quantitative et qualitative des huiles fixes de jatropha une analyse de la variance a été réalisée. L'analyse de la variance a montré que la différence entre les populations est significative pour un seul paramètre qui est l'acide oléique ($P = 0,0007$). Pour le reste des paramètres, la différence est non significative entre les populations : acide palméoléique ($P = 0,5854$), acide palmitique ($P = 0,6136$), acide linoléique ($P = 0,1113$) et acide stéarique ($P = 0,4139$).

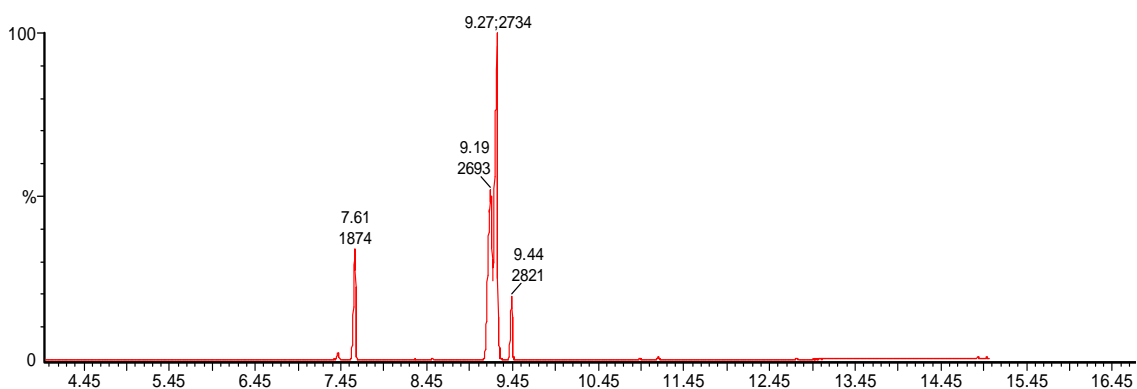


Figure 67. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P1.

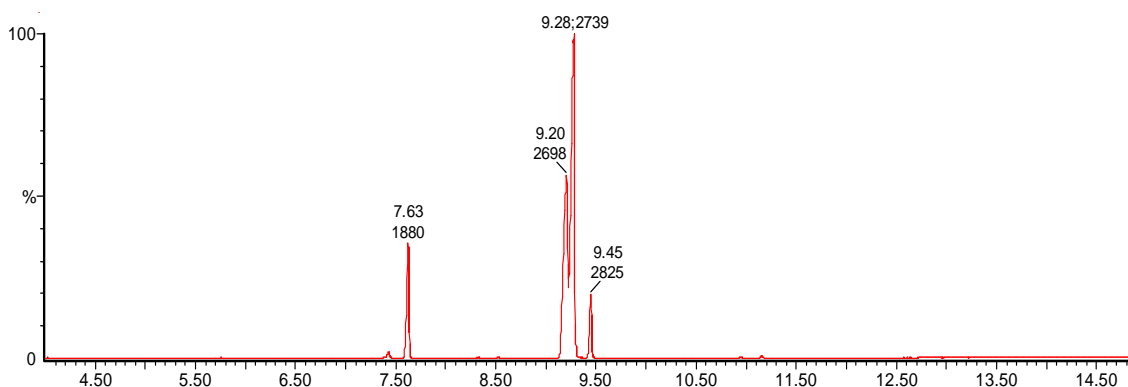


Figure 68. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P2.

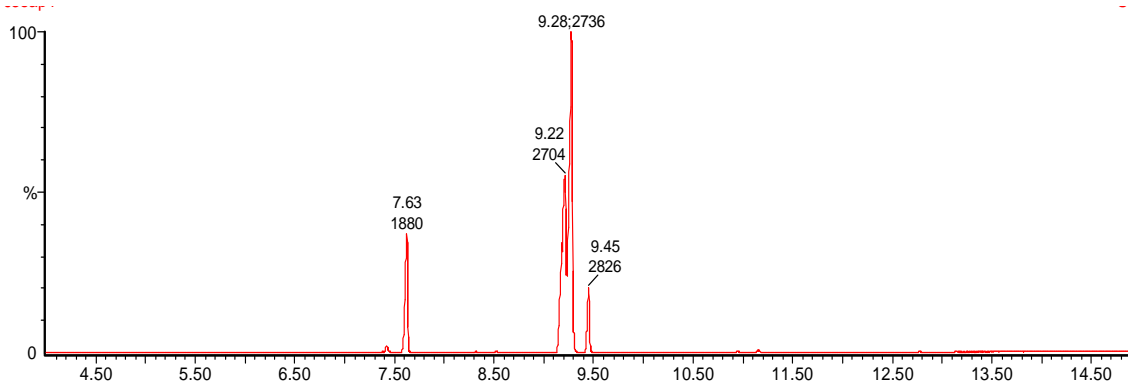


Figure 69. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P3.

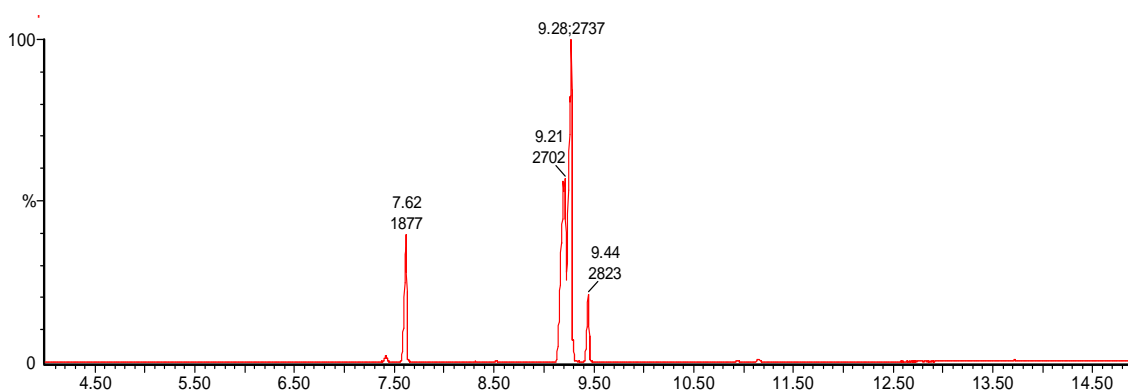


Figure 70. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P4.

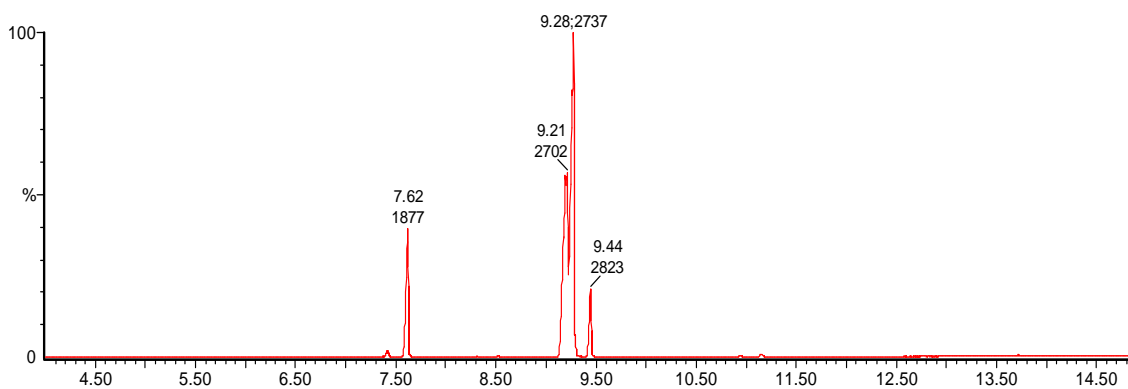


Figure 71. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P5.

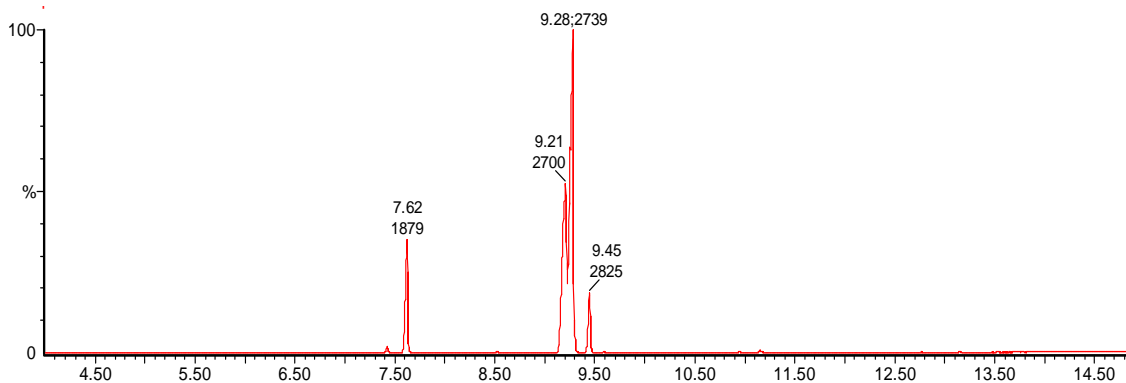


Figure 72. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P6.

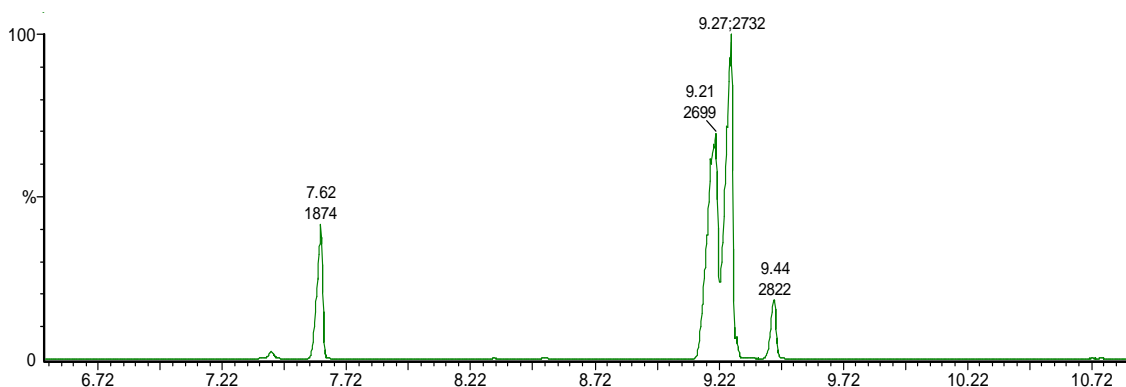


Figure 73. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P7.

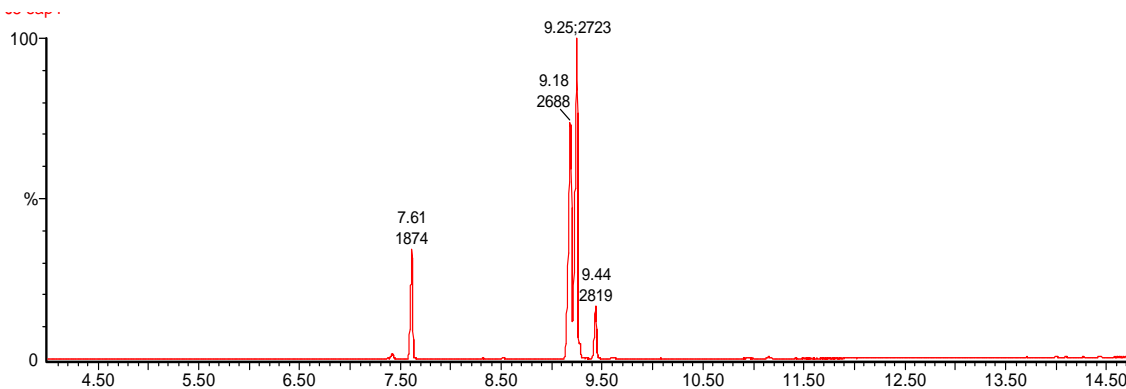


Figure 74. Chromatogramme d'analyse GC-MS d'huile de jatropha de la population de P8.

III- Conclusion

L'étude par GC-MS des huiles fixes de ricin et de jatropha a montré que l'huile de ricin est formée essentiellement de l'acide ricinoléique et qui donne lieu à une macrolactone (13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one). Cet acide gras ainsi que sa macrolactone

correspondante sont totalement absents dans l'huile de jatropha. Quant à l'huile de jatropha, elle est formée par deux acides gras en proportions majeurs qui sont l'acide oléique et l'acide linoléique. Par contre, ces derniers acides sont présents à l'état de traces dans l'huile fixe de ricin.

Tableau 11. Analyse quantitative et qualitative des huiles fixes de huit populations de jatropha.

Ref	T _R (min)	Nom du composé identifié	% de composé dans l'huile							
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
1	7.4	Ester méthylé d'acide palmitoléique	0.7±0	0.75±0.2	0.8±0.1	0.85±0.2	0.75±0.07	0.6±0	0.8±0	0.8±0
2	7.6	Ester méthylé d'acide palmitique	12.3±0.1	14.35±2.7	14.85±2.4	14.5±1.6	13.3±0	12.45±0.2	13.2±0.1	14±1.2
4	9.2	Ester méthylé d'acide linoléique	33.05±0.2	30.45±3.7	30.3±3.5	32.9±5.5	36.25±0.7	31.6±0.9	38.95±0.7	36.15±1.6
5	9.3	Ester méthylé d'acide oléique	47.9±0	47.5±0	47.45±0.2	44.9±2.6	43.65±0.9	49.4±0.7	41.45±0.7	42.7±0.5
6	9.5	Ester méthylé d'acide stéarique	6±0	6.95±0.9	6.65±0.7	6.85±0.9	6.1±0.1	6±0	5.55±0.2	6.35±0.9

Chapitre IV: Etude des activités anti-oxydantes

I- Résultats du test DPPH

I-1 Le ricin

I-1-1 Etude des activités anti-oxydantes des extraits des feuilles et des racines de ricin

L'étude a montré que les extraits méthanoliques des feuilles et des racines des populations de ricin étudiées possèdent un pouvoir antioxydant assez important. Ce pouvoir est confirmé par des valeurs d'IC50 faibles et des pourcentages d'inhibitions importantes. Ainsi, pour les extraits des feuilles, les valeurs d'IC50 varient entre 0,65 et 3,91 µg/ml. Quant aux extraits des racines, les valeurs d'IC50 varient entre 1,03 et 14,9 µg/ml (Tableau 12).

D'après les résultats obtenus par le test DPPH, on a pu grouper les extraits des feuilles et des racines de ricin en trois groupes : un groupe dont les valeurs d'IC50 < 2 µg/ml et qui indiquent un pouvoir antioxydant assez fort. Ce premier groupe contient les extraits des feuilles et des racines de la population de Hammamet avec des valeurs respectives de 0,65 µg/ml et 1,03 µg/ml, les extraits des feuilles de la population de Nabeul (1,32 µg/ml) et les extraits des racines de la population de Béja (1,43 µg/ml).

Le deuxième groupe est caractérisé par des valeurs d'IC50 qui sont autour de 2 µg/ml et qui indique un pouvoir anti-radicalaire fort. Ce groupe contient la majorité des extraits dont on peut citer par exemple les extraits des feuilles des populations de Riadh Andalous (2,34 µg/ml), d'Aouled Amer (2,42 µg/ml), les extraits des racines des populations de Nefza (3,2 µg/ml) et de Bouficha (2,47 µg/ml).

Le dernier groupe est celui des extraits ayant des valeurs d'IC50 > 2 µg/ml et donc une activité anti-oxydante moins significative. C'est le cas des extraits des racines des populations de Khanguet Hajej et Nabeul avec des valeurs respectives de 5,78 µg/ml et 14,9 µg/ml.

En comparaison avec les recherches trouvées dans la littérature, notre étude montre que tous les extraits méthanoliques des feuilles des populations tunisiennes sont plus actifs que l'extrait méthanolique des feuilles de ricin Indien qui montre une valeur d'IC50 de l'ordre de 4,6 µg/ml (Singh and Chauhan, 2009). En ce qui concerne les extraits méthanoliques des racines, notre étude montre que tous les extraits testés à l'exception de la population de Nabeul sont aussi plus actifs que l'extrait méthanolique des racines de ricin Indien qui montre une valeur d' IC50 de l'ordre de 12 µg/ml en utilisant le test DPPH (Ilavarasan *et al.*, 2005).

Tableau 12. Activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de huit populations de ricin.

Provenance	Matériel végétal	Test DPPH	
		IC50 µg/ml	EVC mg/g MS
Hammamet	Feuilles	0,65±0,028	59,25±1,06
	Racines	1,03±0,02	48,1±1,27
Nabeul	Feuilles	1,32±0,0007	36,33±0,47
	Racines	14,9±1,2	3,1±0,56
Riadh Andalous	Feuilles	2,34±0,015	33,85±0,92
	Racines	2,63±0,04	12±0,35
Khanguet Hajej	Feuilles	2,39±0,014	25,75±1,06
	Racines	5,78±0,05	4,25±0,35
Aouled Amer	Feuilles	2,42±0,02	24,76±0,79
	Racines	2,49±0,02	16,85±0,91
Bouficha	Feuilles	2,45±0,05	24,6±0,26
	Racines	2,47±0,1	20,5±1,9
Béja	Feuilles	3,30±0,02	6,6±0,56
	Racines	1,43±0,021	34,7±0,74
Nefza	Feuilles	3,91±0,04	5,62±0,88
	Racines	3,2±0,014	11,57±0,24

I-1-2 Etude des activités anti-oxydantes des huiles de ricin

L'activité anti-oxydante des huiles fixes de huit populations de ricin est aussi évaluée et quantifiée par le test DPPH. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 13. Ainsi, ces résultats montrent que les huiles sont moins actives que les extraits méthanoliques des

feuilles et des racines. La population de Hammamet est la plus active avec IC₅₀ de 0,587 mg/ml et la population de Riadh Andalous est la moins active avec IC₅₀ de 0,984 mg/ml.

Tableau 13. Activité anti-oxydante des huiles de huit populations de ricin.

Provenance	IC ₅₀ mg/ml
Hammamet	0,587±0,08
Nabeul	0,803±0,1
Riadh Andalous	0,984±0,08
Khanguet Hajej	0,74±0,12
Aouled Amer	0,788±0,02
Bouficha	0,634±0,1
Béja	0,73±0,05
Nefza	0,773±0,04

I-1-3 Analyses statistiques

Suite à l'étude de l'activité anti-oxydante des extraits des feuilles, des racines et des huiles fixes des différentes populations de ricin une analyse de la variance a été réalisée. Cette analyse effectuée sur les extraits des feuilles et des racines a montré que la différence entre les populations est hautement significative pour les paramètres étudiés : IC₅₀ ($P < 0,0001$) et EVC ($P < 0,0001$). Pour les huiles fixes, l'analyse de la variance a montré la présence d'une différence hautement significative ($P < 0,0001$) entre les populations.

I-2 Le jatropha

I-2-1 Etude des activités anti-oxydantes des extraits des feuilles et des racines de jatropha

L'étude des activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de jatropha par le test chimique DPPH a montré que ces extraits sont actives de point de vue pouvoir anti-radicalaire. En comparaison avec l'activité des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de ricin, les résultats ont montré que les extraits de jatropha sont moins

actifs (Tableau 14). Selon leur pouvoir, ces extraits peuvent être groupés en trois groupes. Un premier groupe dont les valeurs d'IC₅₀ < 20 µg/ml. Ce groupe contient l'extrait des feuilles de la population P8 qui est le plus actif parmi tous les extraits testés (IC₅₀ = 8,4 µg/ml).

Le deuxième groupe est formé par les extraits ayant des valeurs d'IC₅₀ qui sont autour de 20 µg/ml. Il regroupe la majorité des extraits qui ont des activités anti-oxydantes moyennement fortes. Les valeurs des extraits des feuilles des populations P2 (24 µg/ml) et de P5 (22,6 µg/ml) et les extraits des racines des populations de P2 (27,3 µg/ml) et de P4 (30,8 µg/ml) sont données ici à titre d'exemple.

Le dernier groupe est formé par le reste des extraits dont les valeurs d'IC₅₀ > 20 µg/ml et leurs pouvoirs anti-radicalaires sont plus faibles que les deux premiers groupes notamment pour les extraits des feuilles des populations de P3 (44,8 µg/ml) et de P6 (40,4 µg/ml) ainsi que les extraits des racines des populations de P7 (64,4 µg/ml) et de P8 (60,7 µg/ml).

En comparaison avec la littérature, notre étude montre que la valeur d'IC₅₀ de l'extrait méthanolique des feuilles de la population P8 est proche à celle trouvée dans le cas de l'extrait méthanolique des feuilles de jatropha issue de la Malaisie qui est de l'ordre de 6,8 µg/ml. En ce qui concerne les extraits méthanoliques des racines, notre étude montre que les extraits de six populations testées qui sont P1, P2, P3, P4, P5 et P6 sont plus actifs en termes d'activité anti-oxydante que l'extrait méthanolique des racines de jatropha issue de la Malaisie qui présente une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 57,9 µg/ml en utilisant le test DPPH (Oskoueian *et al.*, 2011).

Tableau 14. Activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de huit populations de jatropha.

Provenance	Matériel végétal	Test DPPH	
		IC50 μ g/ml	EVC μ g/g MS
Arusha Tanzanie (P1)	Feuilles	33,2 \pm 4,4	630,8 \pm 1,13
	Racines	50,1 \pm 2,1	290 \pm 1,4
Mozambique (P2)	Feuilles	24 \pm 2,3	762 \pm 1,4
	Racines	27,3 \pm 2,4	672,7 \pm 1,06
Paraná Brésil (P3)	Feuilles	44,8 \pm 3,7	353,4 \pm 1,27
	Racines	49 \pm 0,7	342,6 \pm 0,84
Norte de Minas Brésil (P4)	Feuilles	26,6 \pm 4,3	682 \pm 1,06
	Racines	30,8 \pm 1,2	648,45 \pm 0,77
Mato Grosso Brésil (P5)	Feuilles	22,6 \pm 3,8	990,4 \pm 1,97
	Racines	35,3 \pm 2,1	446,7 \pm 0,98
Região sudeste Brésil (P6)	Feuilles	40,4 \pm 2,8	390,5 \pm 1,13
	Racines	54 \pm 2,4	110 \pm 1,4
Vale do Jequitinhonha Brésil (P7)	Feuilles	34,3 \pm 1,5	591,5 \pm 3,5
	Racines	64,4 \pm 1,6	90,75 \pm 1,06
Suriname (P8)	Feuilles	8,4 \pm 0,5	1234,5 \pm 2,12
	Racines	60,7 \pm 0,2	92 \pm 0,7

I-2-2 Etude des activités anti-oxydantes des huiles de jatropha

En ce qui concerne les activités anti-oxydantes des huiles fixes des huit populations de jatropha, les résultats obtenus par le test DPPH sont regroupés dans le tableau 15. Ces résultats ont montré que ces huiles sont aussi actives mais leurs activités et moins importantes que celles des huiles de ricin. Les huiles étudiées présentent des valeurs d'IC50 qui varient entre 1,53 mg/ml pour la population P2 et 1,94 mg/ml pour la population P1.

Tableau 15. Activité anti-oxydante des huiles de huit populations de jatropha.

Provenance	IC50 mg/ml
Arusha Tanzanie (P1)	1,94 \pm 0,06
Mozambique (P2)	1,53 \pm 0,16
Paraná Brésil (P3)	1,58 \pm 0,34
Norte de Minas Brésil (P4)	1,72 \pm 0,01
Mato Grosso Brésil (P5)	1,69 \pm 0,01
Região sudeste Brésil (P6)	1,64 \pm 0,08
Vale do Jequitinhonha Brésil (P7)	1,54 \pm 0,19
Suriname (P8)	1,83 \pm 0,1

I-2-3 Analyses statistiques

L'analyse de la variance des activités anti-oxydantes des extraits des feuilles et des racines a montré que la différence entre les populations est hautement significative pour tous les paramètres étudiés : IC50 ($P < 0,0001$) et EVC ($P < 0,0001$). En ce qui concerne les huiles fixes l'analyse de la variance a montré que la différence entre les populations est significative ($P = 0,0333$).

II- Résultats du test ABTS

II-1 Etude des activités anti-oxydantes des extraits des feuilles et des racines de ricin

L'étude a montré que pour les extraits des feuilles les valeurs d'IC50 varient entre 0,15 et 0,52 mg/ml. Quant aux extraits des racines, les valeurs d'IC50 varient entre 0,16 et 0,7 mg/ml (Tableau 16).

Ces résultats ont permis de regrouper les extraits testés en trois groupes selon leur pouvoir anti-radicalaire. Un premier groupe avec un pouvoir antioxydant assez fort, caractérisé par des valeurs d'IC50 $< 0,3$ mg/ml. Il s'agit des extraits des feuilles et des racines de la population de Hammamet, l'extrait des feuilles de la population de Nabeul et l'extrait des racines de la population de Béja avec des IC50 respectives égales à 0,15 ; 0,16 ; 0,18 et 0,19 mg/ml.

Un deuxième groupe formé par les extraits dont les valeurs d'IC50 sont autour de 0,3 mg/ml. Ces extraits ont présenté un pouvoir anti-radicalaire moyennement fort. Parmi ces extraits, on peut citer les extraits des feuilles des populations de Riadh Andalous (0,3 mg/l), de Khanguet Hajej (0,32 mg/ml), les extraits des racines des populations d'Aouled Amer (0,37 mg/ml) et de Béja (0,35 mg/ml).

Le dernier groupe est caractérisé par les extraits dont les valeurs d'IC50 $> 0,3$ mg/ml. Ces extraits ont présenté un pouvoir anti-radicalaire moins fort que les deux premiers groupes. Il regroupe les extraits des feuilles des populations de Nefza (0,52 mg/ml), de Béja (0,42

mg/ml), les extraits des racines des populations de Khanguet Hajej (0,5 mg/ml), de Riadh Andalous (0,4 mg/ml) et de Nabeul (0,7 mg/ml).

Tableau 16. Activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de huit populations de ricin.

Provenance	Matériel végétal	Test ABTS	
		IC50 mg/ml	EVC μ g/g MS
Hammamet	Feuilles	0,15 \pm 0,01	350,45 \pm 1,48
	Racines	0,16 \pm 0,04	349,75 \pm 2,4
Nabeul	Feuilles	0,18 \pm 0,02	330,6 \pm 3,6
	Racines	0,7 \pm 0,08	181,75 \pm 1,06
Riadh Andalous	Feuilles	0,3 \pm 0,04	287,25 \pm 3,18
	Racines	0,4 \pm 0,02	237,5 \pm 2,12
Khanguet Hajej	Feuilles	0,32 \pm 0,02	286,25 \pm 1,06
	Racines	0,5 \pm 0,04	201,5 \pm 0,7
Aouled Amer	Feuilles	0,33 \pm 0,04	276,2 \pm 3,25
	Racines	0,37 \pm 0,01	247,05 \pm 1,62
Bouficha	Feuilles	0,34 \pm 0,02	273 \pm 4,24
	Racines	0,35 \pm 0,03	252,9 \pm 1,2
Béja	Feuilles	0,41 \pm 0,01	236,4 \pm 3,3
	Racines	0,19 \pm 0,02	328,3 \pm 0,9
Nefza	Feuilles	0,52 \pm 0,06	195,5 \pm 1,4
	Racines	0,42 \pm 0,01	234,75 \pm 2,1

II-2 Etude des activités anti-oxydantes des différents extraits de jatropha

L'étude des activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de jatropha par le test chimique ABTS a montré que ces extraits sont actifs de point de vue pouvoir anti-radicalaire. En comparaison avec les activités des extraits des feuilles et des racines de ricin, les résultats confirment que les extraits de jatropha sont moins actifs (Tableau 17). Les résultats montrent que les extraits des feuilles sont plus actifs que les extraits des racines de toutes les populations de jatropha étudiées. Ainsi, tous les extraits des feuilles présentent des valeurs d'IC50 < 1 mg/ml. Quant aux extraits des racines sont caractérisés par des valeurs d'IC50 > 1 mg/ml. Il est à noter que l'extrait des feuilles de la population P8 et

l'extrait des racines de la population P2 sont les plus actifs avec des valeurs d'IC50 respectivement de l'ordre de 0,55 et de 1,67 mg/ml.

Tableau 17. Activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de huit populations de jatropha.

Provenance	Matériel végétal	Test ABTS	
		IC50 mg/ml	EVC μ g/g MS
Arusha Tanzanie (P1)	Feuilles	0,81 \pm 0,05	123 \pm 2,8
	Racines	2,4 \pm 0,003	45,25 \pm 1,06
Mozambique (P2)	Feuilles	0,73 \pm 0,02	184 \pm 1,4
	Racines	1,67 \pm 0,01	62,75 \pm 1,06
Paraná Brésil (P3)	Feuilles	0,965 \pm 0,02	91 \pm 2,8
	Racines	2,2 \pm 0,2	48,75 \pm 0,35
Norte de Minas Brésil (P4)	Feuilles	0,77 \pm 0,01	150,5 \pm 0,7
	Racines	1,8 \pm 0,1	55 \pm 1,4
Mato Grosso Brésil (P5)	Feuilles	0,7 \pm 0,01	189 \pm 1,4
	Racines	1,89 \pm 0,03	52,5 \pm 0,7
Regiao sudeste Brésil (P6)	Feuilles	0,96 \pm 0,08	91,5 \pm 3,5
	Racines	2,9 \pm 0,07	44,1 \pm 0,14
Vale do Jequitinhonha Brésil (P7)	Feuilles	0,93 \pm 0,01	101 \pm 1,4
	Racines	3,45 \pm 0,2	39,75 \pm 1,06
Suriname (P8)	Feuilles	0,55 \pm 0,03	193,5 \pm 2,12
	Racines	3,3 \pm 0,2	40,75 \pm 0,35

II-3 Analyses statistiques

L'analyse de la variance réalisée suite à l'étude des activités anti-oxydantes des extraits des feuilles et des racines des huit populations des deux espèces étudié a montré que la différence entre les populations de ricin et de jatropha est hautement significative pour les paramètres étudiés : IC50 ($P < 0,0001$) et EVC ($P < 0,0001$).

III- Etude des relations entre teneurs en composés phénoliques et activités anti-oxydantes (AAO)

Dans cette partie de l'étude, on a essayé de mettre en évidence la relation entre les activités anti-oxydantes (AAO) et les teneurs en composés phénoliques (CP) des extraits étudiés. Le coefficient de corrélation de Bravais-Pearson utilisé pour mesurer l'intensité de la

liaison entre deux caractères quantitatifs. Ce coefficient varie entre -1 et +1. La relation linéaire sera donc d'autant plus forte que la valeur du coefficient est proche de +1 ou de -1, et d'autant plus faible qu'elle est proche de 0.

III-1 Corrélations entre teneurs en CP et les AAO des extraits de ricin

III-1-1 Feuilles

Dans le cas des extraits méthanoliques des feuilles de huit populations de ricin, les résultats obtenus mettent en évidence une corrélation positive entre les AAO et les teneurs en PPT et qui est confirmée par les deux tests DPPH et ABTS. Les coefficients de corrélation sont de 0,911 et de 0,917 respectivement pour les tests DPPH et ABTS. Une corrélation inférieure à celle des AAO et les teneurs en PPT a été observée entre les AAO et les teneurs en FVT. Cette corrélation est confirmée par des indices de corrélations de 0,67 et de 0,646 respectivement pour les tests DPPH et ABTS. En revanche, aucune corrélation n'est présente entre les AAO et les teneurs en TC (Figures 75 et 76).

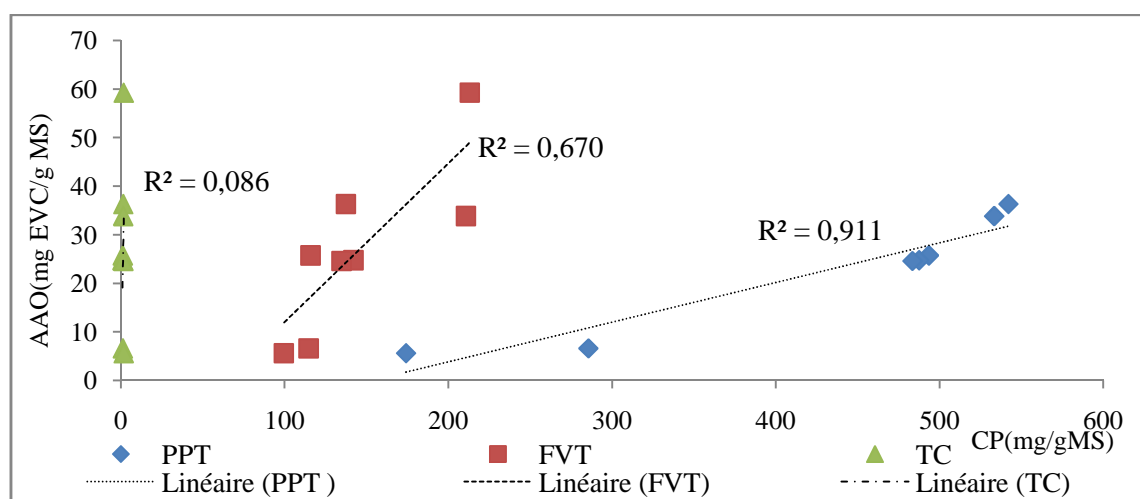


Figure 75. Relation entre AAO (DPPH) et teneurs en composés phénoliques des extraits de feuilles des populations de ricin.

PPT : polyphénols totaux (mg EAG/g MS), FVT: flavonoïdes totaux (mg EC/g MS), TC: tannins condensés (mg EC/g MS) et CP: composés phénoliques.

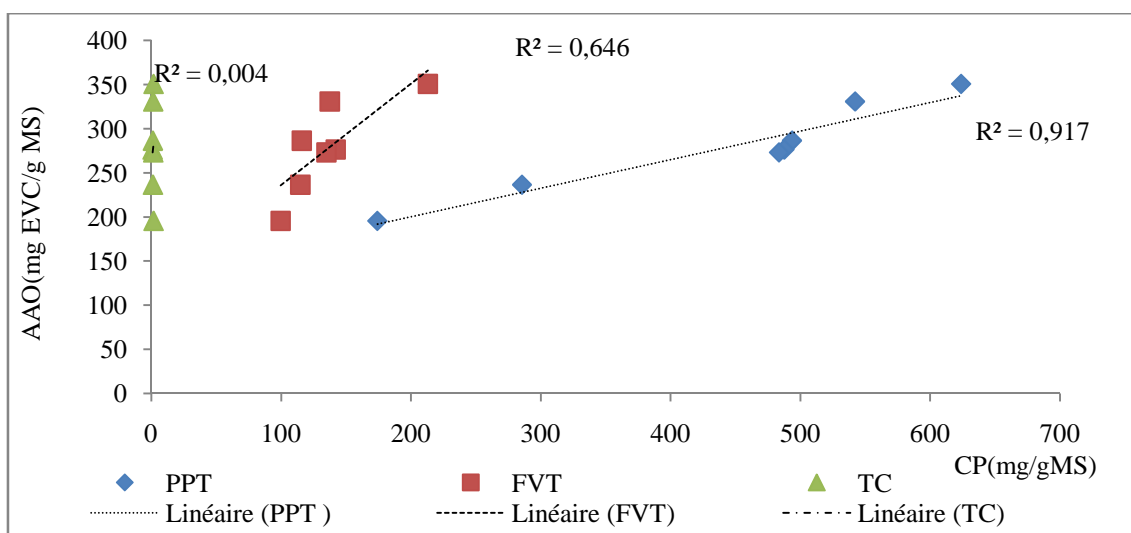


Figure 76. Relation entre AAO (ABTS) et teneurs en composés phénoliques des extraits de feuilles de huit populations de ricin.

PPT: polyphénols totaux (mg EAG /g MS), FVT: flavonoïdes totaux (mg EC/g MS), TC: tannins condensés (mg EC/g MS), CP: composés phénoliques et R^2 : Coefficient de détermination.

III-1-2 Racines

Au niveau des extraits méthanoliques des racines de ricin, les résultats obtenus par les deux tests DPPH et ABTS montrent qu'il y a une relation directe entre les AAO et les teneurs en PPT et en FVT. Le test DPPH montre des corrélations positives aussi bien entre les AAO et les teneurs en PPT (0,947) et les AAO et les teneurs en FVT (0,915). Ces corrélations sont confirmées par le deuxième test (ABTS) qui montre des coefficients de corrélation de 0,924 et de 0,951 respectivement pour les PPT et les FVT. Par contre, les résultats montrent une relation plus faible entre les AAO et les teneurs en TC avec des corrélations de 0,49 et de 0,608 respectivement pour les tests DPPH et ABTS (Figures 77 et 78).

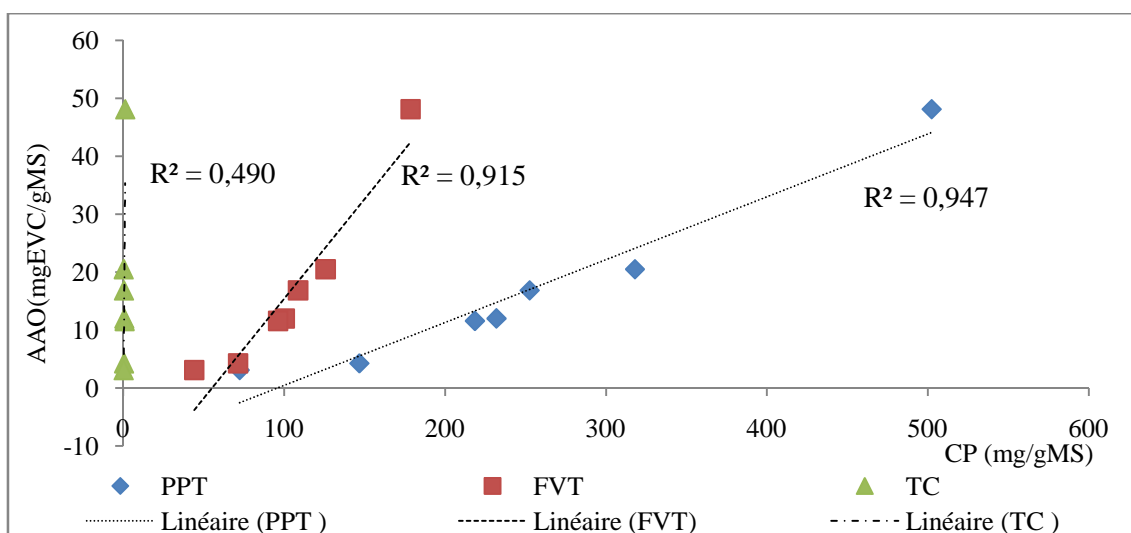


Figure 77. Relation entre AAO (DPPH) et teneurs en composés phénoliques des extraits de racines des populations de ricin.

PPT: polyphénols totaux (mg EAG /g MS), FVT: flavonoïdes totaux (mg EC/g MS), TC: Tannins condensés (mg EC/g MS), CP: Composés phénoliques et R^2 : Coefficient de détermination.

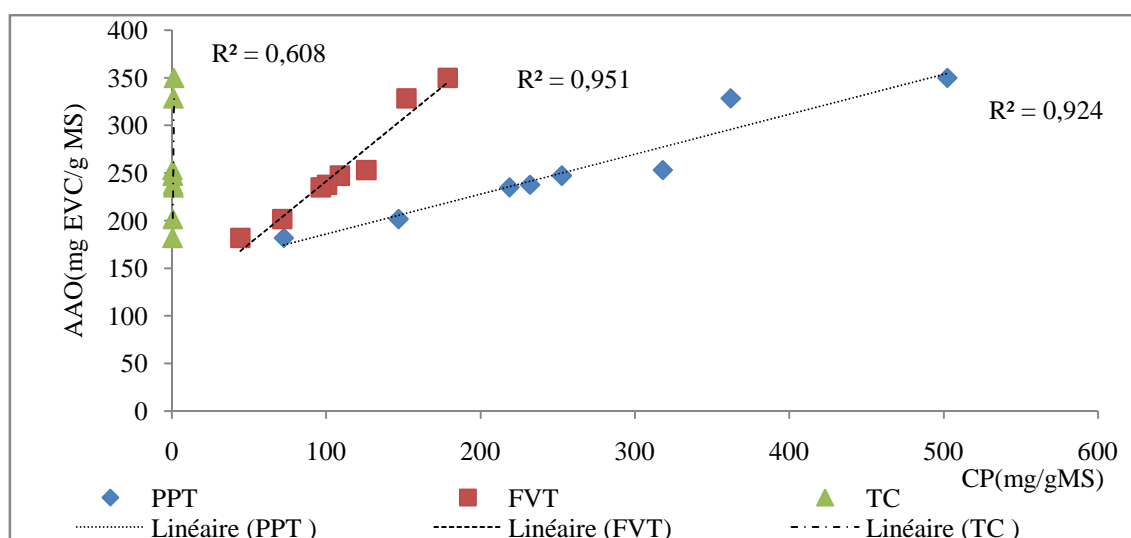


Figure 78. Relation entre AAO (ABTS) et teneurs en composés phénoliques des extraits de racines de huit populations de ricin.

PPT: polyphénols totaux (mg EAG /g MS), FVT : flavonoïdes totaux (mg EC/g MS), TC : tannins condensés (mg EC/g MS), CP : composés phénoliques et R^2 : Coefficient de détermination.

III-2 Corrélation entre teneurs en CP et AAO des extraits de jatropha

III-2-1 Feuilles

Les résultats obtenus par les deux tests DPPH et ABTS montrent qu'il existe de bonnes corrélations entre les activités anti-oxydantes AAO et les teneurs des différents composés phénoliques des extraits des feuilles de jatropha. Le test DPPH montre des corrélations positives entre les AAO et les teneurs en PPT (0,978), en FVT (0,902) et en TC (0,883). Ces résultats sont aussi confirmés par le test ABTS qui montre des corrélations avec les AAO de 0,888 (PPT), de 0,835 (FVT) et de 0,77 (TC) (Figures 79 et 80).

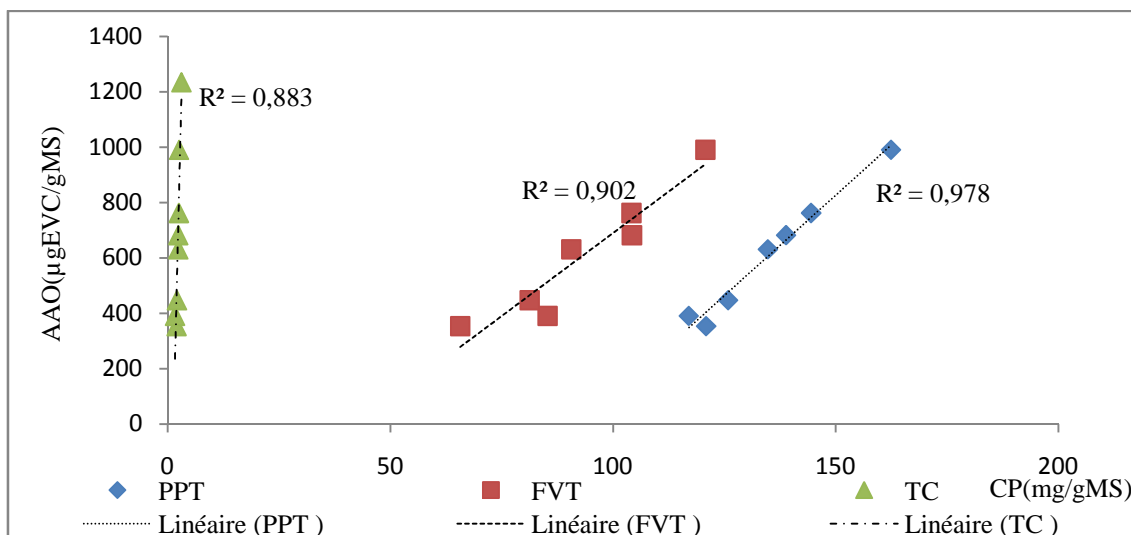


Figure 79. Relation entre AAO (DPPH) et teneurs en composés phénoliques des extraits des feuilles de huit populations de jatropha.

PPT: polyphénols totaux (mg EAG /g MS), FVT: flavonoïdes totaux (mg EC/g MS), TC: tannins condensés (mg EC/g MS), CP: composés phénoliques et R^2 : Coefficient de détermination.

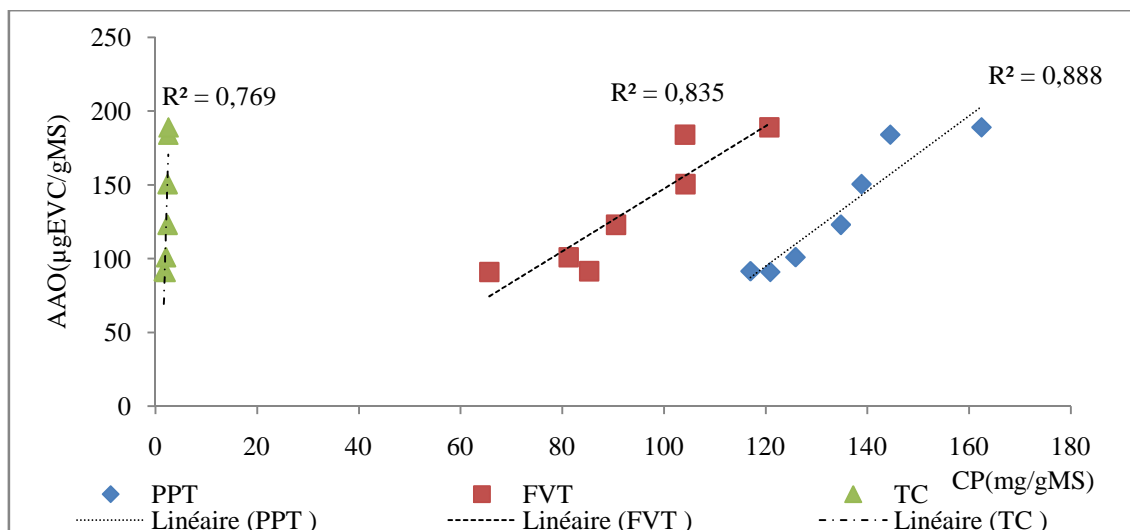


Figure 80. Relation entre AAO (ABTS) et teneurs en composés phénoliques des extraits des feuilles de huit populations de jatropha.

PPT: polyphénols totaux (mg EAG /g MS), FVT: flavonoïdes totaux (mg EC/g MS), TC: tannins condensés (mg EC/g MS), CP: composés phénoliques et R^2 : Coefficient de détermination.

III-2 Racines

Dans le cas des extraits des racines de huit populations de jatropha, les résultats obtenus mettent en évidence des corrélations positives (0,905 et 0,968) entre les AAO et les teneurs en PPT pour les deux tests DPPH et ABTS. Les corrélations sont plus faibles (0,697 et 0,708) entre les AAO et les teneurs en FVT. Les analyses montrent l'absence des corrélations entre les AAO et les teneurs en TC (Figures 81 et 82)

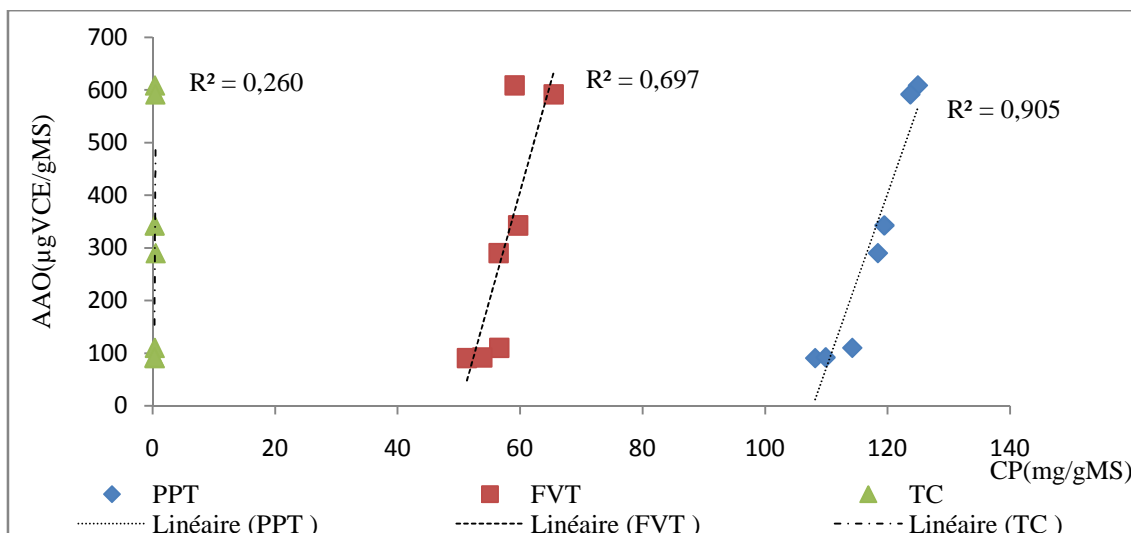


Figure 81. Relation entre AAO (DPPH) et teneurs en composés phénoliques des extraits des racines de huit populations de jatropha.

PPT: polyphénols totaux (mg EAG /g MS), FVT: flavonoïdes totaux (mg EC/g MS), TC: tannins condensés (mg EC/g MS), CP: composés phénoliques et R^2 : Coefficient de détermination.

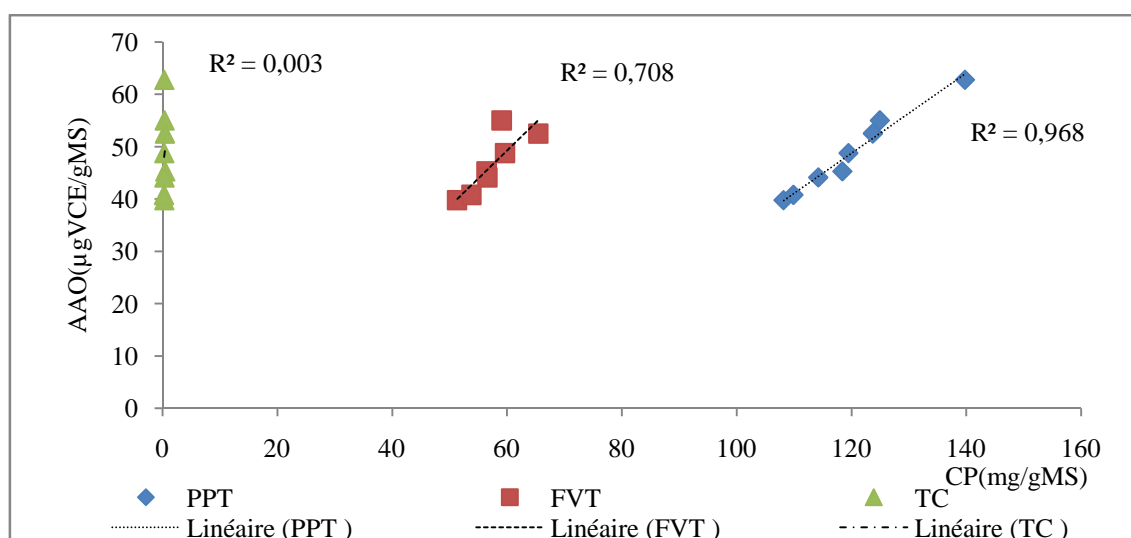


Figure 82. Relation entre AAO (ABTS) et teneurs en composés phénoliques des extraits des racines de huit populations de jatropha.

PPT: polyphénols totaux (mg EGa/g MS), FVT: flavonoïdes totaux (mg EC/g MS), TC: tannins condensés (mg EC/g MS), CP: composés phénolique et R^2 : Coefficient de détermination.

IV- Conclusion

L'étude des activités anti-oxydantes des deux espèces étudiées a montré que pour le ricin, les AAO des extraits méthanoliques des feuilles présentent une bonne corrélation avec les teneurs en PPT, à un degré moins avec les teneurs en FVT mais avec une plus faible corrélation avec les teneurs en TC. En revanche, les AAO des extraits méthanoliques des racines sont bien corrélés avec les teneurs en PPT et en FVT. Cependant, nos résultats montrent qu'il n'y a pas de corrélation avec les teneurs en TC.

En ce qui concerne le jatropha, il est apparu que les AAO des extraits méthanoliques des feuilles sont bien corrélés avec les teneurs en PPT, en FVT et en TC. Quant aux AAO des extraits méthanoliques des racines sont bien corrélés avec les teneurs en PPT et à un degré moindre avec les teneurs en FVT. Cependant, notre étude montre qu'il n'y a pas de corrélation avec les teneurs en TC.

Chapitre V: Etude des activités anti-acétylcholinestérase

I- La maladie d'Alzheimer

Au début du 20^{ème} siècle, la maladie l'Alzheimer (MA) a été découverte par le neuropsychiatre Allemand Aloïs Alzheimer (1864-1915). Il a étudié le cas d'une femme d'une cinquantaine d'années qui présentait des troubles de la mémoire et du comportement, des problèmes d'orientation, des hallucinations et des signes de paranoïa (trouble mentale manifesté par des difficultés relationnelles et surtout un délire de la persécution).

En générale, un patient atteint de MA présente des difficultés à se souvenir des noms, des faits récents, à trouver ses mots et à mettre en place ses idées. De plus, il rencontre des problèmes de motricité et d'orientation dans l'espace et dans le temps. A des stades avancés, le sujet finit par avoir des difficultés à accomplir les simples tâches de la vie quotidienne. Il présente aussi des troubles psycho-comportementaux tels que l'agressivité, l'anxiété, la dépression, les hallucinations ou paranoïa (Lanari *et al.*, 2006).

A ce jours, la MA reste incurable. Cependant, l'une des approches les plus prometteuses pour le traitement de cette maladie consiste à améliorer le niveau d'acétylcholine dans le cerveau en utilisant des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Ingkaninan *et al.*, 2003). En effet, la plupart des médicaments anti-Alzheimer qui sont disponibles sur le marché agissent sur cette activité cholinergique en inhibant la dégradation de l'acétylcholine tels que la donepezil, la rivastigmine et la galantamine (Etienne, 2008).

II- L'activité anti-acétylcholinestérase (anti-AChE)

L'acétylcholinestérase (AChE) est un neurotransmetteur synaptique qui, en se fixant au récepteur cholinergique membranaire, permet la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx au niveau des jonctions neuromusculaires. L'AChE joue un rôle primordial dans la régulation de l'influx nerveux. Elle assure la libération de la fente

synaptique en vue d'une nouvelle transmission par dégradation de l'acétylcholine résiduelle issue d'une neurotransmission (Figure 83). Chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, le taux d'acétylcholine est particulièrement faible, ce qui explique les troubles cognitifs observés. La solution pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Houghton *et al.*, 2006).

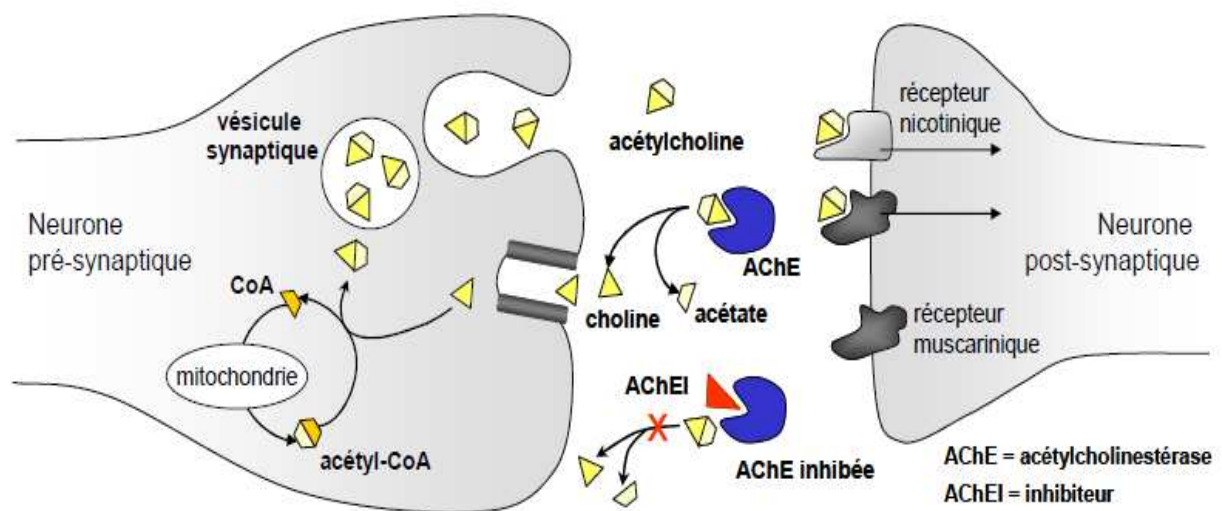


Figure 83. Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique (Urbain 2007).

En se basant sur l'hypothèse d'inhiber l'action de l'AChE pour mieux traiter la MA, il est apparu sur le marché plusieurs inhibiteurs de cette enzyme (Grossberg, 2003). Le premier inhibiteur de l'AChE à avoir été testé est la physostigmine, issu de *Physostigma venenosum*. Cette plante est connue par une forte toxicité qui est due majoritairement à la physostigmine. Cette dernière présente une affinité pour l'AChE d'environ 10 000 fois supérieure à celle de l'acétylcholine, ce qui en fait un parasymphomimétique très puissant qui peut induire une bradycardie, des vomissements et même une paralysie respiratoire (Bruneton, 1999). Les essais cliniques ont montré une action positive légère de la physostigmine sur la mémoire

(Shu, 1998), mais elle a été par la suite abandonnée à cause de sa courte demi-vie et de sa toxicité au profit d'analogues synthétiques (Iijima *et al.*, 1993; Al-Jafari *et al.*, 1998).

La tacrine a été le premier inhibiteur commercialisé dans le cadre du traitement de la MA, en 1993, mais a été abandonnée ensuite à cause de ses nombreux effets secondaires tels que les nausées, les vomissements, la diarrhée, les maux de tête, les étourdissements ainsi que l'augmentation des niveaux de l'alanine aminotransférase (ALT) indiquant une toxicité hépatique (Knapp *et al.*, 1994). De plus, la tacrine est connue par sa demi-vie courte qui nécessite plusieurs prises par jour, ce qui est problématique pour des personnes souffrant de pertes de mémoire (Augry *et al.*, 1997).

La donepezil, approuvée en 1997 (Nordberg et Svensson, 1998), montrent une grande spécificité pour le tissu cérébral mieux que la tacrine (Small, 1998). Les essais cliniques ont montré qu'elle ne présente pas une toxicité hépatique et qu'elle montre surtout une demi-vie plus longue, ce qui facilite la prise du traitement (Rogers et Friedhoff, 1997). Par contre, certains effets secondaires ont été enregistrés tels que les nausées, les vomissements, les étourdissements, l'anorexie et la fatigue (Rogers *et al.*, 1998).

La rivastigmine, approuvée en 1998, est un dérivé de la physostigmine utilisée dans le traitement symptomatique des formes légères à modérément sévères de la MA (Agid *et al.*, 1998). Elle est connue par une bonne sélectivité pour le cholinestérase cérébral ainsi que son métabolisme indépendant du système enzymatique hépatique permettent une action ciblée (Polinsky, 1998). Quelques effets secondaires ont été enregistrés tels que les nausées et les vomissements (Corey-Bloom *et al.*, 1998) (Figure 84).

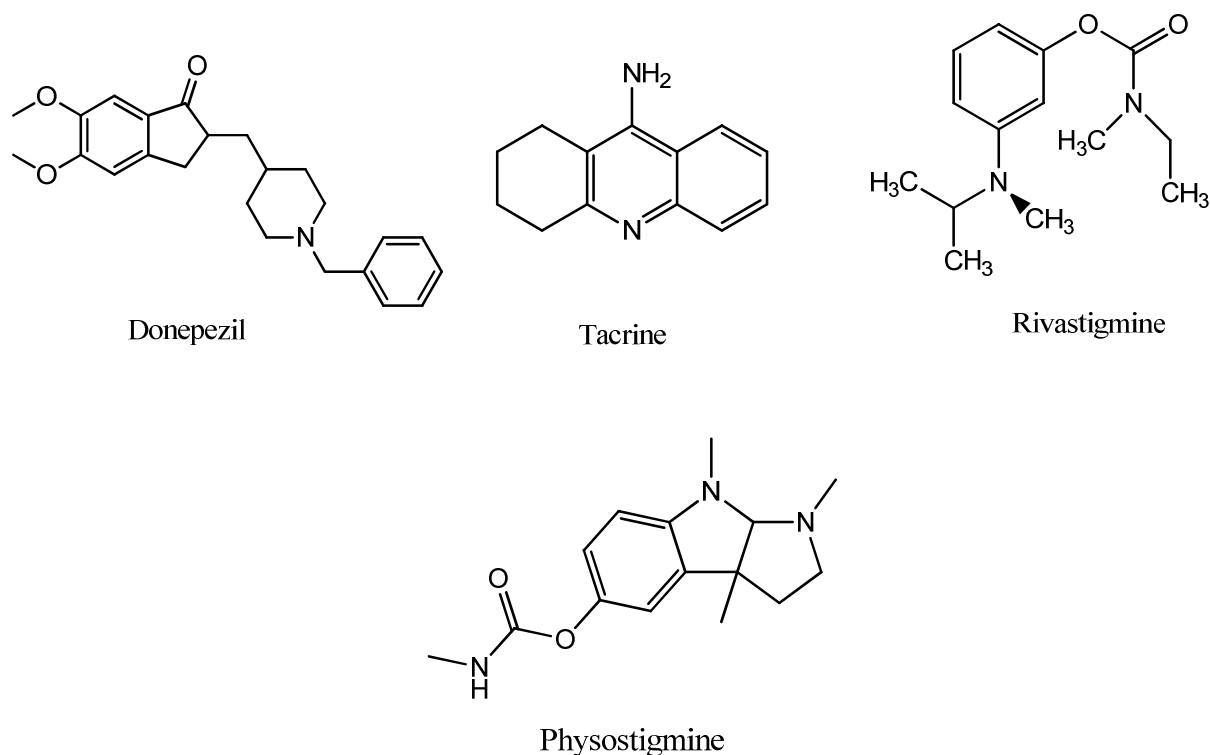


Figure 84. Schéma de quelques inhibiteurs connus d'AChE.

En 2000, il est apparu sur le marché un alcaloïde naturel qui est la galantamine issue de l'espèce *Galanthus nivalis* L. de la famille des Amaryllidaceae (Figure 85). La galantamine diffère des autres inhibiteurs par son mécanisme à double action : en plus d'inhiber l'AChE, elle provoque une modulation allostérique des récepteurs présynaptiques nicotiques, ce qui augmente la libération de neuromédiateurs (Maelicke *et al.*, 2001). D'autres caractères favorisent l'utilisation de la galantamine comme meilleur inhibiteur de l'AChE tels que sa demi-vie longue et son action sélectif, réversible et compétitif (Woodruff-Pak *et al.*, 2001).

La galantamine est largement utilisée comme une substance de référence dans les tests *in vitro* du fait de son fort pouvoir inhibiteur de l'AChE (Lopez *et al.*, 2002). Aujourd'hui, elle est autorisée dans plusieurs pays Européens comme un des traitements de la MA à des stades avancés (Sramek *et al.*, 2000).

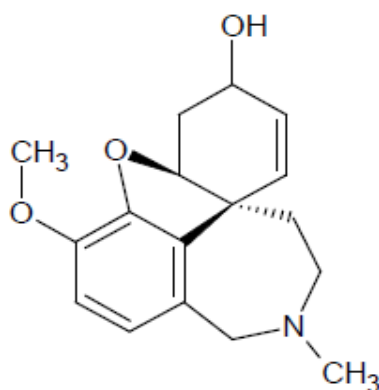


Figure 85. Structure de la galantamine.

Bien que la plupart des inhibiteurs connus de l'enzyme AChE soient des alcaloïdes, récemment, plusieurs études ont été faites pour identifier d'autres molécules naturelles pouvant avoir une activité anti-AChE importante. Ainsi, selon Houghton *et al.* (2006) plusieurs composés, autres que les alcaloïdes, présentent une grande capacité d'inhiber l'enzyme AChE tels que les terpenoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes et les isocoumarines. Dans le même objectif, Ge *et al.* (2008) ont montré que l'hopeahainol, un nouveau phénol isolé de l'espèce *Hopea hainensis*, est un inhibiteur réversible de l'AChE. L'isoorientine et l'isovitexine sont les flavones identifiés comme composés responsables de l'activité anti-AChE causée par les extraits des fleurs et des rhizomes de l'*Iris pseudopumila* (Iridaceae) (Conforti, 2009). Une autre étude réalisée par Juang *et al.* (2011) a montré que les flavanols tels que la sophoflavescenol, l'icaritine, le demethylanhydro-icaritine, le 8-C-lavandurylkaempferol et le kaempferol, isolés à partir de *Sophora flavescens* (Fabaceae), présentent une activité anti-AChE importante. Nag et De (2011) ont montré aussi que des composés phénoliques simples tels que l'acide gallique et l'acide ellagique sont de bons inhibiteurs de l'AChE

Mack *et al.* (2010) se sont intéressés à quantifier les composés phénoliques puis les flavonoïdes présents dans quelques espèces de la famille des Anacardiaceae et de tester leurs activités biologiques. Les résultats de leur étude ont montré que les extraits des plantes qui

sont riches en composés phénoliques et en flavonoïdes présentent en premier lieu une activité anti-oxydante importante puis un grand pouvoir inhibiteur de l'AChE.

Sur le même axe, Ryu *et al.* (2012) ont isolé, à partir des extraits éthanoliques des racines de *Broussonetia papyrifera*, trois flavonols à savoir le 8-(1,1-diméthylallyl)-5'-(3-méthylbut-2-enyl)-3',4',5,7-tetrahydroxy- flavonol, le papyriflavonol et le brousoflavonol. Ces derniers ont montré un pouvoir inhibiteur de l'AChE important.

Aderogba *et al.* (2013) ont isolé, à partir des extraits des feuilles de *Croton penduliflorus*, quelques composés phénoliques tels que la quercétin-3-O-rhamnoside, le kaempferol-3-O-rhamnoside, le protocatechualdéhyde et l'acide p-hydroxybenzoïque. L'étude de leur activité anti-AChE a montré que ces composés phénoliques sont des inhibiteurs puissants de l'AChE.

L'étude réalisée par Xian *et al.* (2014) a montré que les extraits de plusieurs fougères originaires du Chine, riches en flavonoïdes, présentent une activité anti-AChE importante.

En se basant sur les exemples récents de la littérature, dont certains sont cités précédemment, plusieurs recherches sont menées pour tester des extraits naturels riches en composés phénoliques et en flavonoïdes et d'identifier d'autres molécules plus compétitives dans l'inhibition de l'enzyme AChE que celles commercialisées sur le marché. Ainsi, la première partie de notre étude a confirmé la richesse des extraits des feuilles et des racines des deux espèces étudiées en composés phénoliques et en flavonoïdes. Cela nous a encouragé de revaloriser les deux espèces étudiées en testant, en plus de l'activité anti-oxydante, l'activité anti-AChE. Par la suite, nous avons comparé les pouvoirs inhibiteurs de l'AChE des différents extraits testés à celui de la galatamine déjà connue comme meilleur inhibiteur de l'enzyme.

III- Résultats des activités anti-AChE des deux espèces

III-1 Activités anti-AChE des extraits de ricin

L'étude de l'activité anti-AChE des différents extraits de huit populations de ricin a montré que tous les extraits méthanoliques des feuilles, les extraits méthanoliques des racines ainsi que les huiles fixes sont des inhibiteurs puissants de l'enzyme AChE. Tous les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 18.

Les résultats montrent que les huiles de nos huit populations de ricin sont les inhibiteurs les plus puissants contre l'AChE en comparaison avec les autres extraits testés. Cette bonne activité est confirmée par des valeurs très faibles d'IC₅₀ et qui sont inférieures à celle de la galantamine hydrobromide (0,55 µg/ml) utilisée comme contrôle positif. Les IC₅₀ des huiles varient entre 0,012 µg/ml (population d'Aouled Amer) et 0,02 µg/ml (population de Riadh Andalous).

Selon leur pouvoir inhibiteur de l'AChE, le reste des extraits méthanoliques des feuilles et des racines peuvent être regroupés en deux groupes. Un premier groupe caractérisé par les extraits ayant un pouvoir inhibiteur d'AChE assez important dont les IC₅₀ < 1 µg/ml. Il regroupe les extraits méthanoliques des feuilles des populations de Hammamet, de Khanguet Hajej et de Nabeul avec des valeurs d'IC₅₀ respectives de 0,74 µg/ml ; 0,75 µg/ml et de 0,87 µg/ml. Ce premier groupe contient aussi les extraits méthanoliques des racines des populations de Béja et d'Aouled Amer avec des valeurs d'IC₅₀ respectives de 0,72 µg/ml et de 0,98 µg/ml.

Un deuxième groupe caractérisé par des extraits qui inhibent moins l'AChE et dont les valeurs d'IC₅₀ > 1 µg/ml. Il regroupe le reste des extraits méthanoliques des feuilles et des racines tels que l'extrait des feuilles de la population d'Aouled Amer (1,1 µg/ml) et les extraits des racines de la population de Hammamet (1,5 µg/ml).

En comparaison avec la littérature, nos résultats sont en accord avec d'autres études qui ont confirmé que des nombreux Euphorbiacées sont des bons inhibiteurs de l'activité de l'AChE

tels que *Acalypha diversifolia*, *Acalypha macrostachya*, *Alchornea grandiflora* *Pera glabrata* et *Jatropha gossypifolia* (Jaime *et al.*, 2006 ; Elaine *et al.*, 2009 ; Bhunesh and Ajay, 2013)

Tableau 18. Activités anti-AChE des différents extraits testés de huit populations de ricin.

Population	Extrait	IC ₅₀ (µg/ml)
Hammamet	Feuilles	0,74±0,01
	Racines	1,5±0,03
	Huile	0,015±0,0007
Khanguet Hajej	Feuilles	0,75±0,007
	Racines	1,1±0
	Huile	0,013±0,0001
Nabeul	Feuilles	0,87±0,01
	Racines	1,2±0,01
	Huile	0,019±0,0007
Béja	Feuilles	1,02±0,03
	Racines	0,72±0,02
	Huile	0,013±0,0002
Aouled Amer	Feuilles	1,1±0,03
	Racines	0,98±0,02
	Huile	0,012±0,0007
Riadh Andalous	Feuilles	1,1±0
	Racines	1,05±0,07
	Huile	0,02±0,0008
Nefza	Feuilles	1,2±0
	Racines	1,1±0,07
	Huile	0,014±0,0002
Bouficha	Feuilles	1,4±0,02
	Racines	1,5±0,01
	Huile	0,015±0,0004
Galantamine		0,55±0,02

III-2 Activités anti-AChE des extraits de jatropha

L'étude de l'activité anti-AChE des extraits méthanoliques des feuilles et des racines de huit populations de jatropha confirme que ces derniers sont des inhibiteurs importants de l'AChE. Les résultats regroupés dans le tableau 19 montrent que la majorité des extraits des feuilles et des racines de jatropha sont plus actifs que les extraits des feuilles et des racines de ricin. Cela est confirmé par des valeurs plus faibles d'IC₅₀.

Les extraits testés peuvent être regroupés selon leur pouvoir inhibiteur d'AChE en trois groupes. Un premier groupe caractérisé par des extraits qui ont un pouvoir inhibiteur d'AChE très puissant. Ces extraits sont plus actifs que la galantamine utilisée comme contrôle positif et présentent des valeurs d'IC₅₀ < 0,55 µg/ml. Ce groupe contient les extraits méthanolique des feuilles de la population de Vale do Jequitinhonha Brésil (P7) et de la population de Mato Grosso Brésil (P5) avec des valeurs d'IC₅₀ respectives 0,47 µg/ml et 0,54 µg/ml.

Un deuxième groupe caractérisé par des extraits qui ont un pouvoir inhibiteur d'AChE puissant mais moins actifs que la galantamine (0,55 µg/ml < IC₅₀ < 1 µg/ml). Ce groupe est formé par la majorité des extraits testés tels que les extraits des feuilles de la population de Suriname (P8), de la population de Mozambique (P2), de la population de Arusha Tanzanie (P1) et les extraits des racines de la population de Norte de Minas Brésil (P4) et de la population de Paraná Brésil (P3) avec des valeurs d'IC₅₀ respectives de 0,57 µg/ml; 0,6 µg/ml ; 0,77 µg/ml, 0,75 µg/ml et 0,88 µg/ml.

Un dernier groupe formé par les extraits les moins actifs avec des valeurs d'IC₅₀ > 1 µg/ml. Il regroupe seulement deux extraits : l'extrait méthanolique des feuilles de la population Paraná Brésil (P3) et l'extrait méthanolique des racines de la population de Regiao sudeste Brésil (P6) avec des valeurs d'IC₅₀ respectives de 1,6 µg/ml et 1,2 µg/ml.

Il est à noter qu'on n'a pas pu étudier les activités anti-AChE des huiles de jatropha en raison d'un problème de miscibilité de l'huile dans le tampon utilisé pour préparer la solution enzymatique.

En comparaison avec la littérature, nos résultats sont en accord avec les recherches qui ont confirmé que des nombreux Euphorbiacées sont des bons inhibiteurs de l'activité de l'AChE tels que *Acalypha diversifolia*, *Acalypha macrostachya*, *Alchornea grandiflora* et *Pera glabrata* (Elaine *et al.*, 2009 ; Bhunesh and Ajay, 2013). Notre étude a montré aussi que les extraits de toutes les populations de *Jatropha curcas* sont plus actifs en termes d'activité anti-

AChE que les extraits de *Jatropha gossypifolia* qui présentent des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 0.05 mg/ml (Feitosa *et al.*, 2011)

Tableau 19. Activités anti-AChE des différents extraits testés de huit populations de jatropha.

Population	Extrait	IC ₅₀ (µg/ml)
Arusha Tanzanie (P1)	Feuilles	0,77±0,01
	Racines	0,7±0,007
Mozambique (P2)	Feuilles	0,6±0,007
	Racines	0,65±0,02
Paraná Brésil (P3)	Feuilles	1,64±0,05
	Racines	0,88±0,007
Norte de Minas Brésil (P4)	Feuilles	0,75±0
	Racines	0,75±0,01
Mato Grosso Brésil (P5)	Feuilles	0,54±0,01
	Racines	0,8±0,01
Região sudeste Brésil (P6)	Feuilles	0,93±0,02
	Racines	1,2±0,02
Vale do Jequitinhonha Brésil (P7)	Feuilles	0,47±0,02
	Racines	0,6±0,007
Suriname (P8)	Feuilles	0,57±0,007
	Racines	0,9±0,007
Galantamine		0,55±0,02

IV- Analyses statistiques

L'analyse de la variance des activités anti-acétylcholinestérase des deux espèces étudiées a montré que la différence entre les populations est hautement significative pour chaque type d'extrait testé ($P < 0,0001$).

V- Conclusion

L'étude des activités anti-AChE des extraits méthanoliques des feuilles et des racines des deux espèces étudiées a montré que ces extraits sont des inhibiteurs puissants de l'AChE. Cela est confirmé par des IC₅₀ très faible.

L'étude a confirmé que la majorité des extraits des feuilles et des racines de jatropha sont plus actifs que les extraits des feuilles et des racines de ricin. De plus, les résultats obtenus confirment que les extraits de jatropha sont plus actifs que la galantamine utilisée comme contrôle positif tels que les extraits méthanoliques des feuilles de la population de Mato Grosso Brésil (P5) et de la population de Vale do Jequitinhonha Brésil (P7).

Les résultats obtenus montrent, conformément aux résultats récemment publiés par Ouchemoukh *et al.* (2014), l'absence de corrélations entre les activités anti-AChE des extraits testés et leurs teneurs en différents composés phénoliques dosés (PPT, FVT et TC).

Cette étude montre pour la première fois que les huiles fixes de différentes populations de ricin sont des inhibiteurs puissants de l'enzyme AChE, elles sont même plus actives que la galantamine qui sert de référence.

Conclusion générale

Notre travail de recherche est centré sur la valorisation de deux espèces d'Euphorbiacées : *Ricinus communis* L. et *Jatropha curcas* L. connus essentiellement par leurs richesses en huiles fixes. L'huile de ricin est connue pour son utilisation dans la fabrication des produits cosmétiques et à degré moindre dans la production de biodiesel, quant à l'huile de jatropha est de plus en plus utilisée pour la production du biodiesel.

L'objet de notre travail a porté sur les dosages de composés phénoliques présents dans les différentes parties de la plante chez huit populations de ricin et de jatropha afin de trouver d'autres applications qui permettent de valoriser ces deux espèces. Pour cela, nous avons réalisé une étude phytochimique qui a concerné essentiellement les composés phénoliques puis nous avons testé les propriétés anti-oxydantes et l'activité enzymatique de tous les extraits.

Les dosages des composés phénoliques ont montré que les extraits des feuilles des populations de ricin étudiées sont plus riches en PPT, FVT et TC que les extraits des racines à l'exception de deux populations (Béja et Nefza) dont les racines sont plus riches en PPT et en FVT. En ce qui concerne le jatropha, les résultats ont montré que les extraits des feuilles de toutes les populations sont plus riches en composés phénoliques que les extraits des racines. L'étude phytochimique des extraits testés a montré que les extraits des feuilles et des racines de ricin présentent plus de composés phénoliques identifiés et quantifiés que les extraits de jatropha. La même étude a montré la présence de certains composés phénoliques communs entre les deux espèces et d'autres qui sont spécifiques pour chaque espèce. Ainsi, les extraits des feuilles et des racines de ricin sont caractérisés essentiellement par des quantités importantes d'acide gentsique et qui est totalement absent dans les extraits de jatropha. Les extraits de ricin sont caractérisés aussi par d'autres composés phénoliques et qui sont présents avec des quantités moins importantes tels que l'acide gallique, l'acide protocatéchique, la

catéchine, l'acide vanillique et l'acide caféique. Quant aux extraits des feuilles et des racines de jatropha, ils diffèrent des extraits de ricin par la présence de l'acide cinnamique. D'autres composés phénoliques sont identifiés dans les extraits des deux espèces. Il s'agit de l'épicatéchine, l'acide p-coumarique, l'acide chlorogénique, la rutine, la vitexine et la naringine.

L'étude des huiles fixes de ricin et de jatropha a montré que l'huile de ricin est formée essentiellement de l'acide ricinoléique et qui donne lieu à une macrolactone (13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one). Cet acide gras ainsi que sa macrolactone correspondante sont totalement absents dans l'huile de jatropha. Quant à l'huile de jatropha, elle est formée par deux acides gras en proportions majeures qui sont l'acide oléique et l'acide linoléique. Par contre ces derniers acides sont présents à l'état de traces dans l'huile fixe de ricin.

L'étude des activités anti-oxydantes des deux espèces a montré que pour le ricin, les AAO des extraits des feuilles présentent une bonne corrélation avec les teneurs en PPT, à un degré moins avec les teneurs en FVT mais avec une plus faible corrélation avec les teneurs en TC. En revanche, les AAO des extraits des racines sont bien corrélés avec les teneurs en PPT et en FVT. Cependant, nos résultats montrent l'absence de corrélation avec les teneurs en TC. En ce qui concerne le jatropha, il est apparu que les AAO des extraits des feuilles sont bien corrélés avec les teneurs en PPT, FVT et TC. Quant aux AAO des extraits des racines sont bien corrélés avec les teneurs en PPT et à un degré moindre avec les teneurs en FVT. Cependant, notre étude montre qu'il n'y a pas de corrélation avec les teneurs en TC.

L'étude des activités anti-AChE des extraits des feuilles et des racines des deux espèces étudiées a montré que ces extraits sont des inhibiteurs puissants de l'AChE. Cela est confirmé par des IC₅₀ très faibles. L'étude a confirmé que la majorité des extraits des feuilles et des racines de jatropha sont plus actifs que les extraits des feuilles et des racines de ricin.

De plus, les résultats obtenus confirment que les extraits de jatropha sont plus actifs que la galantamine utilisée comme contrôle positif, notamment, les extraits des feuilles de la population de Mato Grosso Brésil (P5) et de la population de Vale do Jequitinhonha Brésil (P7). Les résultats obtenus montrent l'absence de corrélations entre les activités anti-AChE des extraits testés et leurs teneurs en différents composés phénoliques dosés.

Cette étude a montré pour la première fois que les huiles fixes des différentes populations de ricin sont des inhibiteurs puissants de l'enzyme AChE.

Notre étude montre que les différents extraits de ricin et de jatropha, autres que les huiles fixes, peuvent donc être exploités pour d'autres activités biologiques, parmi lesquelles l'action inhibitrice de l'AChE et le piégeage des radicaux libres, en raison de leur richesse en composés phénoliques. Pour la suite, il serait intéressant d'isoler et de caractériser les composés phénoliques des extraits étudiés et d'évaluer les activités biologiques *in vitro* et *in vivo* de chacun de ces composés pris séparément.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abd-Alla, H.I., Moharram, F.A., Gaara, A.H., El-Safty, M.M., 2009. Phytoconstituents of *Jatropha curcas* L. Leaves and their Immunomodulatory Activity on Humoral and Cell-Mediated Immune Response in Chicks. *Z. Naturforsch. C.*, 64, pp 495-501.
- Abitogun, A., Alademeyin, O., Oleye, D., 2009: Extraction and characterization of castor seed oil. *Internet J. Nutr. Wellness.*, 8 (2).
- Aderogba, M.A., Ndhlala, A.R., Van Staden, J., 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activity and mutagenic effects of *Croton penduliflorus* leaf extract constituents. *S. Afr. J. Bot.*, 87, pp 48-51.
- Agid, Y., Dubois, B., Anand, R., Gharabawi, G., 1998. Efficacy and tolerability of rivastigmine in patients with dementia of the Alzheimer type. *Curr. Ther. Res.*, 59, pp 837-845.
- Akapan, U.G., Jimoh, A., Mohammed, A.D., 1999. Extraction, characterization and modification of castor seed oil. *Leonardo J. Sci.*, 4, pp 1-8
- Akbar, E., Yaakob, Z., Kartom, S., Kamarudin, S.K., Ismail, M., Salimon, J., 2009. Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock. *Eur. J. Sci. Res.* 29, pp 396-403.
- Al-Jafari, A.A., Kamal, M.A., Greig, N.H., Perry, E.R., 1998. Kinetics of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibition by a novel derivative of physostigmine: phenserine. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 248, pp 180-185.
- Al-Qura'n, S., 2009. Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. *J. Ethnopharmacol.*, 123, pp 45-50.
- Anderson, C.M., Halleberg, A., Hogberg, T., 1996. Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Adv. drug Res.*, 28, pp 65-180.
- Aponte, C.H., 1978. Estudio de *Jatropha curcas* L. como recurso biotico. Diploma thesis. University Veracruz, Xalapa-Enríquez, Veracruz, Mexico.
- Armstrong, W.P., 1982. Not Beavers Stars or Sons of Jupiter. *Environ. Southwest.*, 496, pp 4-7.
- Asase, A., Oteng-Yeboah, A.A., Odamtten, G.T., Simmonds, M.S.J., 2005. Ethnobotanical study of some Ghanaian anti-malarial plants. *J. Ethnopharmacol.*, 99, pp 273-279.

Augry, F., Darchy, A., Rotrou, J., Guelfi, M.C., Forette, F., 1997. Réponse à la tacrine: bilan de deux ans de prescription. *J. Pharm. Clin.*, 16, pp 183-188.

Axelsson, M., Sjoval, J., Gustafsson, B.E., Setchell, K.D., 1982. Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature*, 298, pp 659-660.

B

Bennett, G.J., Lee H.H., 1989. Xanthenes from Guttiferae. *Phytochemistry*, 28 (4), pp 967-998.

Berg, P.A., Daniel, P.T., 1988. Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Progress in Clinical and Biological Research, Cody V, Middleton E, Harborne JB (Eds) 280, Liss AR Inc., New York, pp 157-171.

Bhunesh, P., Ajay, S., 2013. Piscicidal and Anti AChE Activity of Medicinal Plant *Jatropha gossypifolia* (Family-Euphorbiaceae). *World J. Fish & Marine Sci.* 5, 367-372.

Blois, M.S., 1958: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, pp 1199-1200.

Block, G., Patterson, B., Subar, A., 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer.*, 18, pp 1-29.

Bouchonnet, S., Libong D., 2004. Le couplage chromatographique en phase gazeuse-spectrométrie de masse. *Actual. Chim.*, 275, pp 7-14.

Brand, W.W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, pp 25-30.

Brugger, R., Vassella, A., 2003. Les plantes au cours des saisons, Guide pour observations phénologiques. *Geogr. Bern.*, pp 220-222.

Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie -Phytochimie, Plantes Médicinales, 3ème édition, (Ed.) Tec et Doc Lavoisier, p 1120.

Bruhlmann, C., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.A., Testa, B., 2004. *Chem. Biodivers.*, 1, pp 819-829.

Burkill, H.M., 1994. The Useful Plants of West Tropical Africa. *Royal Botanic Gardens*, 2, pp 90-94.

Buchanan, B., Grisse, W., Jones, R., 2000. American Society of Plant Physiologists, chapitre 24, pp 1250-1318.

C

Cano-Asseleih, L.M., 1986. Chemical investigation of *Jatropha curcas* L. seeds. Ph.D. Thesis. University of London U.K.

Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., *et al.*, 1983. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem. Pharmacol.*, 3 (13), pp 1995-8

Chen, Z., Zhang, J., Chen, G., 2008. Simultaneous determination of flavones and phenolic acids in the leaves of *Ricinus communis* Linn. by capillary electrophoresis with amperometric detection. *J. Chromatogr. B*, 863, pp 101–106.

Chen, G., Chen, H., 2011. Extraction and deglycosylation of flavonoids from sumac fruits using steam explosion. *Food Chem.*, 126, pp 1934-1938.

Chung, K.T., Wei, C.I., Johnson, M.G., 1998. Are tannins a double-edged sword in biology and health? *Trends Food Sci. Techn.*, 9, pp 168-175.

Clark, B.J., Frost, T., Russell, M.A. 1993. UV spectroscopy techniques, instrumentation, data handling. *Techniques in visible and ultraviolet spectrometry*, 4, Chapman and Hall, London, UK, pp 1-143.

Corey-Bloom, J., Anand, R., Veach, J., 1998. A randomised trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psych.*, 1, pp 55-56.

Cornwell, T., Cohick, W., Raskin, I., 2004. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 65, pp 995-1016.

Conforti, F., Rigano, D., Menichini, F., Loizzo, M.R., Senatore, F., 2009. Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents. *Fitoterapia*, 80, pp 62-67.

Corona, G., 2011. Seaweed polyphenols: bioavailability and Healthy benefits. *Bioactive from Seaweed, and Innovative Ingredients in Salt Reduction*, p 5.

Cox, P.A., Balick, M.J., 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery. *Sci. Am.*, 270 (6), pp 82-87.

D

Dalziel, J.M., 1955. *The Useful Plants of West-Tropical Africa*. Crown Agents for Oversea Governments and Administration, London, p 147.

Da Silva, N.L., Batistella, C.B., Maciel Filho, R., Wolf Maciel, M.R., 2009. Biodieselproduction from castor oil: optimization of alkaline ethanolysis. *Energy Fuel* 23, pp 5636–5642.

Dehgan, B., Webster, G.L., 1979. Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Univ. Calif. Publ. Bot.*, 74, pp 1-73.

Dehgan, B., 1984. Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Syst. Bot.*, 9, pp 467-478.

Dehgan, B., Schutzman B., 1994. Contributions toward a monograph of neotropical *Jatropha*: phenetic and phylogenetic analyses. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 81, pp 349-367.

Déthiollaz, S., 2003. La ricine, une arme biologique. *Proline Numéro* 8, pp 1-4.

De ville, M., 2009. Développement local en Afrique, avantages et désavantages de l'huile de jatropha. *Les enjeux des agrocarburants*, 92, pp 23-25.

Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2011. *Jatropha* diterpenes a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, pp 301-322.

Dewick, P. M., 1993. Isoflavonoids. *The Flavonoids Advances in research since 1986.* (Ed.) Harborne, J.B., Chapman & Hall. London, pp 117-238.

Doat, J., 1978. Les tannins dans les bois tropicaux. *Revue bois et forêts des tropiques*, 182, pp 37-54.

Drayne, T., 1999. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.*, 27, pp 445-59.

Duke, J.A., Atchley, A.A., 1983. Proximate analysis. In: Christie, B.R. (Ed.), *the handbook of plant science in agriculture.* CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Duke, J.A., 1983. *Handbook of Energy Crops.* Unpublished. Disponible sur http://www.hort.purdue.edu/newcrop/Indices/index_ab.html/ Site accédé le 13 Mai, 2014.

Duke, J.A., 1993. Medicinal plants and the pharmaceutical industry. In *New Crops.* (Eds.) Janick, J. and Simon, J.E., John Wiley and Sons, Inc., New York, NY. pp.664-669.

E

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, pp 88-95.

Etienne, J., 2008. Observer l'acétylcholine en action pour mieux traiter Alzheimer, Futura-Sciences. <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/medecine-observer-acetylcholine-action-mieux-traiter-alzheimer-16357/> Site accédé le 15/07/2014

Elaine, M.C.L., Daisy M.B.D.P., Fausto, E.B., Amanda, D.S., Cecília, T.T.B., Luce, M.B.T., Maria, C.M.Y., 2009. Chemical composition, acetylcholinesterase inhibitory and antifungal activities of *Pera glabrata* (Schott) Baill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasil. Bot.* 32, pp 819-825.

F

Farnsworth, N.R., 1988. Screening plants for new medicines. Washington, D.C. Biodiversity Wislson, E. O. (Ed.) National Academy Press. 9, pp 83-97.

FAO, 2007, Food and Agriculture Organization of the United Nations - for a world without hunger, p 67.

Fatnassi, B., Khouja, M.L., El Ferchichi, O.H., 2014. Larvicidal efficacy of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) leaf and seed aqueous extracts against *culex pipiens* L. *Afr. J. Biotechnol.* 13, pp 2641-2647.

Ferrazzano, G.F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli A., Pinto, G., Pollio, A., 2011. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, 16, pp 1486-507.

Ferreira, A., Proenc, a, C., Serralheiro, M.L.M., Araújo, M.E.M., 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J. Ethnopharmacol.*, 108, pp 31-37.

Feitosa, C.M., Freitas, RM., Luz, N.N.N., Bezerra, M.Z.B., Trevisan, M.T.S., 2011. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Braz. J. Biol.* 71, pp 783-789.

Forero, C.L.B., 2004. Biodiesel from castor oil: a promising fuel for cold weather. University Avenida Gran Colombia, Sciences Francisco de Paula Santander, 12, p 96.

Fuchs, J., 1998. Potentials and limitations of the natural anti-oxidants RRR- α -tocophérol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. *Free Rad. Biol. Med.*, 25, pp 848-873.

G

Galez, P., 2011. Mesures Physiques Ancecy : Techniques spectroscopiques d'analyse / Spectrophotométrie UV/visible, pp 1-17.

Garg, P., Pankaj, K.P., Gandhi, D., 2011. Plant tissue culture of *Jatropha curcas* L.: a review. *Imperial J. Pharmacognosy & Natural Products* 1. pp 6-13.

Ge, H.M., Zhu, C.H., Shi, D.H., Zhang, L.D., Xie, D.Q., Yang, J., Ng, S.W., Tan, R.X., 2008. Hopeahainol A: An acetylcholinesterase inhibitor from *Hopea hainanensis*. *Chemistry*, 14, pp 376-381.

Ghnimi, W., Dicko, A., Khouja, M.L., El Ferchichi, O.H., 2014. Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. *Ind. Crop. Prod.* 56, 43-51.

Ghosh, S., Tiwari, S.S., Srivastava, S., Sharma, A.K., Kumar, S., Ray, D.D., Rawat, A.K., 2013. Acaricidal properties of *Ricinus communis* leaf extracts against organophosphate and pyrethroids resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 192, pp 259-267.

Ghrabi, Z., 2005. A Guide to Medicinal Plants in North Africa, *Ricinus communis* L. Center of mediterranean cooperation, Malaga, Spain. Pl, pp 227-228.

Grossberg, G.T., 2003. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr. Ther. Res.*, 64, pp 216-235.

Grainge, M., Ahmed, S., 1988. Handbook of Plants with Pest-control Properties. John Wiley & Sons, New York.

Gubitz, G.M., Mittelbach, M., Trabi, M., 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technol.* 67, pp 73-82.

Guedira, F., 2009. Support de cours de Spectroscopie Ultraviolette, Master de sciences analytiques à l'université Mohammed V-Agdal, Maroc, pp 1-34.

Gupta, R.C., 1985. Pharmacognostic studies on 'Dravanti' Part I *Jatropha curcas* Linn. *P. Indian Acad. Sci.*, 94, pp 65-82.

H

Haas, W., Strerk, H., Mittelbach, M., 2002. Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolates from the seed oil of *Jatropha curcas*. *J. Nat. Prod.*, 65, pp 1434-1440.

Hall, S.M., Medlow, G.C., 1975. Identification of IAA in phloem and roots pressure saps of *Ricinus communis* by mass spectrometry. *Plant physiol.*, 56, p 177.

- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, 52 (8), pp253-265.
- Harrys, P.L., 1980. Pachytene chromosome morphology with reference to sex invisibility in *Ricinus communis* L. pp 320-322.
- Haslam, E., 1994. Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.*, 11, pp 41-66.
- Hay, A.E., 2003. Métabolites secondaires isolés de deux plantes néo-calédonienne, *Calophyllum caledonicum* vieill. et *Garcinia vieillardii* P : Etude chimique et valorisation biologique. Thèse de l'université d'Angers.
- Heinrich, M., Teoh, H.L., 2004. Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol.*, 92, pp 147-162.
- Hecker, E., 1987. Three stage carcinogenesis in mouse skin – Recent results and present status of advanced model system of chemical carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 15 (2), pp 245-258.
- Heller, W., Forkmann, G., 1993. Biosynthesis of Flavonoids. In *The Flavonoids: Advances in research since 1986*.
- Heller, J., 1996. *Physic Nut. Jatropha curcas* L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Henning, R., 1994. Fachlicher Zwischenbericht zum Projekt: Produktion und Nutzung von Pflanzenöl als Kraftstoff. PN 93.2202.5-01.100. Projet Pourghère DNHE - GTZ, Bamako, Mali.
- Henning, R., Von Mitzlaff, K., 1995. Produktion und Nutzung von Purgieröl als Kraftstoff und Rohstoff für die lokale Seifenherstellung im Sahel. pp. 137-151. In *Nachwachsende Rohstoffe aus den Tropen und Subtropen für die Tropen und Subtropen*, 22. Witzenhäuser Hochschulwoche (Krause, R. and Schellert, C., Eds.) *Der Tropenlandwirt*, Beiheft, 53.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors of plant and fungi. *Nat. Prod. Rep.*, 23, pp 181-199.
- Huang, H.C., Lin, J.K., 2012. Pu-erh tea, green tea, and black tea suppresses hyperlipidemia, hyperleptinemia and fatty acid synthase through activating AMPK in rats fed a high-fructose diet. *Food Funct.*, 3, pp170-7.

Iijima, S., Greig, N.H., Garofalo, P., Spangler, E.L., Heller, B., Brossi, A., Ingram, D.K. 1993. Phenserine: a physostigmine derivative that is long-acting inhibitor of cholinesterase and demonstrates a wide dose range for attenuating a scopolamine-induced learning impairment of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology*, 112, pp 415-420.

Ilavarasan, R., Moni, M., Subramanian, V., 2005. Anti-inflammatory and free radical scavenging activity of *Ricinus communis* L. root extract. *J. Ethnopharmacol.*, 103, pp 478-480.

Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W., 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J. Ethnopharmacol.*, 89, pp 261-264.

Iwashina, T., 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.*, 113, pp 287-299.

J

Jakupovic, J., Paredes, L., Bohlmann, F., Watson L., 1988. Prenyl flavanes from *Marshallia* species. *Phytochemistry*, 27 (10), p 3273.

Jayaweera, D.M.A., 1980. Medicinal plants (Indigenous and exotic) used in Ceylon. Colombo: The National Science Council of Sri Lanka. pp 236-237.

Jaime, N., Jimmy, A.H., Yaned, M.C., Oscar, M.M., 2006. In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 101, pp 783-785.

Jena, J., Gupta, A.K., 2012. *Ricinus Communis linn*: a phytopharmacological review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, pp 25-29.

Juillet, A., Susplugas, J., Courp, J., 1955. Les oléagineux et leurs tourteaux. Botanique- caractères - préparation - emplois. (Ed.) Lechevalier, P., Paris.

Jung, W., Yu, O., Lau, S.M.C., O'Keefe, D.P., Odeli, J., Fader, G., Gonigle, B., 2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature biotechnol.*, 18, pp 208-212.

Jung, H.A., Jin, S.E., Park, J.S., Choi, J.S., 2011. Antidiabetic complications and anti- alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structureactivity relationship. *Phytother. Res.*, 25, pp 709-715.

Jussieu, A. L., 1789. *Genera plantarum*, pp 450-452.

K

- Kachare, S.V., Surywanshi, S.R., 2010. Ethnomedicines on jaundice from district Nanded. *Int. J. Current Res.*, 10, pp 25-27.
- Kalita, J.C., Chakrabarty, A., Tanti, B., 2011. Assessment of antifertility activity of some traditionally used plants by different ethnic communities in three districts of Assam. *Indian J. of Herbal Medicine and Toxicology*, 5, pp 65-72.
- Kang, S.S., Cordell, A., Soejarto, D.D., Fong, H.H.S., 1985. Alkaloids and flavonoids from *Ricinus communis*. *J. Nat. Prod.*, 48, pp 155-156.
- Karl, M.J., Dan, A., 1965. Sex inheritance in *Ricinus communis* L.: Evidence for a genetic change during the ontogeny of female sex reversals, 36, pp 253-259.
- Khan, M.R., Ndaalio, G., Nkunya, M.H.H., Wevers, H., 1978. Studies on the rationale of African traditional medicine. Part II-preliminary screening of medicinal plants for anti-gonococci activity. *Pakistan J. Sci. Res.*, 27, pp 189-192.
- Khafagy, S.M., Mahmoud, Z.F., Salam, N.E.A., 1979. Coumarins and flavonoids of *Ricinus communis* growing in Egypt. *Planta Med.*, 37, p 191.
- Khogali, A., Barakat, S., Abou-Zeid, H., 1992. Isolation and identification of the phenolics from *Ricinus communis* L. *Delta J. Sci.*, 16, pp 198-211.
- Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y., 2002. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.*, 81, pp 321-326.
- Kirtikar, K.R., Basu, B.D., 1980. Indian medicinal plants, 3, M/S Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun, India.
- Kirtikar, K.R., Basu, B.A., 1991. Indian medicinal plants, 3, Periodical Experts Book Agency, New Delhi, pp 2274-2277.
- Knapp, M.J., Knopman, D.S., Solomon, P.R., 1994. The tacrine study group. A 30-week randomized controlled trial of high dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 271, pp 985-991.
- Kobilke, H., 1989. Untersuchungen zur Bestandesbegründung von Purgiernuß (*Jatropha curcas* L.). Diploma thesis. University Hohenheim, Stuttgart.

Kota, C.S., Manthri, S., 2011. Antibacterial activity of *Ricinus communis* leaf extract. *Int J Pharm Sci & Res.*, 2, pp 1259-1261.

Kumar, A., Sharma, S., 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. *Ind. Crop. Prod.*, 28, 1-10.

L

Lanari, A., Amenta F., Silvestrelli, G., Tomassoni, D., Parnetti, L. 2006. Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.*, 127, pp 158-165.

Lavallaz, P., Délétroz, R., 1994. Chromatographie, pp 1-14. <http://www.etudiants.ch/upload/documents/superuser/chromatographie.pdf/> Site accédé le 10/06/2014

Lechowicz, M.J., 2001. Phenology. In *Encyclopedia of Global Environmental Change*, 2, pp 56-62.

Ling-yi, K., Zhi-da, M., Jian-xia, S., Rui, F., 1996. Chemical constituents from roots of *Jatropha curcas*. *Acta Bot. Sin.*, 38 (2), pp 161-166.

List, P.H., Horhammerl, L., 1979. *Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Springer, Berlin.

Liu, S., Lu, H., Zhao, Q., He, Y., Niu, J., Debnath, A.K., 2005. Thea flavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp 41. *Biochim. Biophys. Acta. (BBA)-Gen Subj.*, 1723, pp 270-81.

Lopez S., Bastida J., Viladomat F., Codina C. 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.*, 71, pp 2521-2529.

Lobstein, A., 2010. Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.

Ludovic, J., 2006. De la substance à la structure : Exemples en chimie organique, pp 16-17.

Lutz, A., 1992. Vegetable oil as fuel. An environmentally and socially compatible concept for Mali. *gate* 4/92, pp 38-46

M

Mack, M., Ashwell, R.N., Jeffrey, F.F., Johannes, V.S., 2010. Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chem.*, 123, pp 69-76

- Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E. X., Zerlin, M., 2001. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiat.*, 49, pp 279-288.
- Magliulo, E., Carosi, P.G., Minoli, L., 1973. Studies on the regenerative capacity of the liver in rats subjected to partial hepatectomy and treated with silymarin. *Arzneim. Forsch.*, 23 (Suppl), pp 161-7.
- Manach, C., Regeat, F., Texier, O., Agullo, G., Demigne, C., Remesy, C., 1996. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr. Res.*, 16, pp 517-544.
- Martin, M.J., Marhuenda, E., Perez-Guerrero, C., 1994. Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats. *Pharmacology* 49 (3), pp 144-50.
- Marfak, A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat en biophysique, p 187.
- Martínez-Herrera, J., Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila-Ortíz, G., Becker, K., 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chem.* 96, pp 80-89.
- Manpong, P., Douglas, S., Douglas, P.L., Pongamphai, S., Teppaitoon, W., 2009. Response surface methodology applied to the extraction of phenolic compounds from *Jatropha curcas* L. leaves using supercritical CO₂ with a methanol co-solvent. *J. Food Process Eng.* 10, pp 1-21.
- Mena, F., Mena, A., Tréton, J., 2014. Polyphenols against skin aging in polyphenols in human health and disease. 1, pp 819-830.
- Moreira, I., 1970. Bagaços de purgueira e de ricino. Ensaio sobre a sua fitotoxicidade e valor fertilizante. *An. Inst. Super. Agron.*, 31, pp191-222.
- Morton, J.F., 1981. Atlas of medicinal plants of middle America. Bahamas to Yucatan. C.C. Thomas, Springfield, IL.
- Morrow, C.B., 2009. Wicked Plants: The Weed That Killed Abraham Lincoln's Mother and Other Botanical Atrocities. Algonquin Books of Chapel Hill, p 276.
- Muanda, N.F., Koné, D., Dicko, A., Soulimani, R., Younos, C., 2009. Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts. *ECAM* 2011, pp1-8.
- Münch, E., 1986. Die Purgiernuß (*Jatropha curcas* L.) Botanik, Ökologie, Anbau. Diploma Thesis. University Hohenheim, Stuttgart.

N

Nag, G., De, B., 2011. Acetylcholinesterase inhibitory activity of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Embllica officinalis* and some phenolic compounds. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3, pp 121-124.

Namuli, A., Abdullah, N., Sieo, C.C., Zuhainis, S.W., Oskoueian, E., 2011. Phytochemical compounds and antibacterial activity of *Jatropha curcas* Linn. Extracts. *J. Med. Plant. Res.*, 5, pp 3982-3990.

Nath, L.K., Dutta, S.K., 1992. Wound healing response of the proteolytic enzyme curcain. *Indian J. Pharmacol.*, 24 (2), pp 114-115.

Nath, S., Manabendra, D.C., Shubhadeep, R.C., Das, A.T., Sirotkin, A.V., Zuzana, B., Kádasi, A., Nora, M., Adriana, K., 2011. Restorative aspect of castor plant on mammalian physiology. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.*, 1, pp 236-246.

Neff, C., 2008. Les Biocarburants - Analyse du potentiel de production de biocarburants à l'échelle internationale et en Tunisie, Orientations pour la production de biocarburants en Tunisie, pp 4-5.

Ngom, N.M., 2000. Essai clinique randomisé d'*Acacia niloticaversus* fluconazole dans le traitement de la candidose bucco œsophagienne chez les personnes vivantes avec le VIH/SIDA à Dakar. Thèse en pharmacologie, N 19.

N'Guessan, A.H.O., Dago, D.C.E., Akhanovna, J., Békro, M., Békro, Y.A., 2011. Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Génie industriel*, 6, pp 55-61.

Nithiyantham, S., Siddhuraju, P., Francis, G., 2013. A promising approach to enhance the total phenolic content and antioxidant activity of raw and processed *Jatropha curcas* L. kernel meal extracts. *Ind. Crop. Prod.*, 43, pp 261-269.

Nordberg, A., Svensson, A.L., 1998. Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease: a comparison of tolerability and pharmacology. *Drug Safety*, 19, pp 465-480.

O

Odonne, G., Berger, F., Stien, D., Grenand, P., Bourdy, G., 2011. Treatment of leishmaniasis in the Oyapock basin (French Guiana): A K.A.P. survey and analysis of the evolution of phytotherapy knowledge amongst Wayãpi. *J. Ethnopharmacol.*, 137, pp 1228-1239.

Olsnes, S., Kozlov, J.V., 2001. Ricin. *Toxicon* 39, pp 1723-1728.

OMS : Organisation mondiale de la Santé, 2012. Médecine traditionnelle : des textes anciens aux nouveaux médicaments, 90 (8), pp 557-632. <http://www.who.int/bulletin/volumes/90/8/12-020812/fr/> Site accédé le 06/08/2014.

Ong, K.C., Khoo, H.E., 1997. Biological effects of myricetin. *Gen. Pharmacol.*, 29 (2), pp 121-6.

Ouchemoukh, A.N., Madani, K., Falé, P. L.V, Serralheiro, M.L., Araújo, M.E.M., 2014. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Ind. Crop. Prod.*, 53, pp 6-15.

Oskoueian, E., Abdullah, N., Saad, W.Z., Omar, A.R., Ahmad, S., Kuan, W.B., Zolkifli, N.A., Hendra, R., Ho, Y.W., 2011. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. *J. Med. Plant. Res.* 5, pp 49-57.

P

Panaiva, L., 2006. Les techniques chromatographiques orientées sur les matériaux composites. Conférence Eurocopter, pp 2-24.

Pax, F., 1910. Euphorbiaceae Jatropeae. In: Engler A, editor *Das Pflanzenreich*. IV, vol 147. Verlag Von Wilhelm Engleman, Leipzig, pp 1-148.

Perry, L.M., 1980. Medicinal plants of east and southeast Asia. MIT Press, Cambridge.

Perret, J.P., 2007. L'huile de Ricin Est Elle Le Meilleur Lubrifiant Pour Nos Moteurs ? [(CH₃(CH₂)₅CH(OH) CH₂CH=CH(CH₂)₇COO) ₃(OC) ₃H₅], *Journal de l'environnement*, 56, pp 2-5.

Peter, H.R., Franklin, E.R., Eichhorn, S.E., Bouharmont, J., 1999. *Biologie végétale*, pp 305-308.

Polvèche, V., 1996. La culture du ricin en Europe, Ingénieries – EAT – Numéro 6, pp 49-58.

Polinsky, R.J., 1998. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clin. Ther.*, 20, pp 634-647.

Poonam, S., Parchi, A., Krishna, M.Y., Tandon, V., 2008. Antidiabetic activity of 50% ethanolic extract of *Ricinus communis* L. and purified fractions, *Food Chem. Toxicol.*, 46, pp 3458-3466.

PORIM Test Methods 1995. Palm Oil Research Institute of Malaysia Test Methods, Ministry of Primary Industries, Malaysia, pp. 83-121.

Prat, R., Michèle, M., Vonarx, V., 2005. Les Fruits : Le Ricin : une capsule déhiscente. *Biologie et multimédia*, pp 15-17.

R

Rao, M.R, Palada, M.C., Becker, B.N., 2004. Medicinal and aromatic plants in agroforestry systems. *Agroforest. Syst.*, 61, pp 107-122.

Ravindranath, N., Ravinder, Reddy, M., Ramesh, C., Ramu, R., Prabhakar, A., Jagadeesh, B., Das, B., 2004. New lathyrane and podocarpane diterpenoids from *Jatropha curcas*. *Chemical and Pharmaceutical, Bulletin* 52, pp 608-611.

Richter, G., 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie. (Ed.) Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, pp 322-323.

Rogers, S.L., Friedhoff, L.T., 1997. Donepezil provides long-term clinical benefits for patients with Alzheimer's disease (AD). *J. Neurol. Sci.*, 150, S296.

Rogers, S.L., Farlow, M.R., Doody, R.S., 1998. Donepezil study group. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 50, pp 136-145.

Rousset, P., Marion, C., Coelho, F.C., Silva, O., Bélot, J.L., Berthaud, A., Clement, D., Fallot A., Girard, P., Prades, A., Silvie, P., Vaitilingom, G., Roscoe, R., Energie, I., Bedrossian, C. A., 2008. Guide technique pour une utilisation énergétique des huiles végétales, pp 79-85.

Rodrigues, J., Miranda, I., Gominho, J., Vasconcelos, M., Barradas, G., Pereira, H., Bianchi-de-Aguiar, F., Ferreira-Dias, S., 2013. Variability in oil content and composition and storage stability of seeds from *Jatropha curcas* L. grown in Mozambique. *Ind. Crop. Prod.* 50, pp 828-837.

Ryu, H.W., Curtis-Long, M.J., Jung, S., Jeong, I.Y., Kim, D.S., Kang, K.Y., Park, K.H., 2012. Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies. *Food Chem.*, 132, pp 1244-1250.

S

Sachs, J., 2007. Vorlesungen über Pflanzen-physiologie, verlag Wilhelm Engelmann. Leipzig, The Seed Biology, pp 11-12.

Saharia, S., Sarma, C.M., 2011. Ethno-medicinal studies on indigenous wetland plants in the tea garden tribes of Darrang and Udalguri district, Assam, *India. NeBIO.*, 2, pp 27-33.

Sakagami, H., Hashimoto, K., Suzuki, F., Ogiwara, T., Satoh, K., Ito, H., Hatano, T., Takashi, Y., Fujisawa, S., 2005. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry.*, 66, pp 2108 - 2120.

- Sakurai, T., Kitadate, K., Nishioka, H., Fujii, H., Kizaki, K., Kondoh, Y., Izawa, T., Ishida, H., Radák, Z., Ohno, H., 2010. Oligomerized grape seed polyphenols attenuate inflammatory changes due to antioxidative properties in coculture of adipocytes and macrophages. *J. Nutr. Biochem.*, 21, pp 47-54.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, (Ed.) Lavoisier (Tec &Doc), Paris, pp 300-398.
- Scalbert, A., 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: Hemingway R.W., Laks P.E. (Eds). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*. Plenum Press, New York.
- Schultze, M.J., 1986. Rudolf Mansfelds Verzeichnis landwirtschaftlicher and gärtnerischer Kulturpflanzen (ohne Zierpflanzen). Berlin: Akademie-Verlag.
- Schwarz, H., Liebhard, P., Ehrendorfer, K., Ruckenbauer, P., 2007. Potential growth and biomass productivity of *Miscanthus giganteus* as affected by plant density and N-fertilization in central Greece. *Biomass Bioenerg.*, 31, pp 145 - 152.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analyses of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91, pp 21-40.
- Sharma, S., Vasudevan, P., Madan, M., 1990. Insecticidal value of castor (*Ricinus communis* L.) against termites. *Int. Biodeterior.*, 27, pp 249-254.
- Shih, C.M., Lin, H., Liang, Y.C., et al. 2004. Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 496, pp 41-8.
- Shifriss, O., 1966. Synthesis of a new system of sex reversals in *Ricinus communis* L. Mimeographed manuscript in the Department of Horticulture and Forestry, Rutgers-The State. University, New Brunswick, N.J, pp 187-189.
- Shu, Y.Z., 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, 61, pp 1053-1071.
- Singh, R.P., 1970. Structure and development of seeds in Euphorbiaceae, *Jatropha* species. *Beitr. Biol. Pflanz.*, 47, pp 79-90.
- Singh, P.P., Chauhan, A.S.M.S., 2009. Activity guided isolation of antioxydants from leaves of *Ricinus communis* L. *Food Chem.*, 114, pp 1069-1072.

Small, G.W., 1998. Treatment of Alzheimer's disease: current approaches and promising developments. *Am. J. Med.*, 104, pp 32-38.

Small, E., Catling, P.M., 2000. Les cultures médicinales canadiennes. Presses scientifiques du CNRC, Ottawa (Ontario), Canada. p 281.

Soontornchainaksaeng, P., Jenjittikul, T., 2003. Karyology of *Jatropha* (Euphorbiaceae) in Thailand. *Thai. For. Bull.*, 31. p 105.

Sramek, J.J., Frackiewicz, E.J., Cutler, N.R., 2000. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin. Inv. Drug.*, 9, pp 2393-2402.

Srinivas, K.V.N.S., Rao, Y.K., Mahender, I., Das, B., Rama Krishna, K.V.S., Kishore, H.K., Murty, U.S.N., 2003. Flavanoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry* 63, pp 789-792.

Sudha, B., Dolly, M., Rupali, R., Neha, A., Sangeeta, S., 2013. Ecofriendly Finishing of Fabric with *Jatropha Curcas* Leaves. *Res. J. Fam. Community Consum. Sci.*, 1. pp 7-9.

Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M. Spranger, I., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins, *J. Agric. Food Chem.*, 46, pp 4267-4274.

T

Takeda, Y., 1982. Development study on *Jatropha curcas* (sabu dum) oil as a substitute for diesel engine oil in Thailand. *J. Agric. Assoc. China.*, 120, pp 1-8.

Tsuchiya, H., Linuma, M., 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*, *Phytomedicine*, 7, pp 161-165.

Tyler, V.E., 1993. The honest herbal. 3rd ed. Pharmaceutical Products Press (Haworth Press) Binghamton, NY. p 375.

U

Urbain, A., 2007. Isolement de xanthones et coumarines inhibitrices de l'acétylcholinestérase, respectivement à partir de *Gentianella campestris* (L.) Börner et *Gentianella amarella* (L.) Börner ssp. *acuta* (Michx.) J.M.Gillett (Gentianaceae), et *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch (Apiaceae). Thèse de doctorat à la Faculté des sciences de l'Université de Genève, p 29.

V

Villar, A., Gasco, M.A., Alcaraz, M.J., 1987. Some aspects of the inhibitory activity of hypolaetin-8-glucoside in acute inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39 (7), pp 502-7.

Villegas, L.F., Fernandez, I.D., Maldonado, H., Torres, R., Zavaleta, A., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B., 1997. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. *J. Ethnopharmacol.*, 55, pp 193-200.

Visen, P., Shukla, B., Patnaik, G., Tripathi, S., Kulshreshtha, D., Srimal, R., Dhawan, B., 1992. Hepatoprotective activity of *Ricinus communis* leaves. *Int. J. Pharmacogn.*, 30, pp 241-250.

Vöhringer. 1987. Untersuchungszeugnis für Futtermittel. Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt, Bonn.

W

Wan, H.M., 2006. Biofuels Republic Brazil, la rapide expansion de l'industrie des biocarburants au Brésil fait peser de sérieuses menaces pour la survie de certaines populations et pour la planète, pp 19-21.

Waterhouse, A., 1999. Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. *Food Anal. Chem.*, 299, pp152-78.

William, A.V.M.L., George, J.R., Shifriss, O., 1967. Interspersed Sexuality In *Ricinus*, *Genetics*, 57, pp 347-356.

Woodruff-Pak, D.S., Vogel, R.W., Wenk, G.L., 2001. Galantamine: effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (4), pp 2089-2094.

Wender, P.A., Martin-Cantalejo, Y., Carpenter, A.J., Chiu, A., DeBrabander, J., Harran, P.G., Jimenez, J.M, Koehler, M.F.T., Lippa, B., Morrison, J.A., Müller, S.G., Müller, S.N., Park, C.M., Shiozaki, M., Siedenbiedel, C., Skalitzky, D.J., Tanaka, M., Irie, K., 1998. The chemistry-medicine continuum: Synthetic computer, spectroscopic and biological studies on new chemotherapeutic leads. *Pure Appl. Chem.* 70 (3), pp 539-546.

Wu, J., Liu, Y., Tang, L., Zhang, F., Chen, F., 2011. A study on structural features in early flower development of *Jatropha curcas* L. and the classification of its inflorescences. *African J. Agric. Res.*, 6, pp 275-284.

Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., Xu, X., 2013. Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase, *J. Agric. Food Chem.*, 6, pp 8185-8190.

X

Xian, X., Jianguo, C., Yunxia, Z., Quanxi, W., Jianbo, X., 2014. Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China. . *Ind. Crop. Prod.*, 58, pp 91-98.

Y

Yao, L., Han, C., Chen, G., Song, X., Chang, Y., Zang, W., 2012. A new asymmetric diamide from the seed cake of *Jatropha curcas* L. *Fitoterapia*, 83, pp 1318-1321.

Youdim, K.A., McDonald, J., Kalt, W., et al. 2002. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *J. Nutr. Biochem.*, 13 (5), pp 282-8.

Z

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

ANNEXE I

❖ Analyse des extraits de ricin

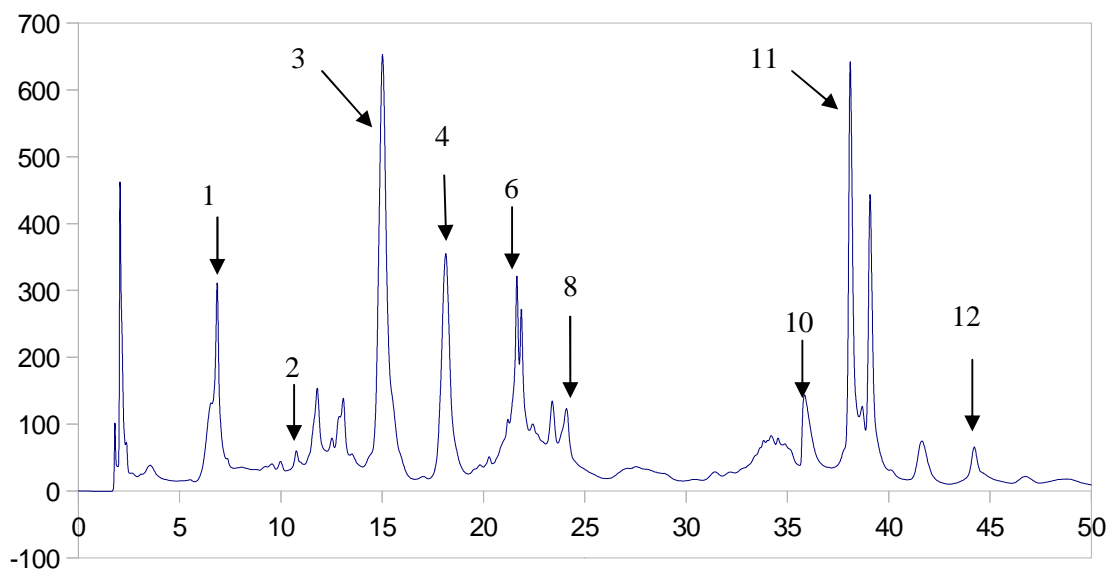


Figure 86. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population AA de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentsique, 4: catechine, 6: acide vanillique, 8: epicatechine, 10: rutine, 11: vitexine, 12: naringine.

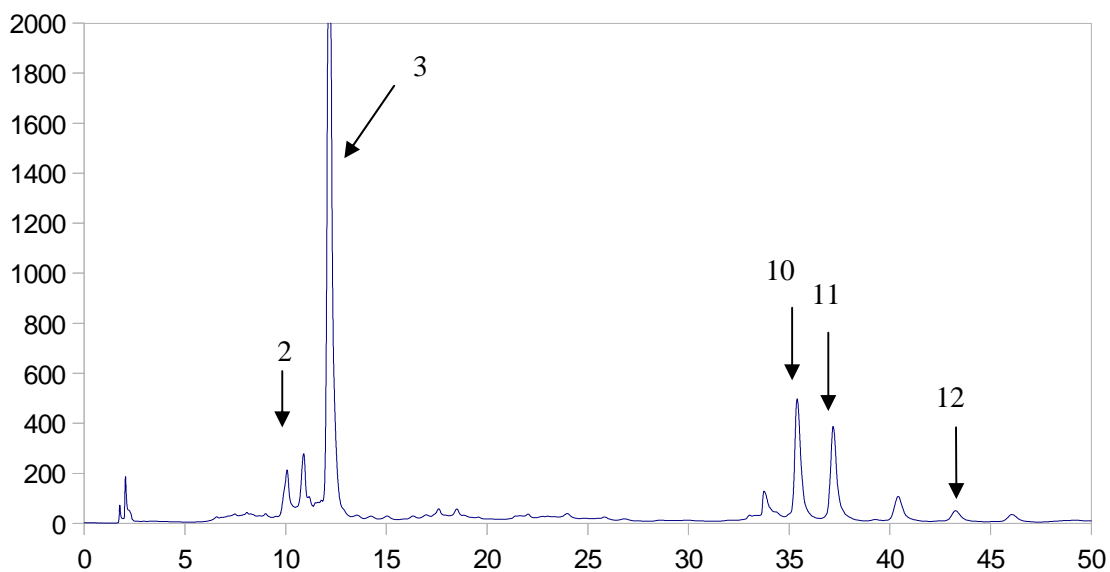


Figure 87. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population AA de ricin à 320 nm.

2: acide protocatechique, 3: acide gentsique, 10: rutine, 11: vitexine, 12: naringine.

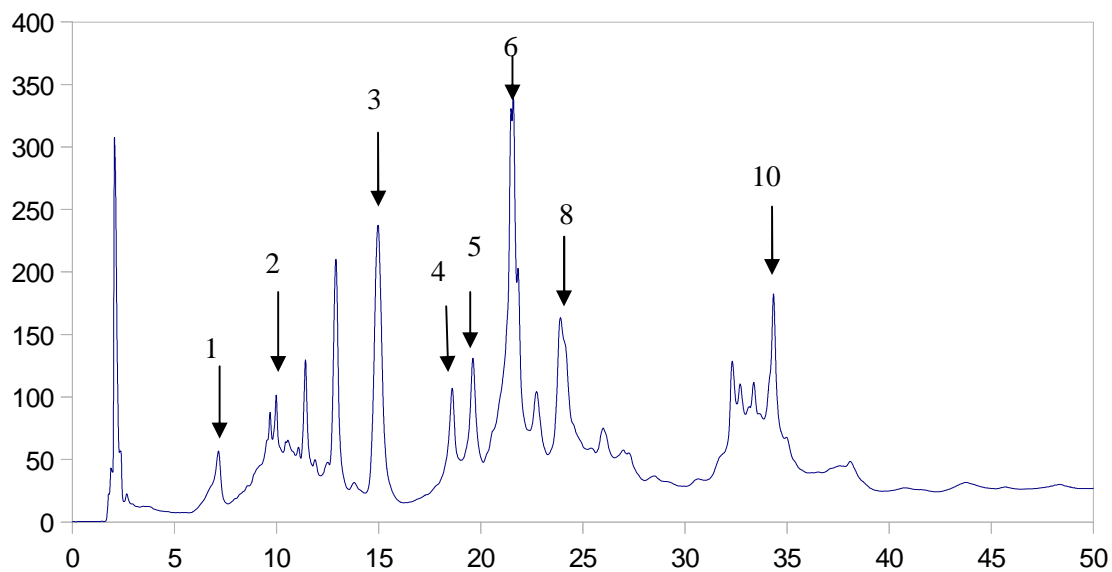


Figure 88. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population AA de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 5: acide chlorogénique, 6: acide vanillique, 8: epicatechine, 10: rutine.

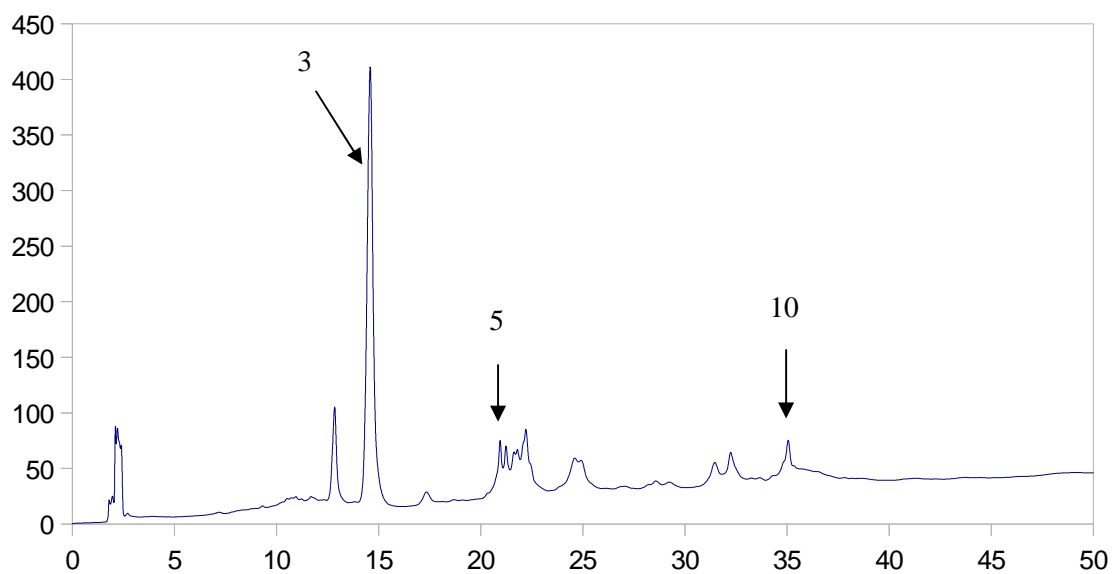


Figure 89. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population AA de ricin à 320 nm.

3: acide gentisique, 5: acide chlorogénique, 10: rutine.

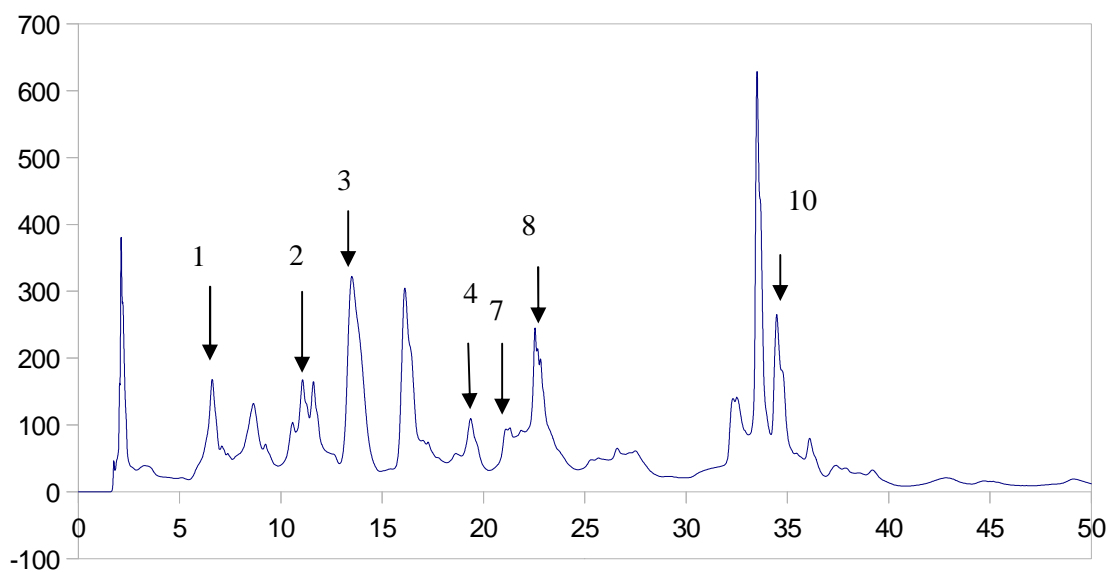


Figure 90. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population Bf de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 7: acide caféique, 8: epicatechine, 10: rutine.

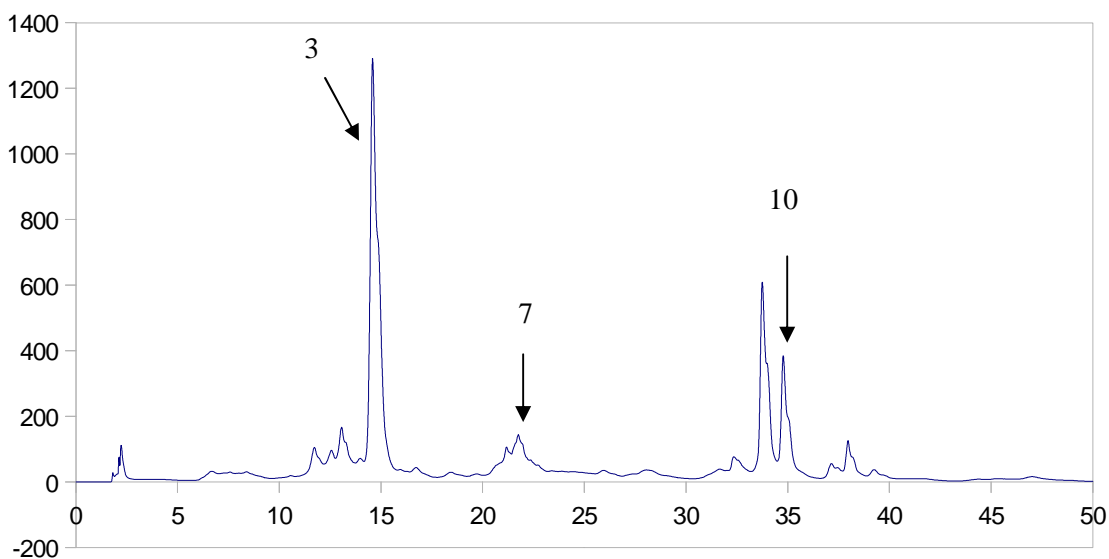


Figure 91. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population Bf de ricin à 320 nm.

3: acide gentisique, 7: acide caféique, 10: rutine.

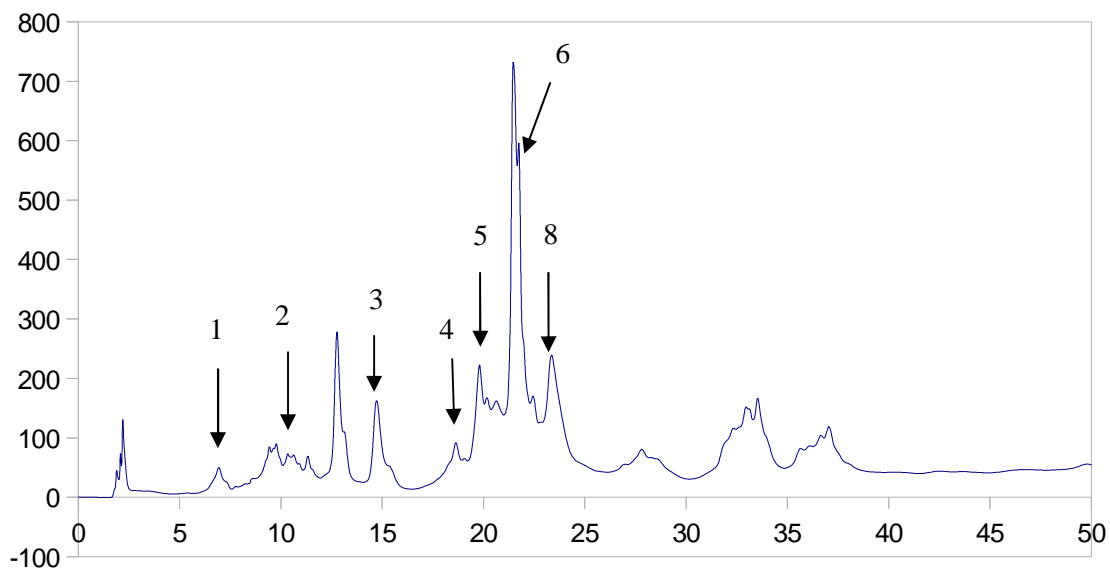


Figure 92. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population Bf de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 5: acide chlorogénique, 6: acide vanillique, 8: epicatechine.

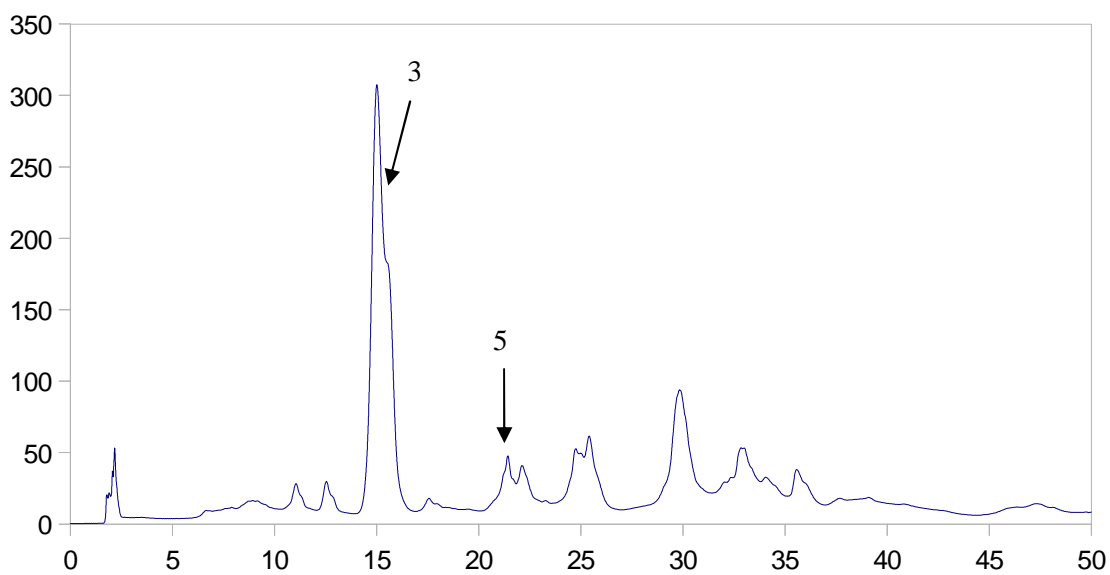


Figure 93. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population Bf de ricin à 320 nm.

3: acide gentisique, 5: acide chlorogénique.

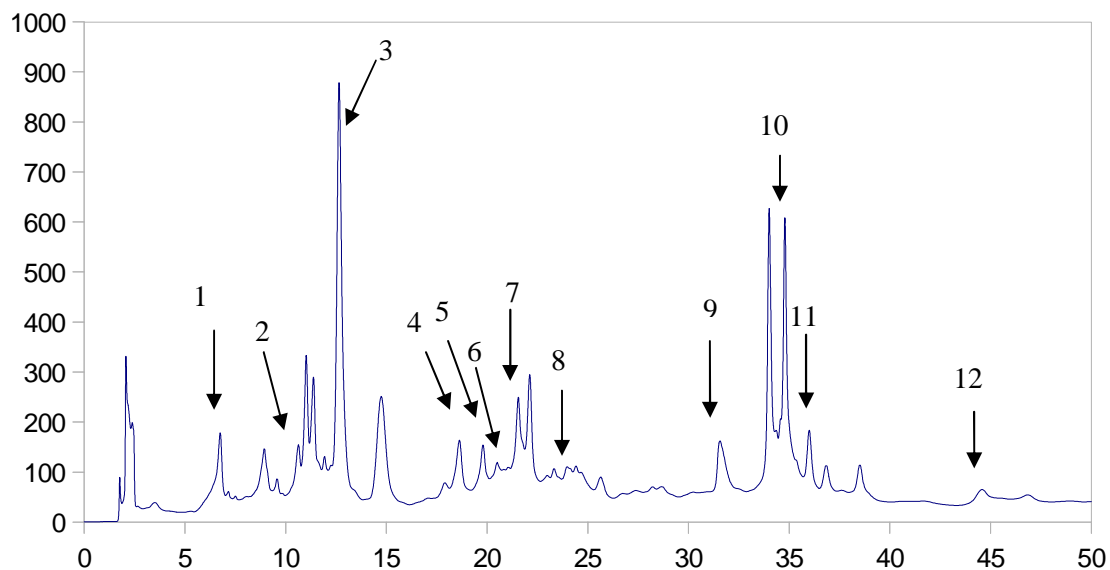


Figure 94. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population H de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 5: acide chlorogénique, 6: acide vanillique, 7: acide caféique, 8: epicatechine, 9: acide p-coumarique, 10: rutine, 11: vitexine, 12: naringine.

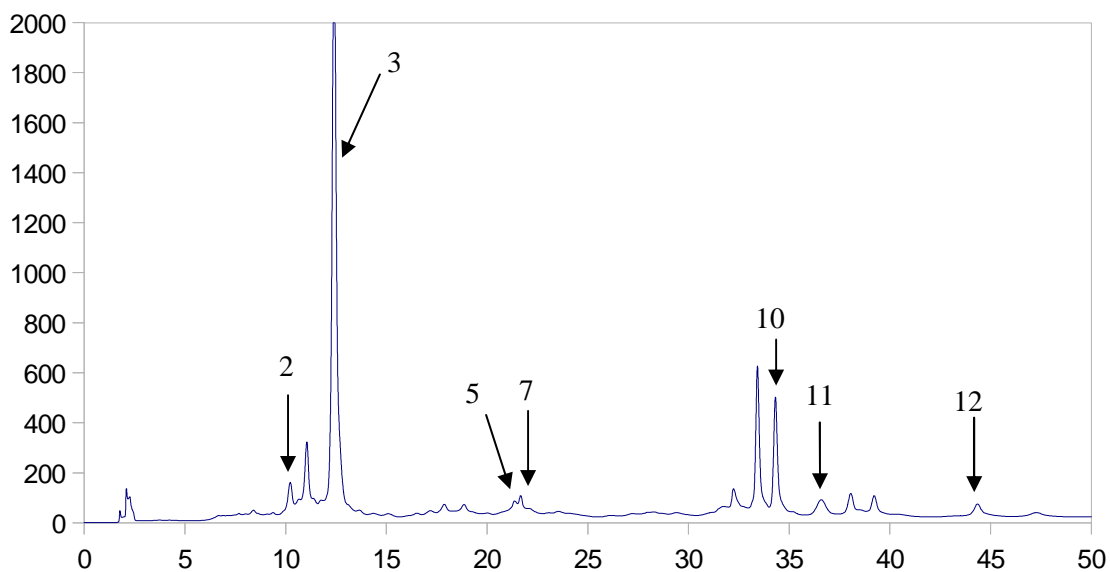


Figure 95. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population H de ricin à 320 nm.

2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 5: acide chlorogénique, 7: acide caféique, 10: rutine, 11: vitexine, 12: naringine.

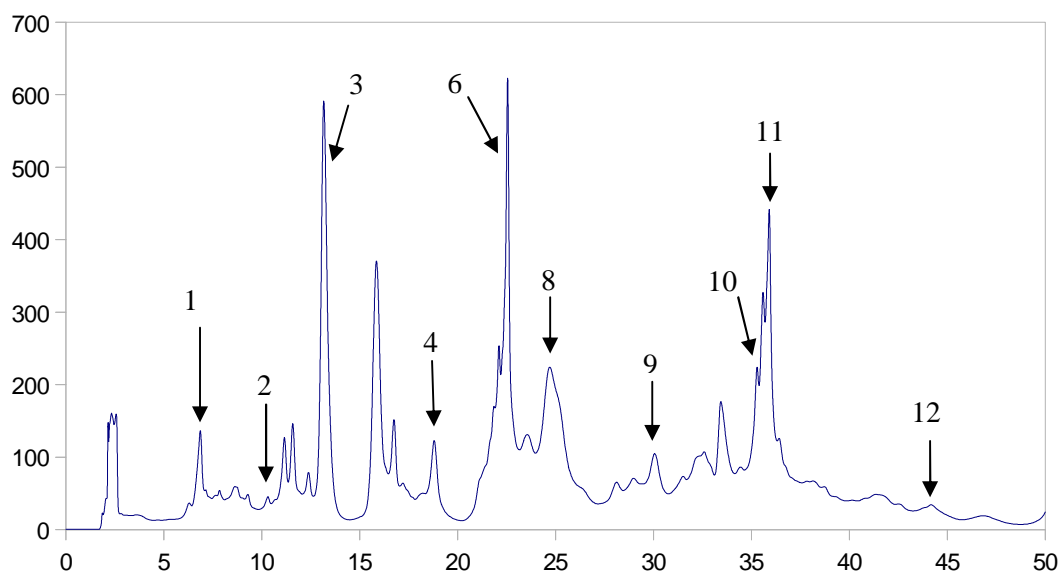


Figure 96. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population H de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 6 : acide vanillique, 8: epicatechine, 9: acide p-coumarique, 10: rutine, 11: vitexine, 12: naringine.

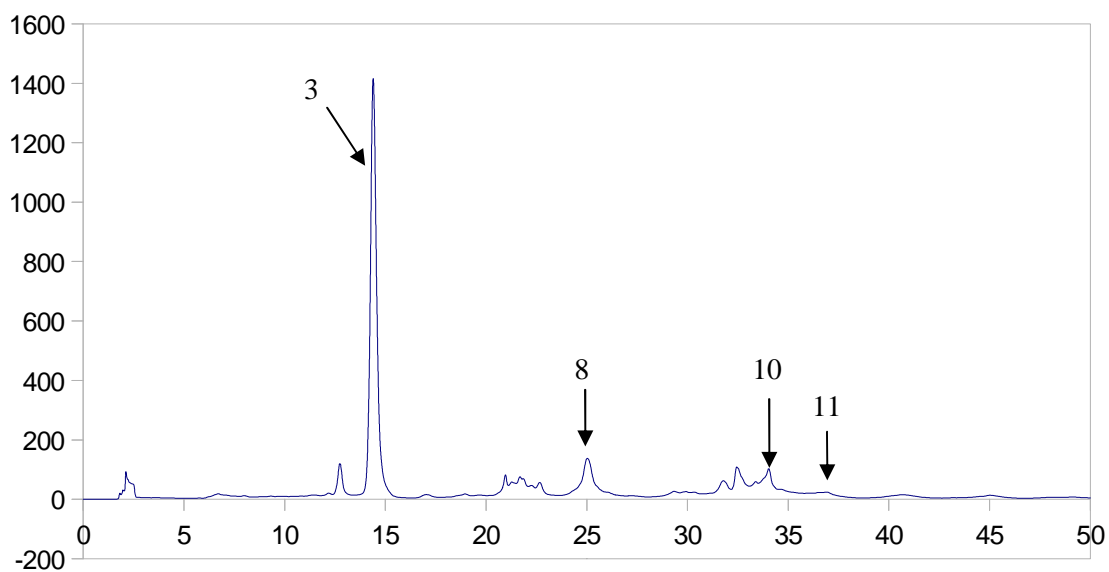


Figure 97. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population H de ricin à 320 nm.

3: acide gentisique, 10: rutine, 11: vitexine.

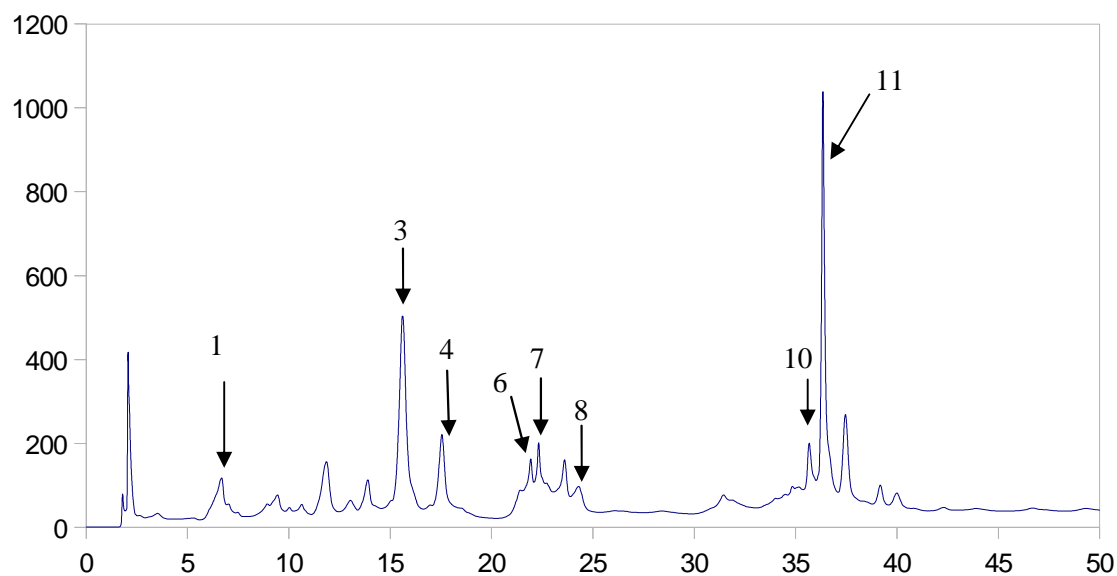


Figure 98. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population B de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 6: acide vanillique, 7: acide caféique, 8: epicatechine, 10: rutine, 11: vitexine.

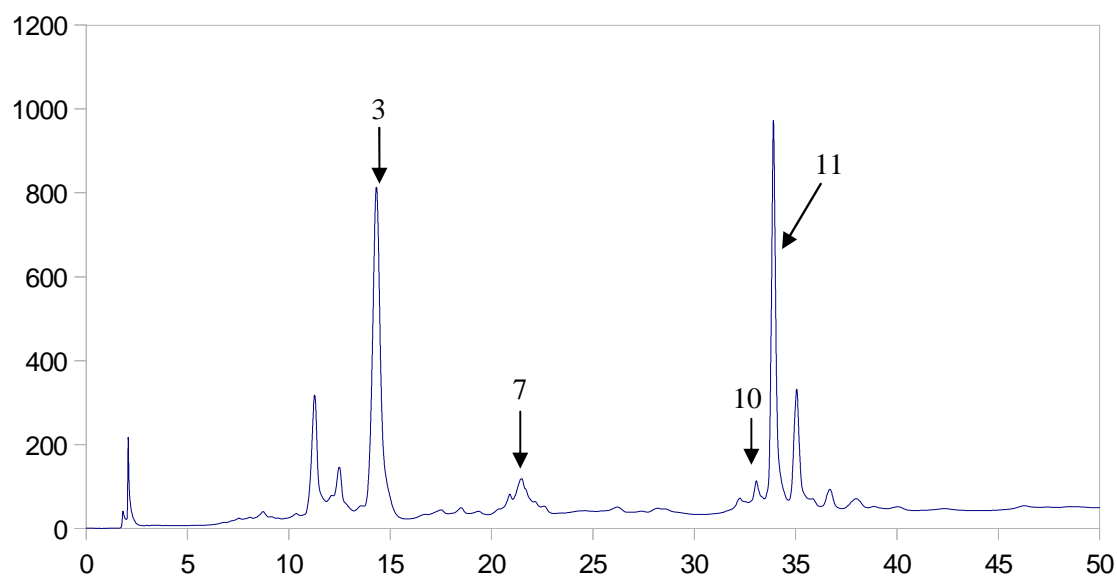


Figure 99. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population B de ricin à 320 nm.

3: acide gentisique, 7: acide caféique, 10: rutine, 11: vitexine.

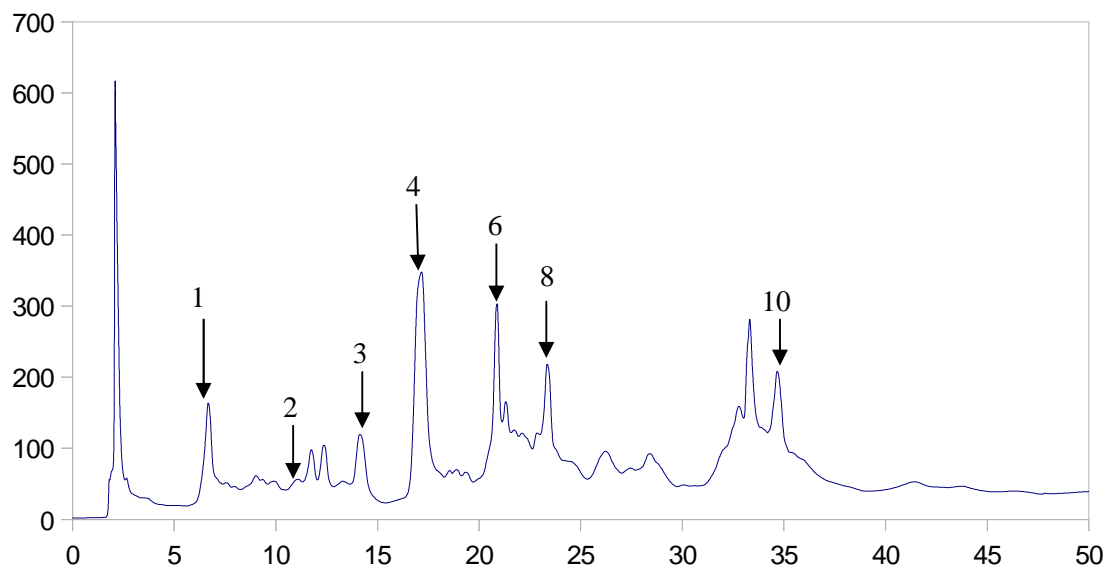


Figure 100. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population B de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentsique, 4: catechine, 6: acide vanillique, 8: epicatechine, 10: rutine.

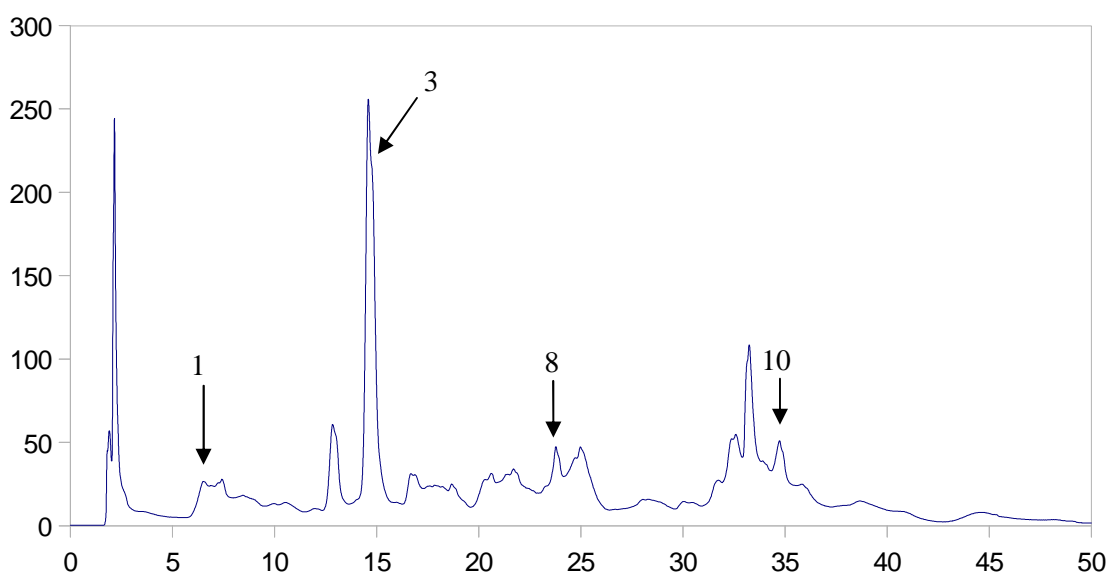


Figure 101. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population B de ricin à 320 nm.

1: acide gallique, 3: acide gentsique, 8: epicatechine, 10: rutine.

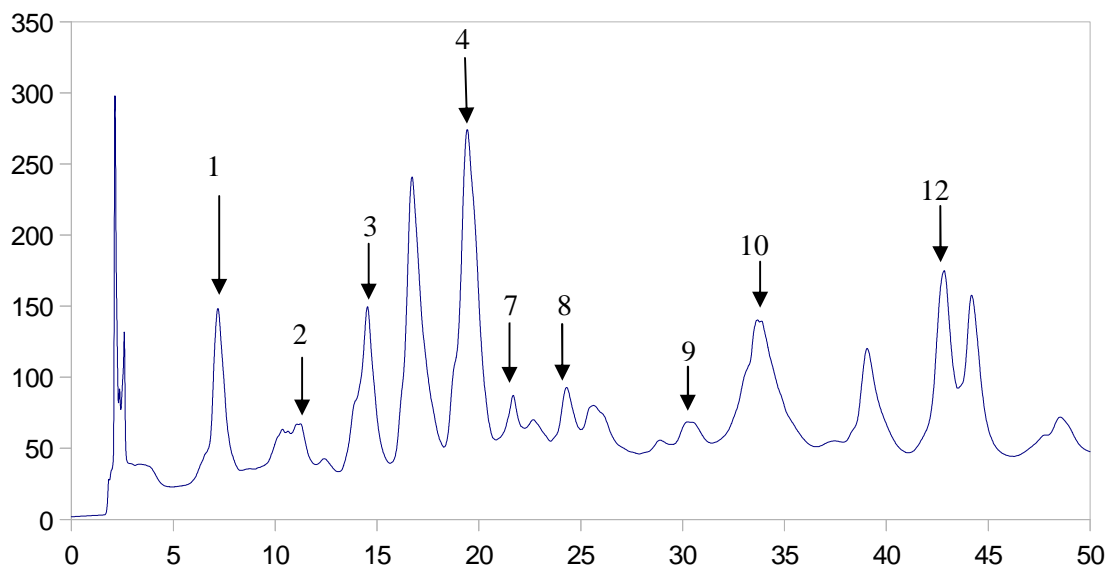


Figure 102. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population KH de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 7: acide caféique, 8: epicatechine, 9: acide p-coumarique, 10: rutine, 12: naringine.

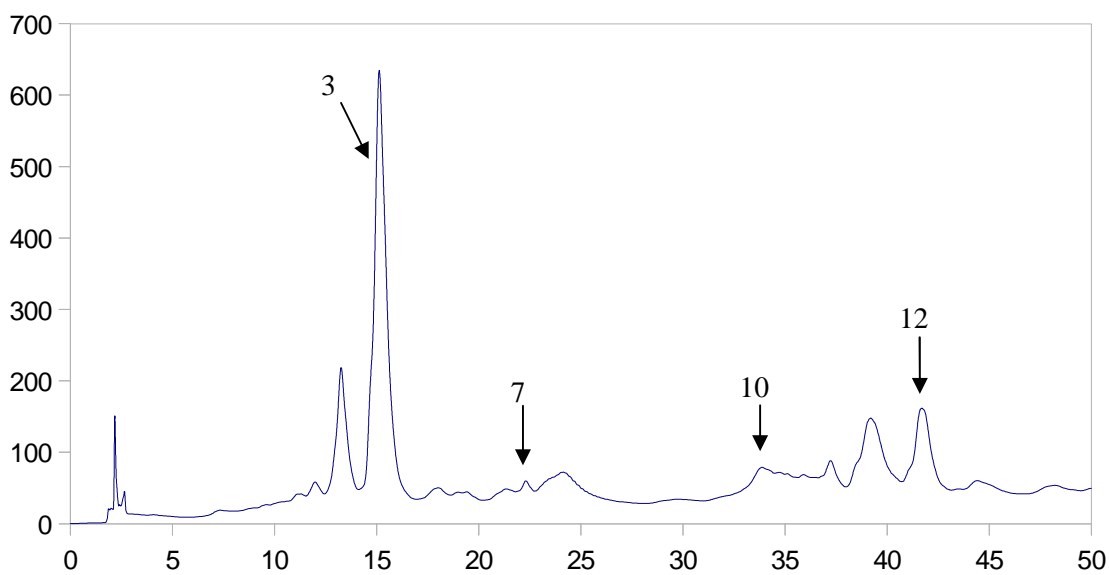


Figure 103. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population KH de ricin à 320 nm.

3: acide gentisique, 7: acide caféique, 10: rutine, 12: naringine.

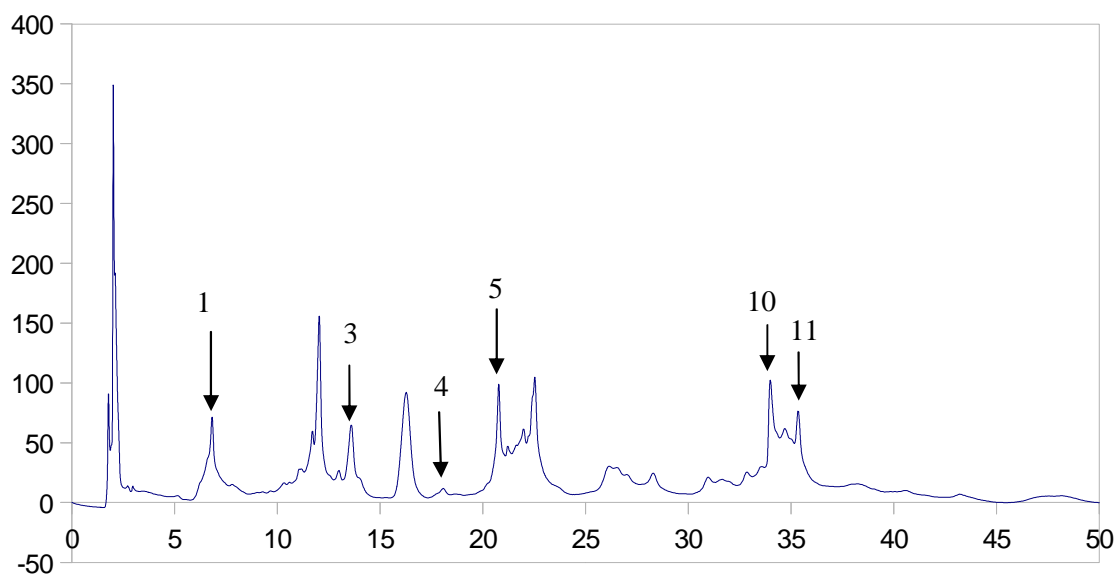


Figure 104. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population KH de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 5: acide chlorogénique, 10: rutine, 11: vitexine.

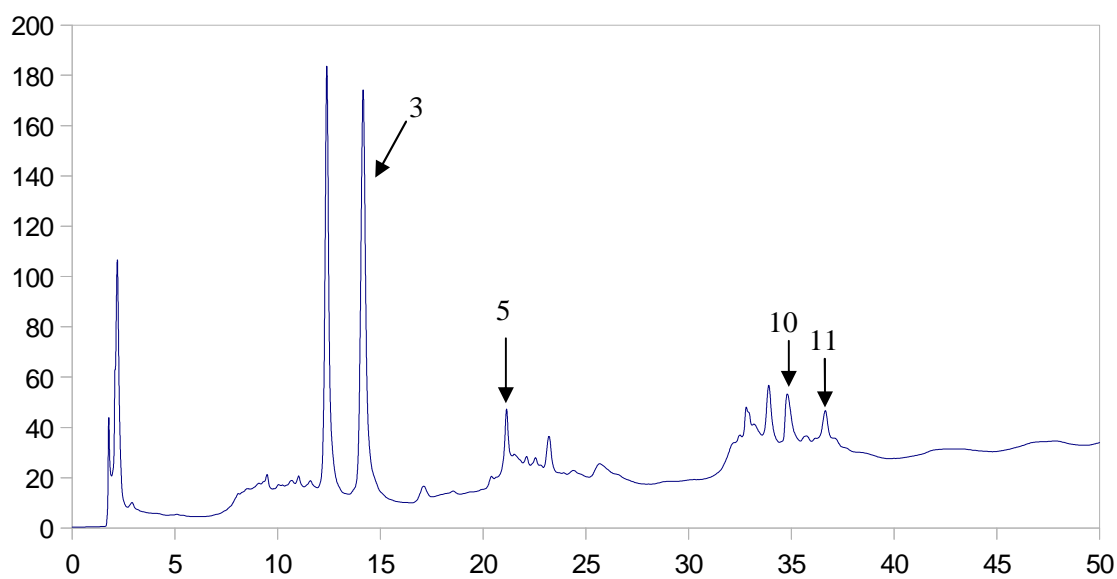


Figure 105. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population KH de ricin à 320 nm.

3: acide gentisique, 5: acide chlorogénique, 10: rutine, 11: vitexine.

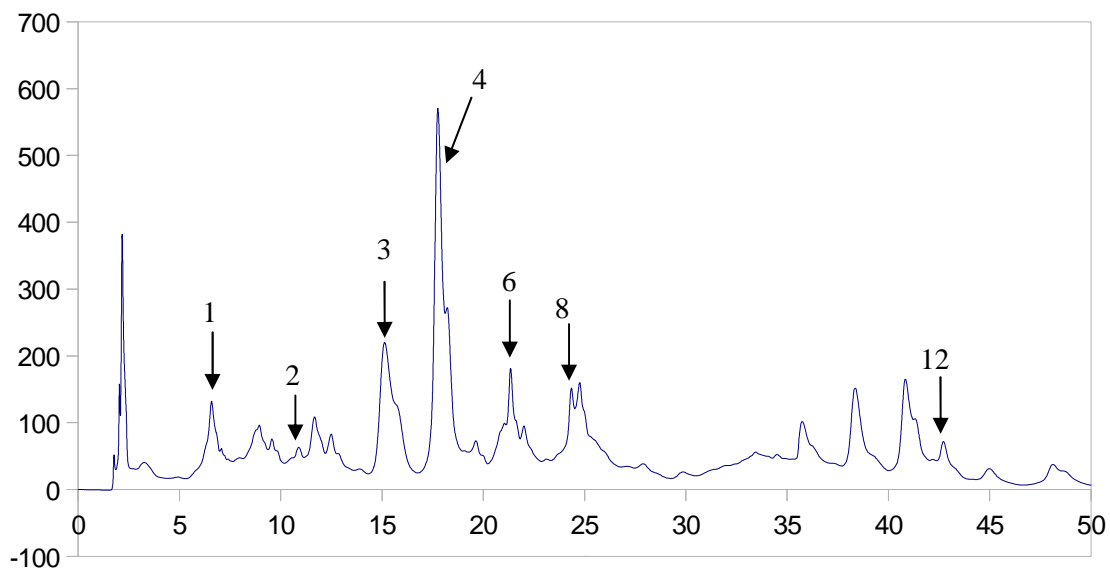


Figure 106. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population Nb de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentsique, 4: catechine, 6: acide vanillique, 8: epicatechine, 12: naringine.

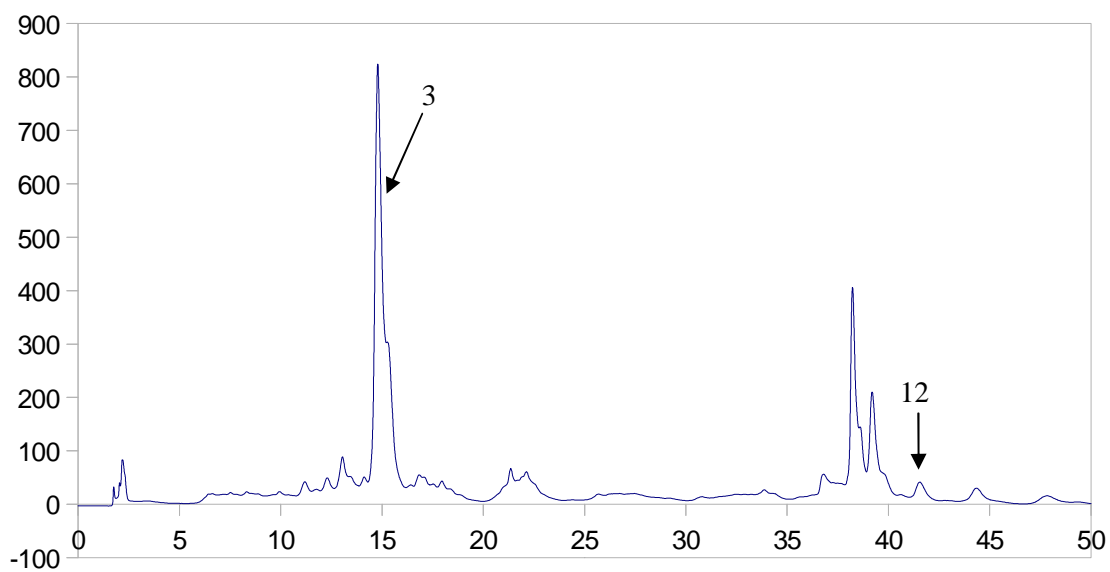


Figure 107. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population Nb de ricin à 320 nm.

3: acide gentsique, 12: naringine.

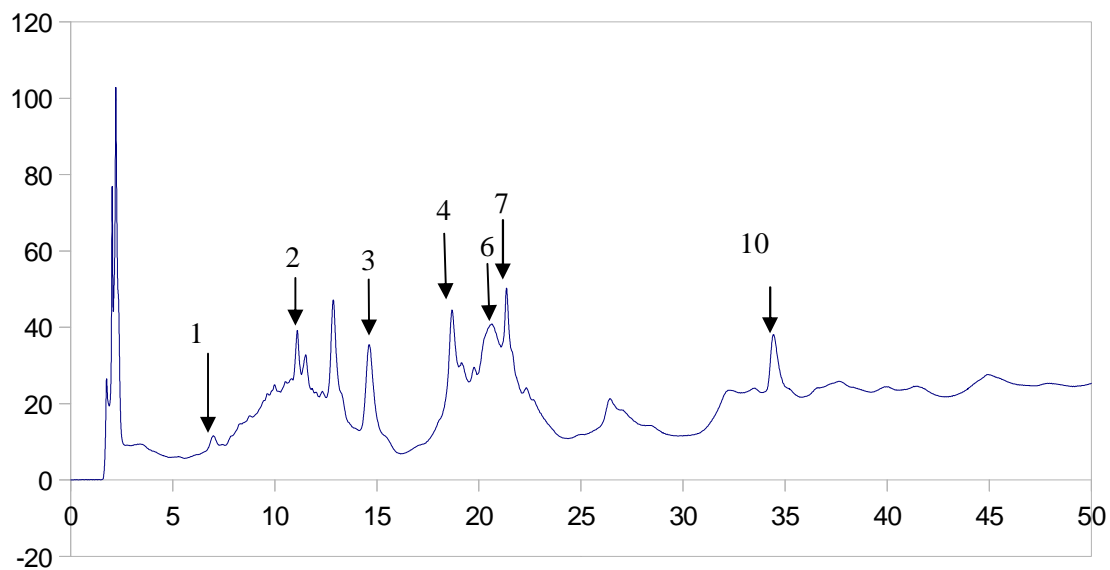


Figure 108. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population Nb de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 6: acide vanillique, 7: acide caféique, 10: rutine.

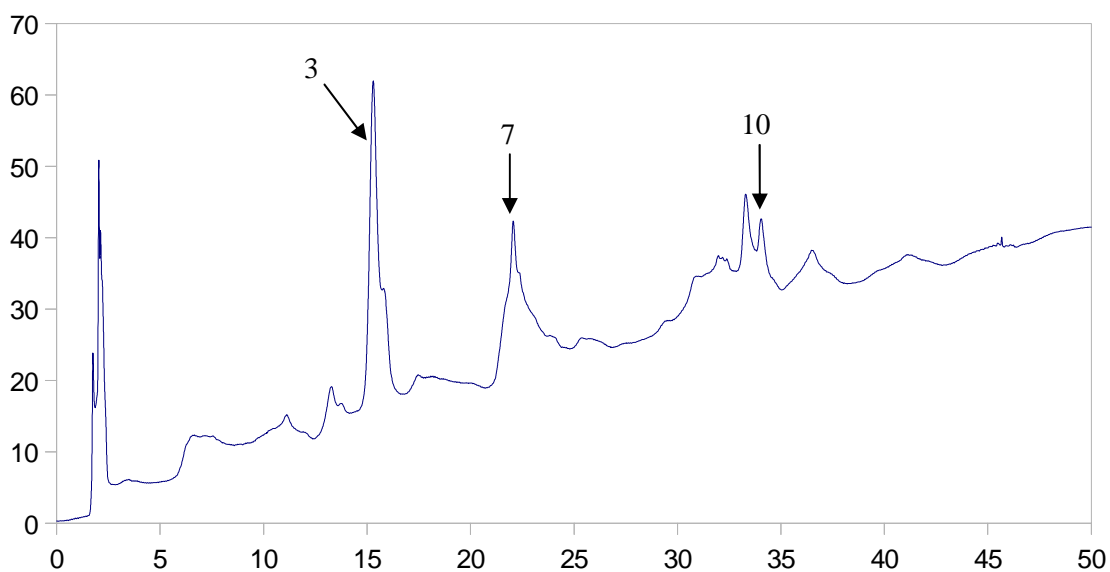


Figure 109. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population Nb de ricin à 280 nm.

3: acide gentisique, 7: acide caféique, 10: rutine.

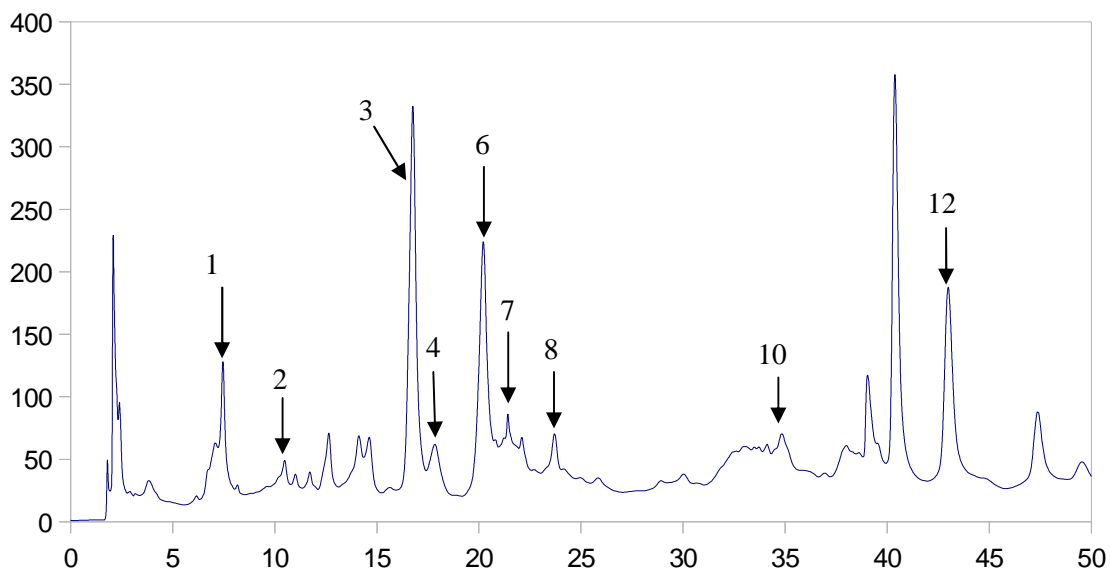


Figure 110. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population N de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentsique, 4: catechine, 6: acide vanillique, 7: acide caféique, 8: epicatechine, 10: rutine, 12: naringine.

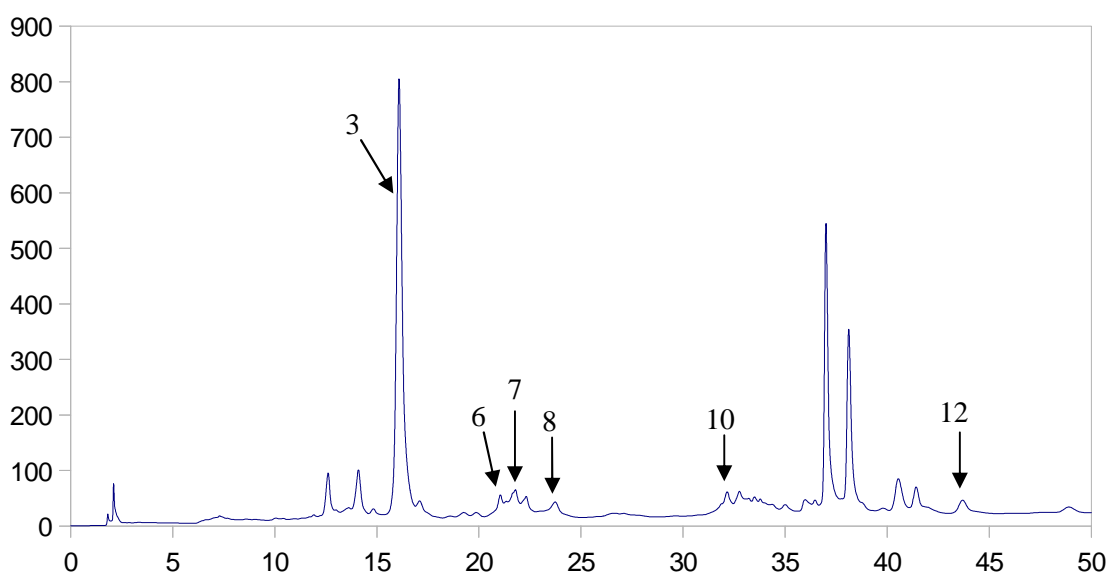


Figure 111. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population N de ricin à 320 nm.

3: acide gentsique, 6: acide vanillique, 7: acide caféique, 8: epicatechine, 10: rutine, 12: naringine.

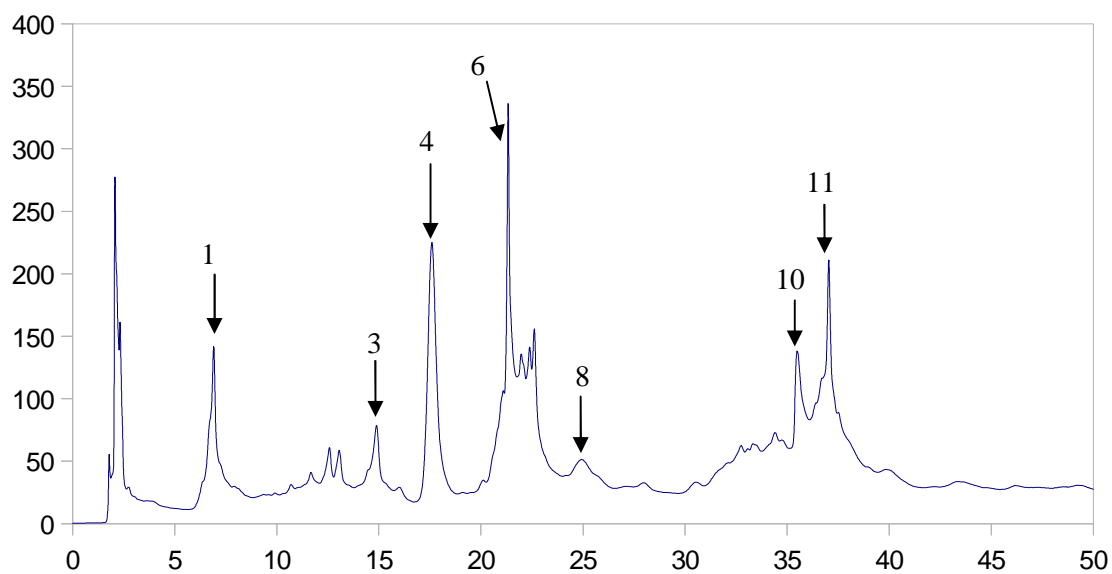


Figure 112. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population N de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 6: acide vanillique, 8: epicatechine, 10: rutine, 11: vitexine.

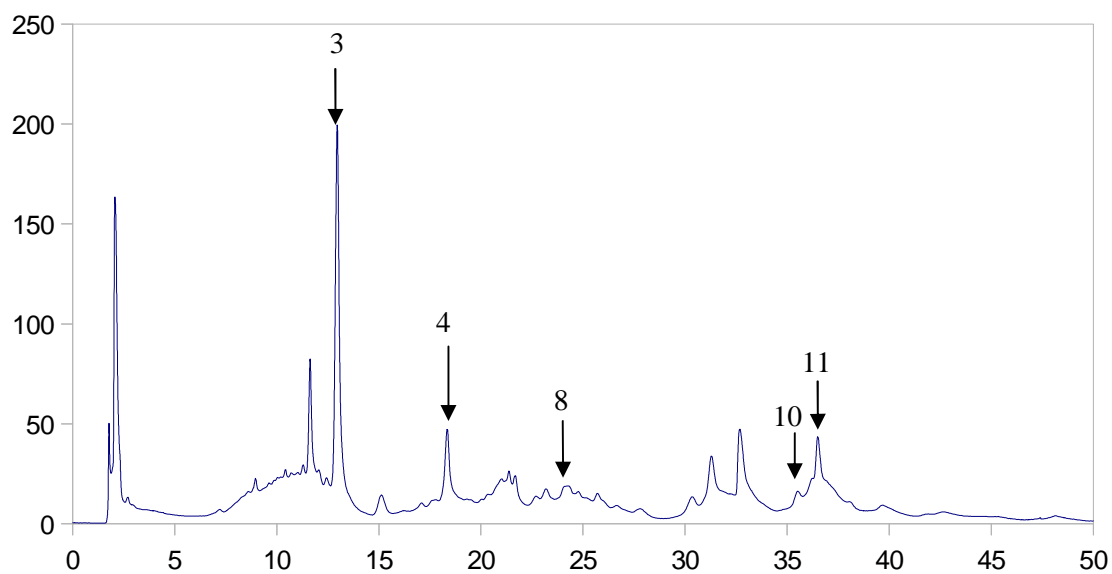


Figure 113. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population N de ricin à 320 nm.

3: acide gentisique, 4: catechine, 8: epicatechine, 10: rutine, 11: vitexine.

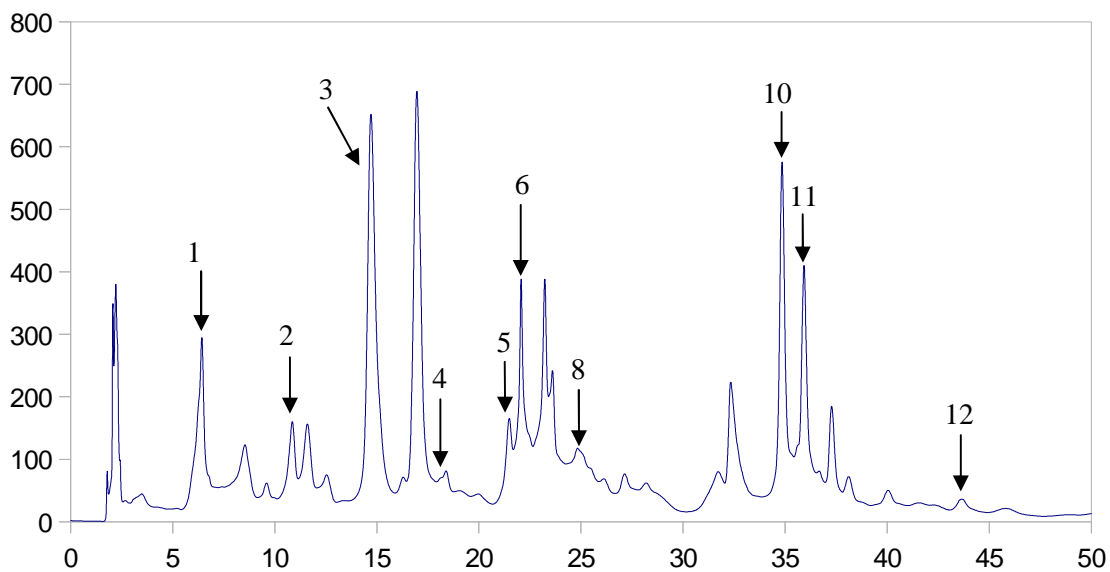


Figure 114. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population RA de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentisique, 4: catechine, 5: acide chlorogénique, 6: acide vanillique, 8: epicatechine, 10: rutine, 11: vitexine, 12: naringine.

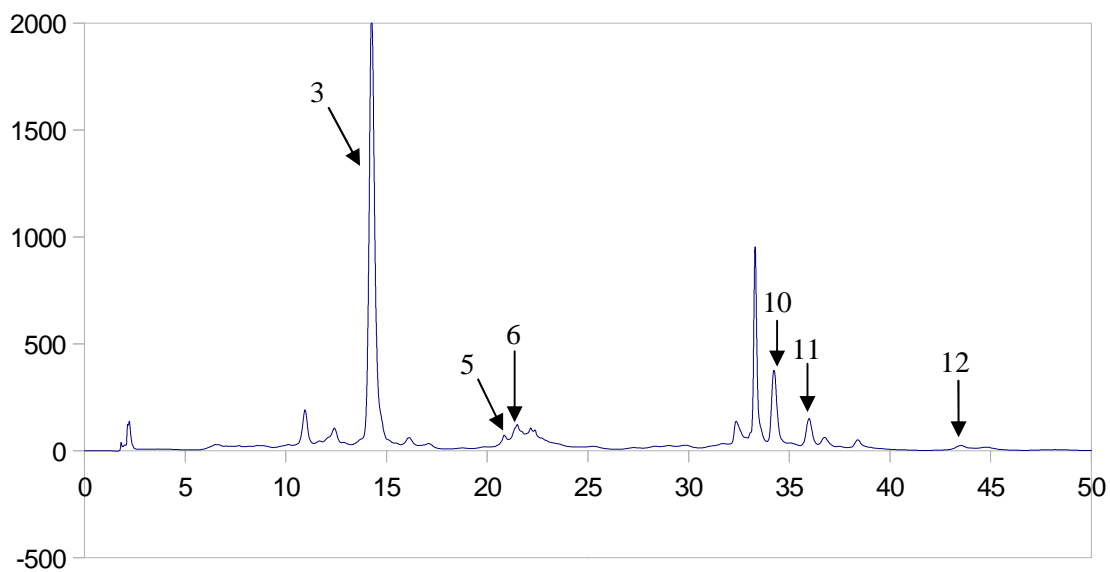


Figure 115. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population RA de ricin à 320 nm.

3: acide gentisique, 5: acide chlorogénique, 6: acide vanillique, 10: rutine, 11: vitexine, 12: naringine.

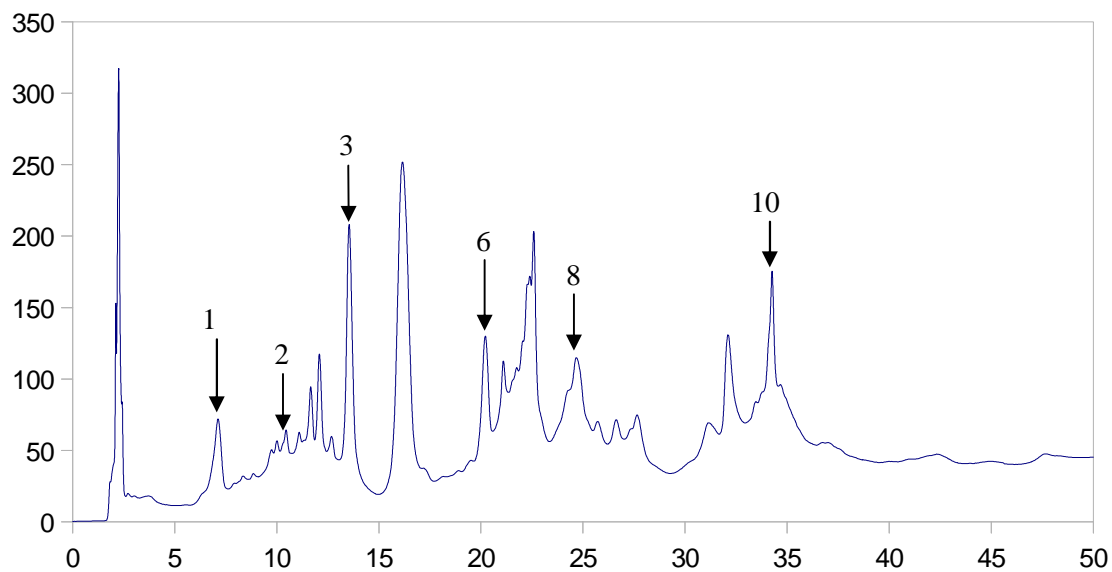


Figure 116. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population RA de ricin à 280 nm.

1: acide gallique, 2: acide protocatechique, 3: acide gentsique, 6: acide vanillique, 8: epicatechine, 10: rutine.

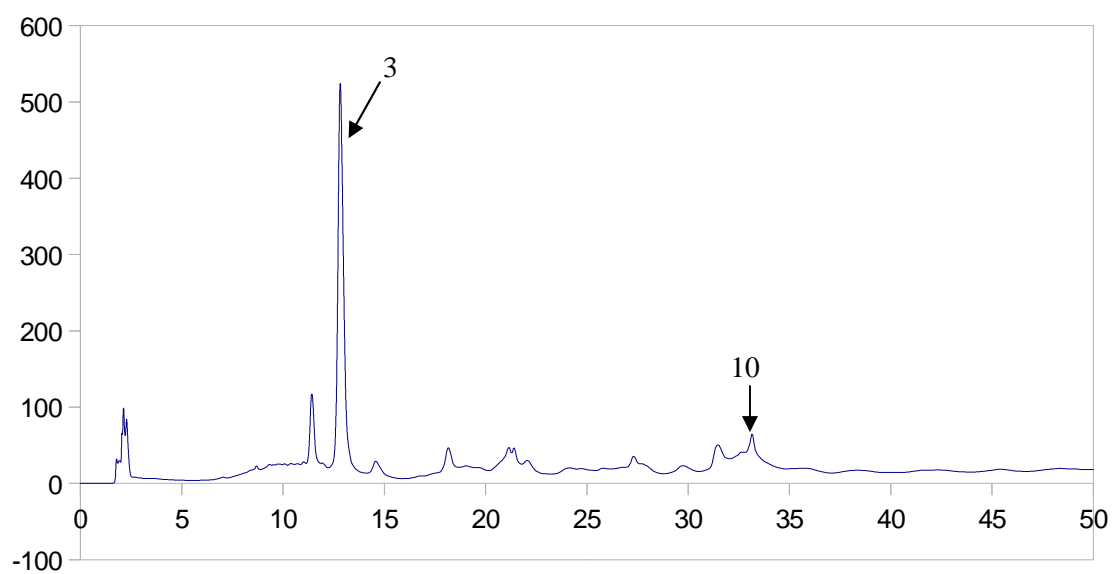


Figure 117. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population RA de ricin à 320 nm.

3: acide gentsique, 10: rutine

❖ Analyse des extraits de jatropha

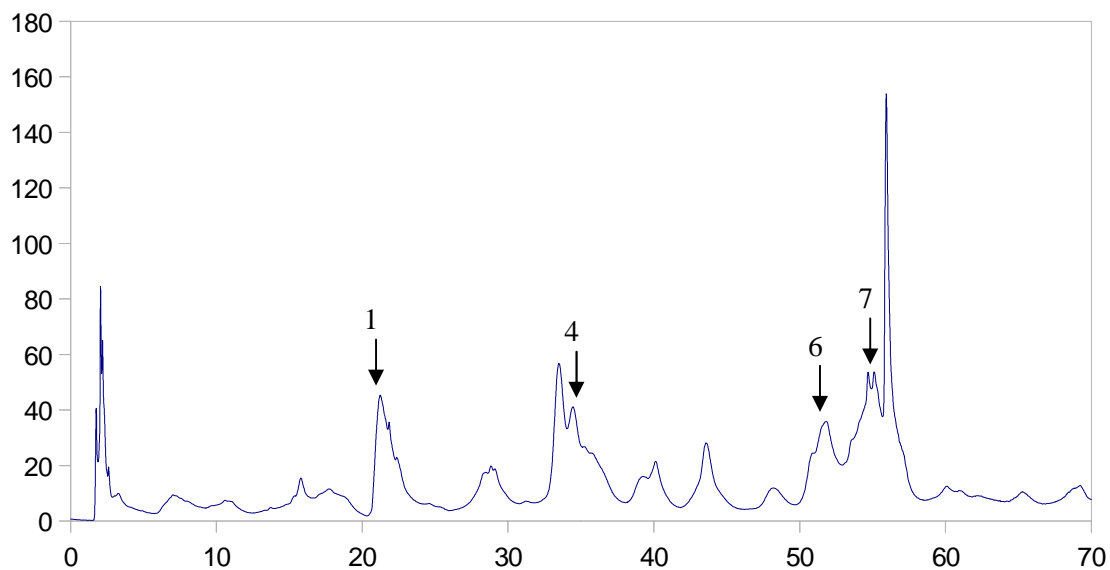


Figure 118. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P1 de jatropha à 280 nm.

1 : acide chlorogénique, 4 : rutine, 6: naringine, 7 : acide cinnamique

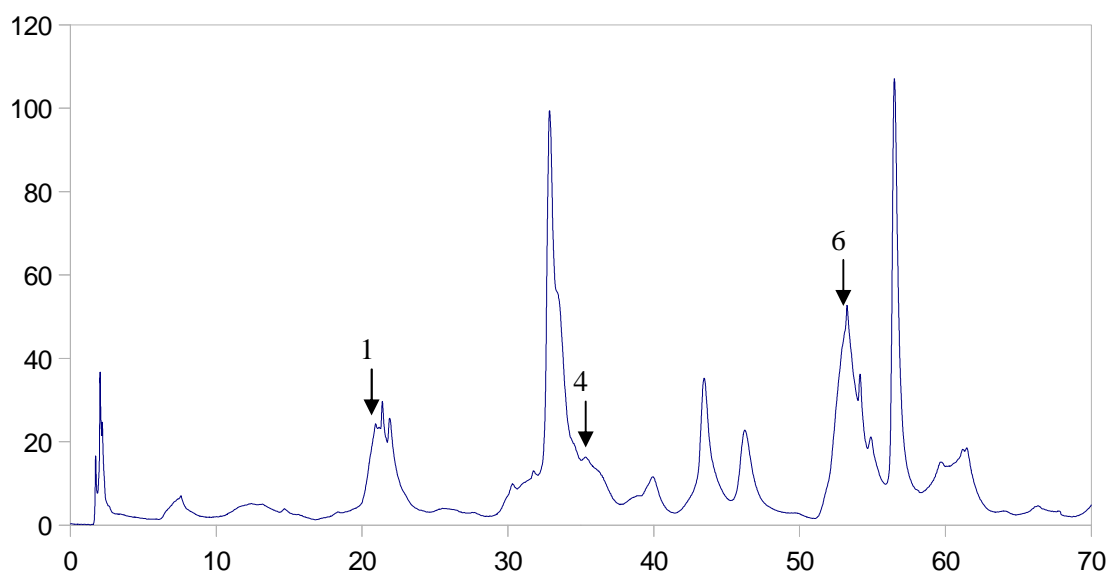


Figure 119. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P1 de jatropha à 320 nm.

1 : acide chlorogénique, 4 : rutine, 6: naringine

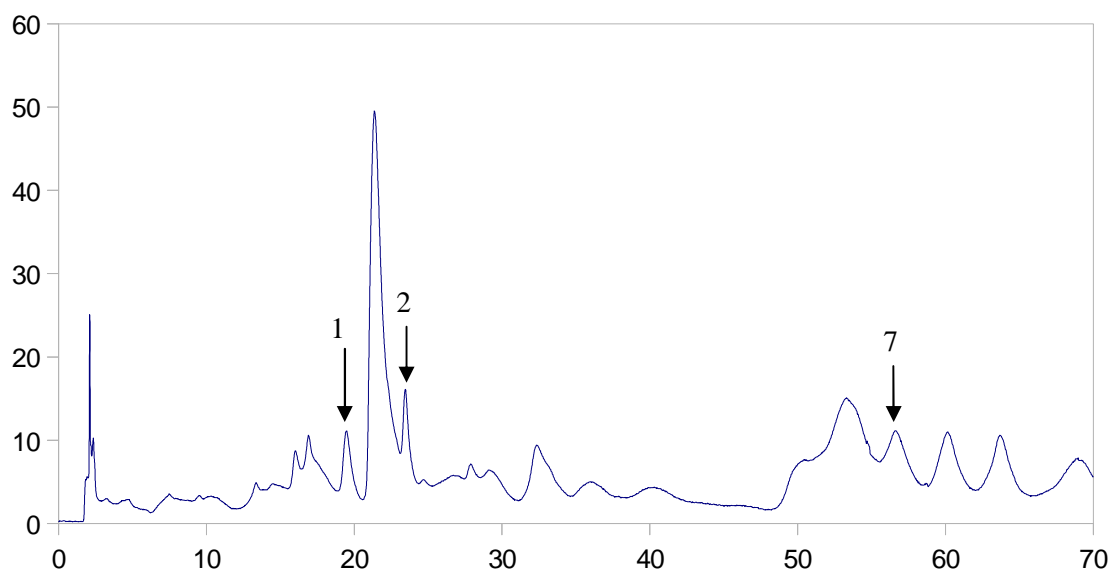


Figure 120. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P1 de jatropha à 280 nm.

1: acide chlorogénique, 2: épicatechine, 7 : acide cinnamique.

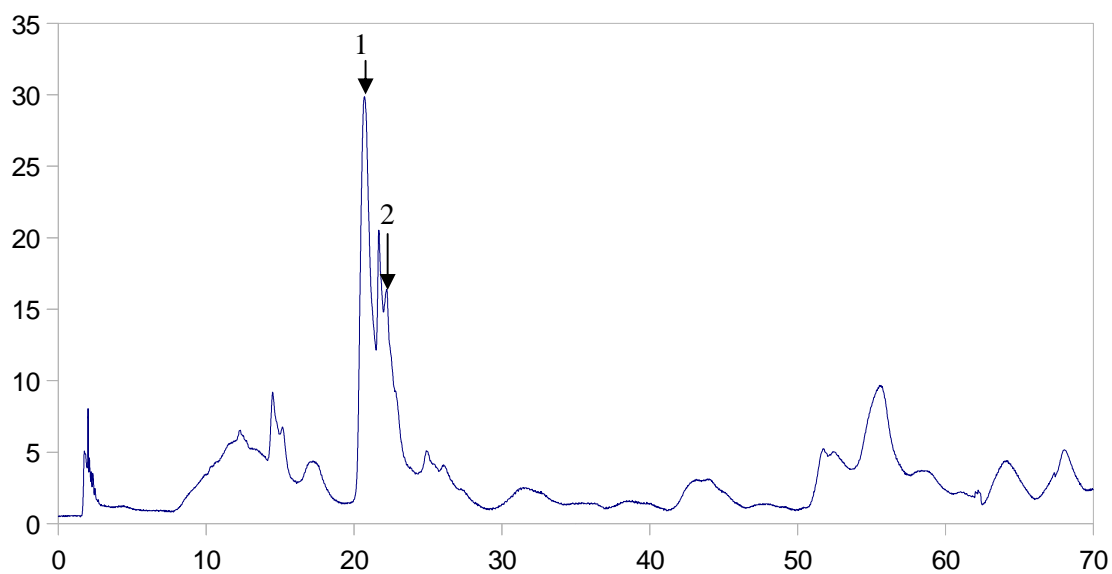


Figure 121. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P1 de jatropha à 320 nm.

1: acide chlorogénique, 2: épicatechine

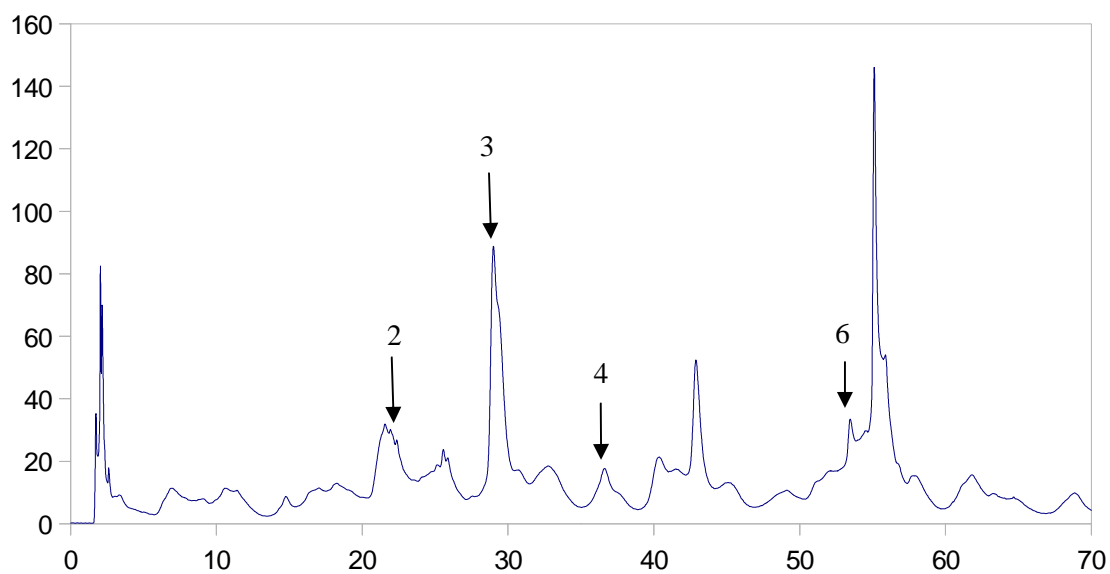


Figure 122. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P2 de jatropha à 280 nm.

2: epicatechine, 3: acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine.

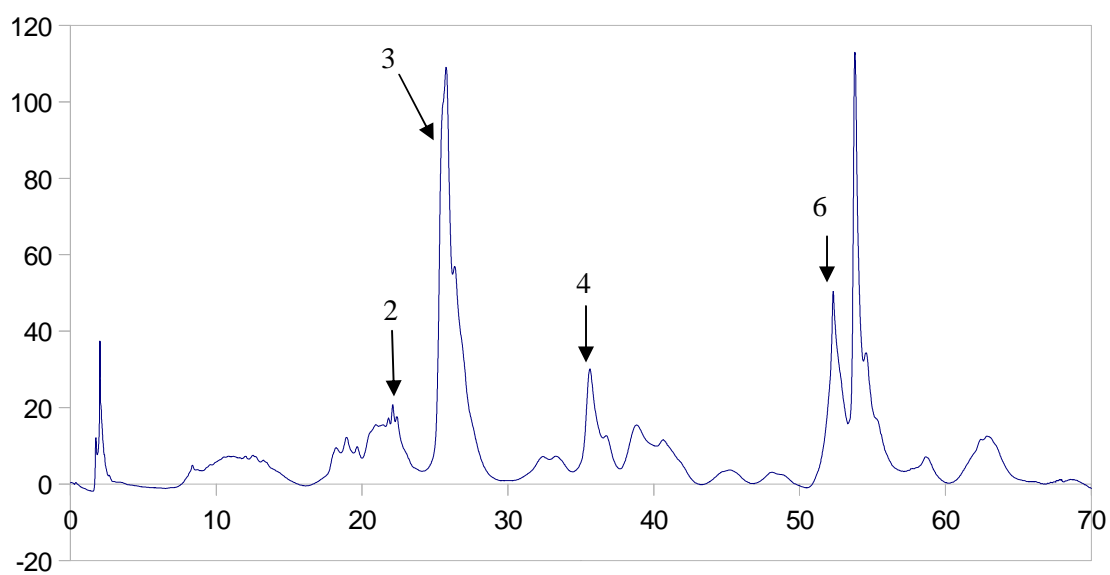


Figure 123. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P2 de jatropha à 320 nm.

2: epicatechine, 3: acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine.

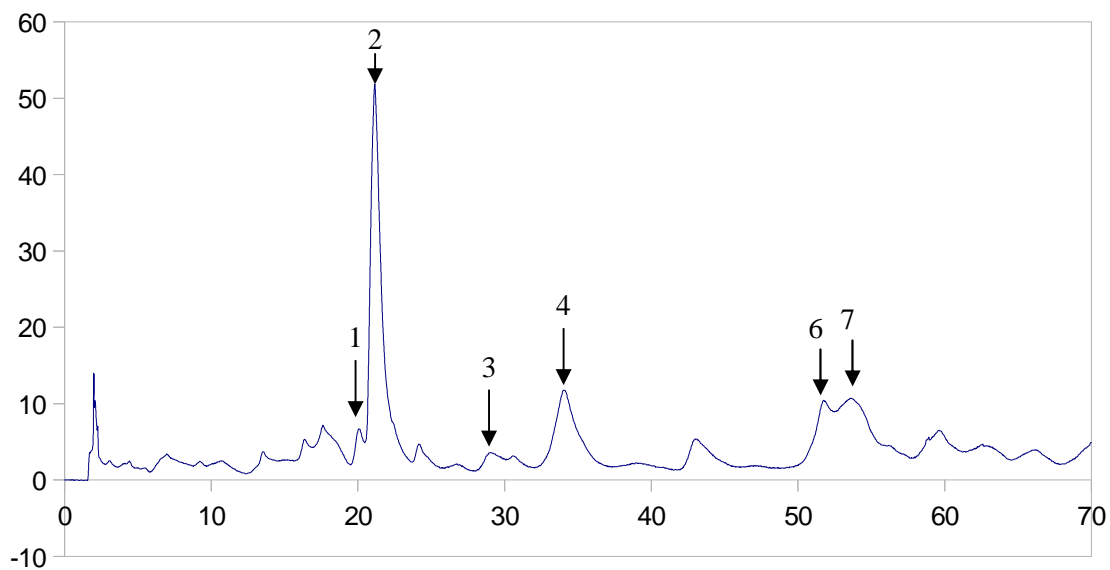


Figure 124. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P2 de jatropha à 280 nm.

1 : acide chlorogénique, 2: epicatechine, 3 : acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine, 7 : acide cinnamique.

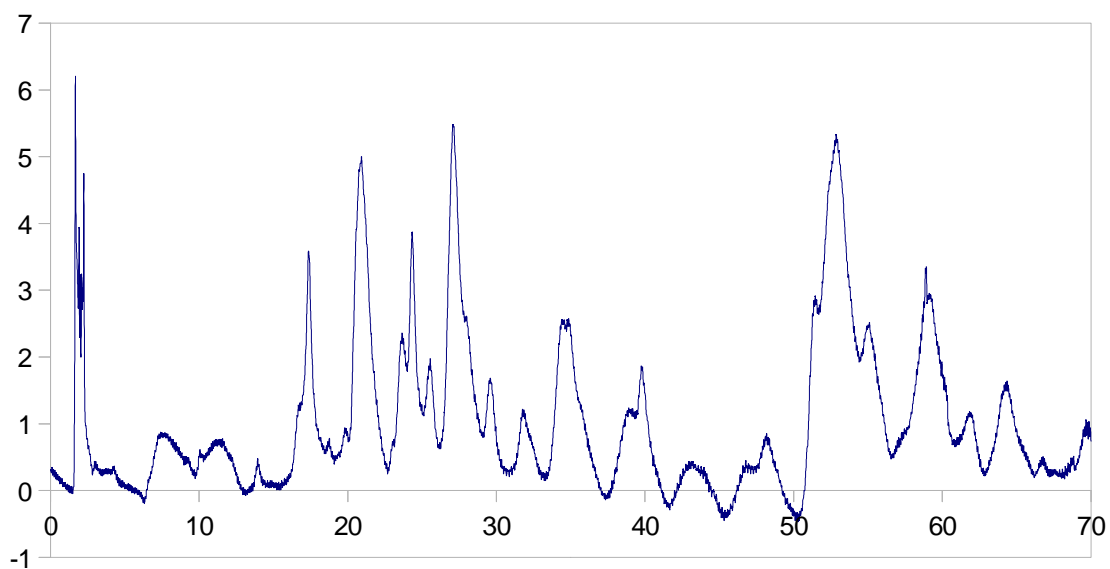


Figure 125. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P2 de jatropha à 320 nm.

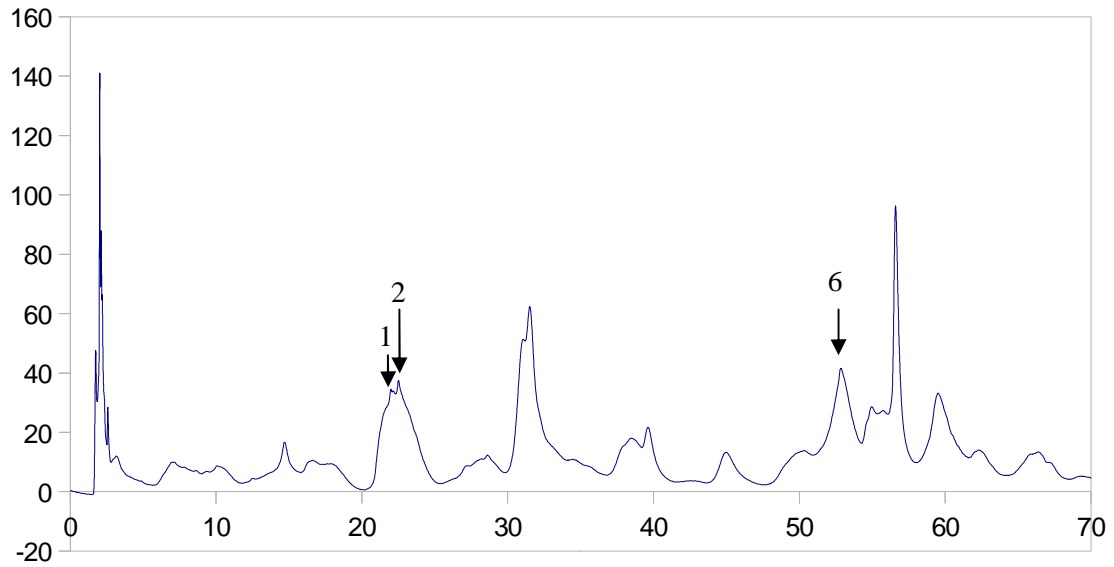


Figure 126. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P3 de jatropha à 280 nm.

1 : acide chlorogénique, 2 : épicatechine, 6 : naringine

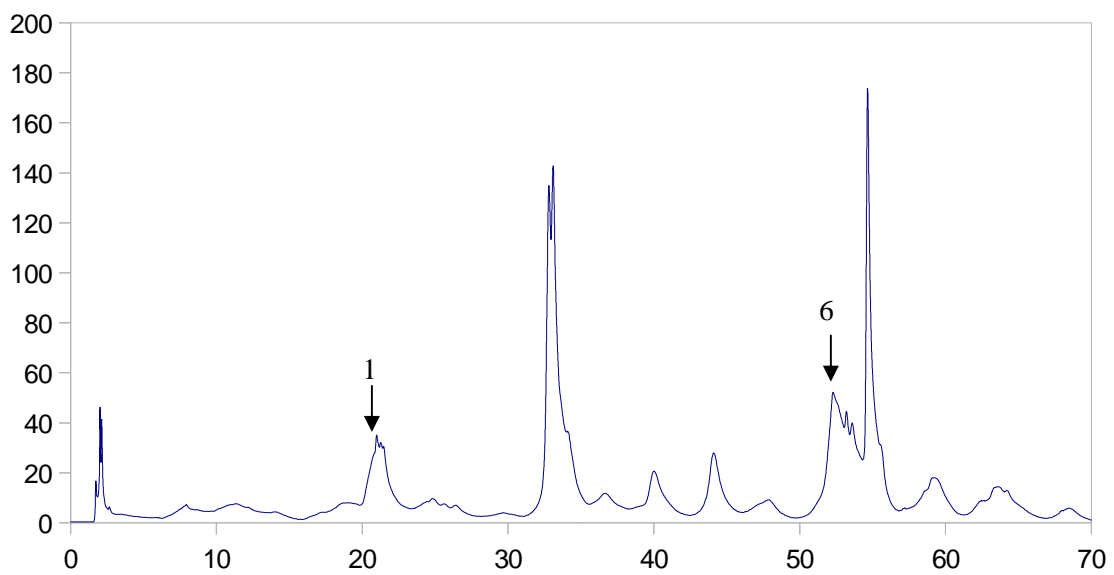


Figure 127. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P3 de jatropha à 320 nm.

1 : acide chlorogénique, 6 : naringine

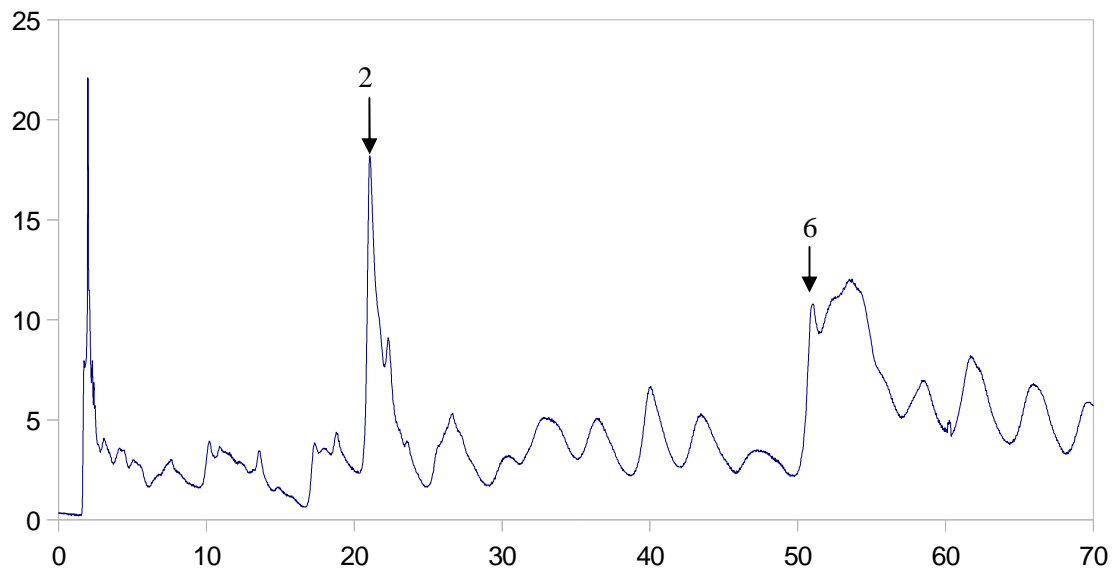


Figure 128. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P3 de jatropha à 280 nm.

2: epicatechine, 6: naringine.

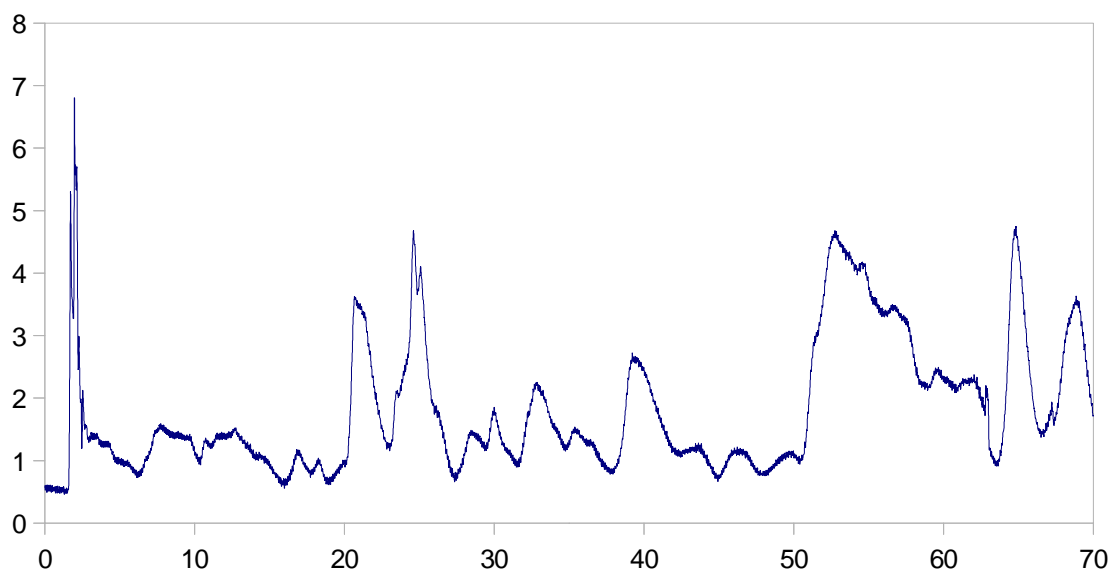


Figure 129. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P3 de jatropha à 320 nm.

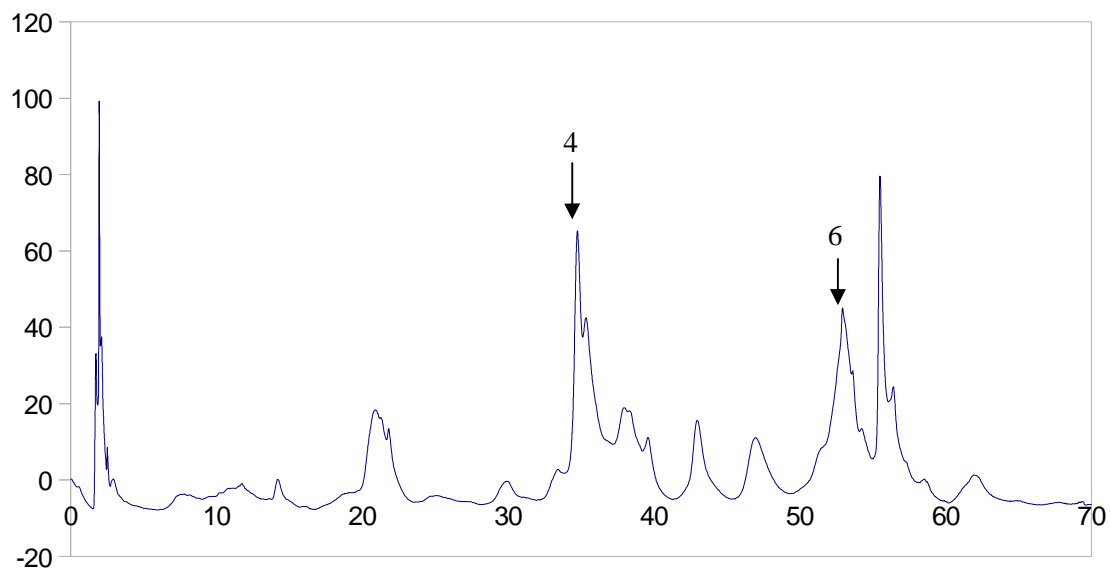


Figure 130. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P4 de jatropha à 280 nm.

4: rutine, 6: naringine.

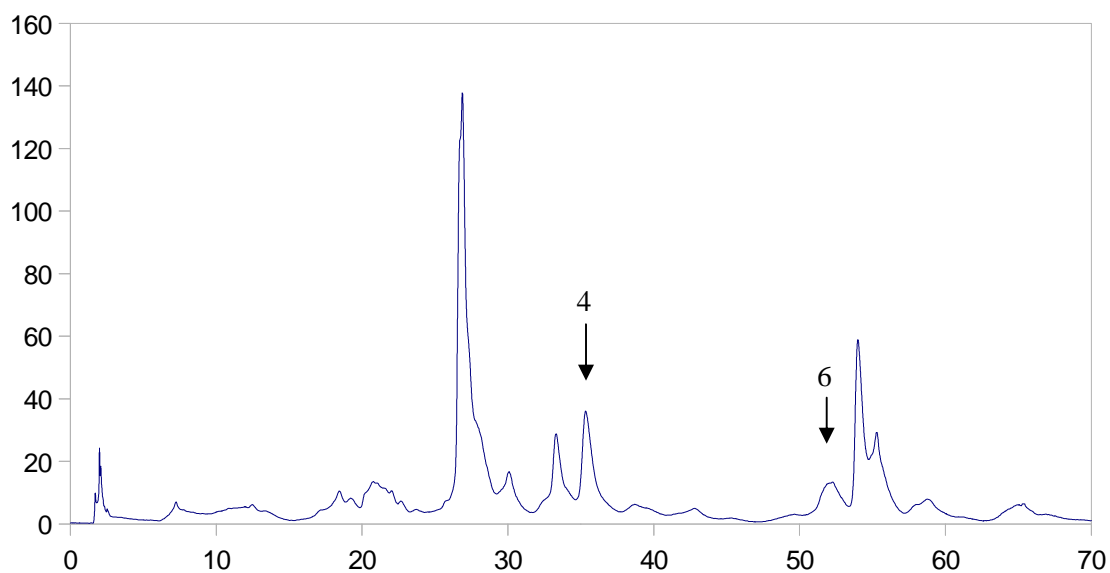


Figure 131. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P4 de jatropha à 320 nm.

4: rutine, 6: naringine.

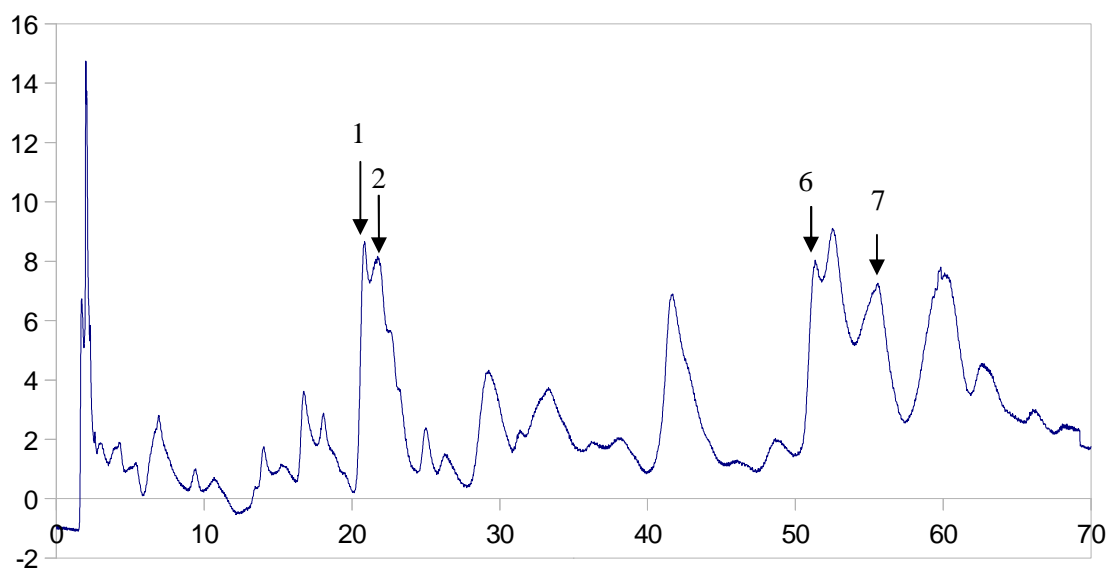


Figure 132. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P4 de jatropha à 280 nm.

1 : acide chlorogénique, 2 : épicatechine, 6: naringine, 7 : acide cinnamique.

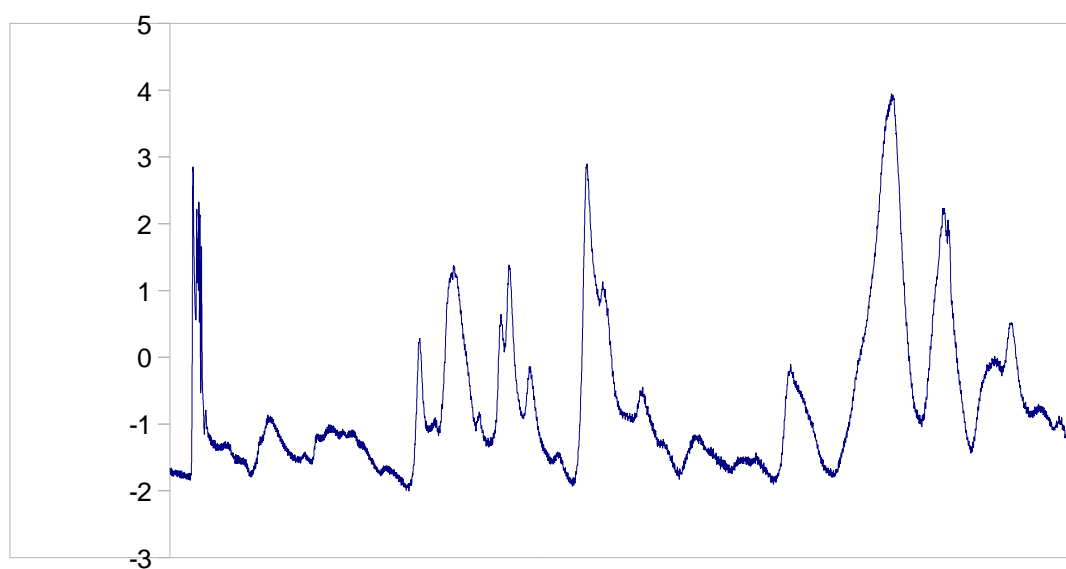


Figure 133. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P4 de jatropha à 320 nm.

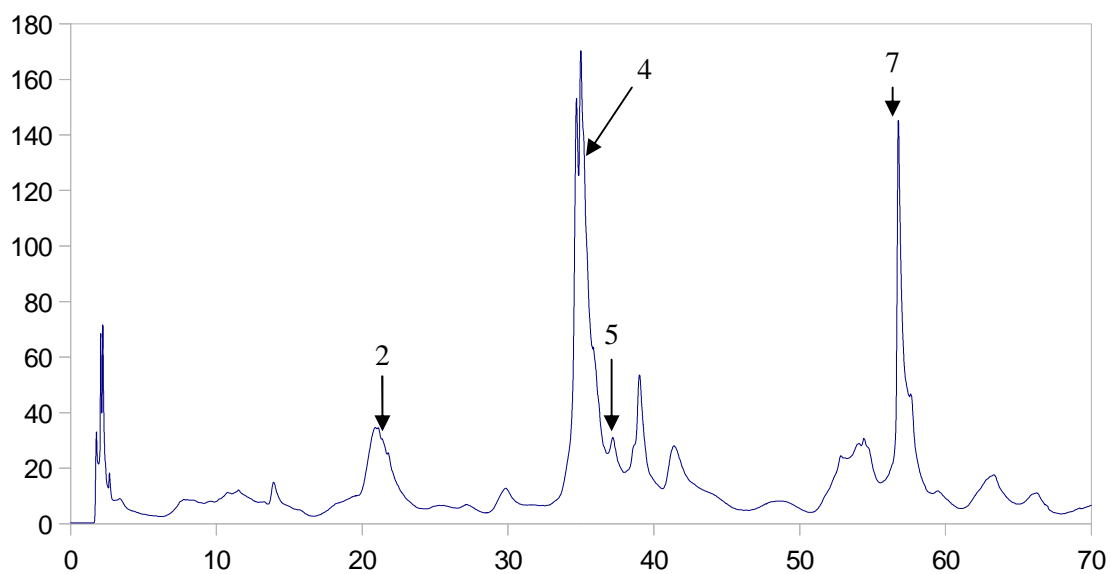


Figure 134. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P5 de jatropha à 280 nm.

2 : épicatechine, 4: rutine, 5 : vitexine, 7 : acide cinnamique.

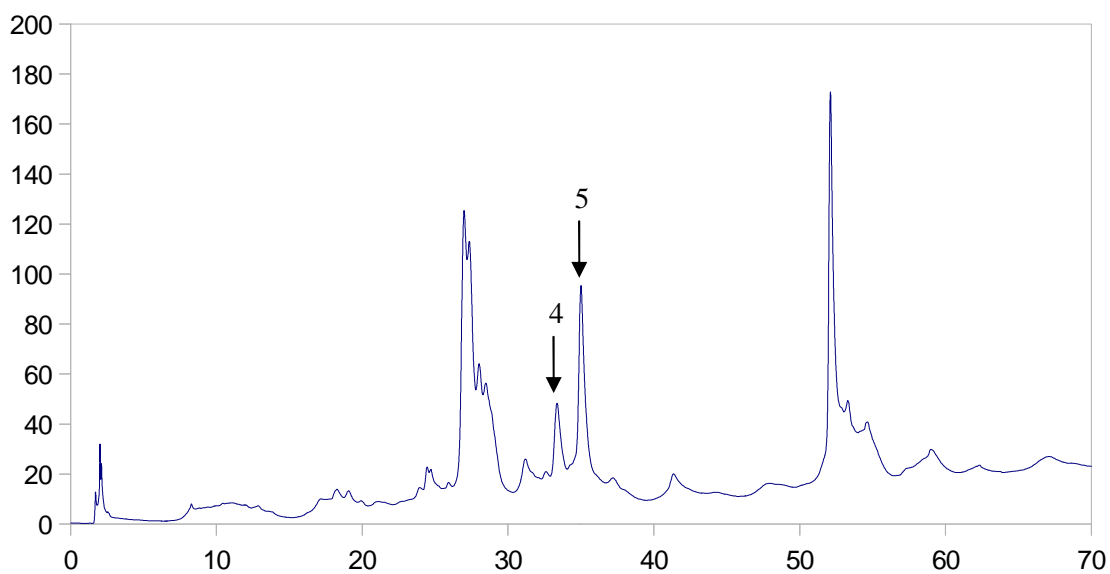


Figure 135. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P5 de jatropha à 320 nm.

4: rutine, 5 : vitexine

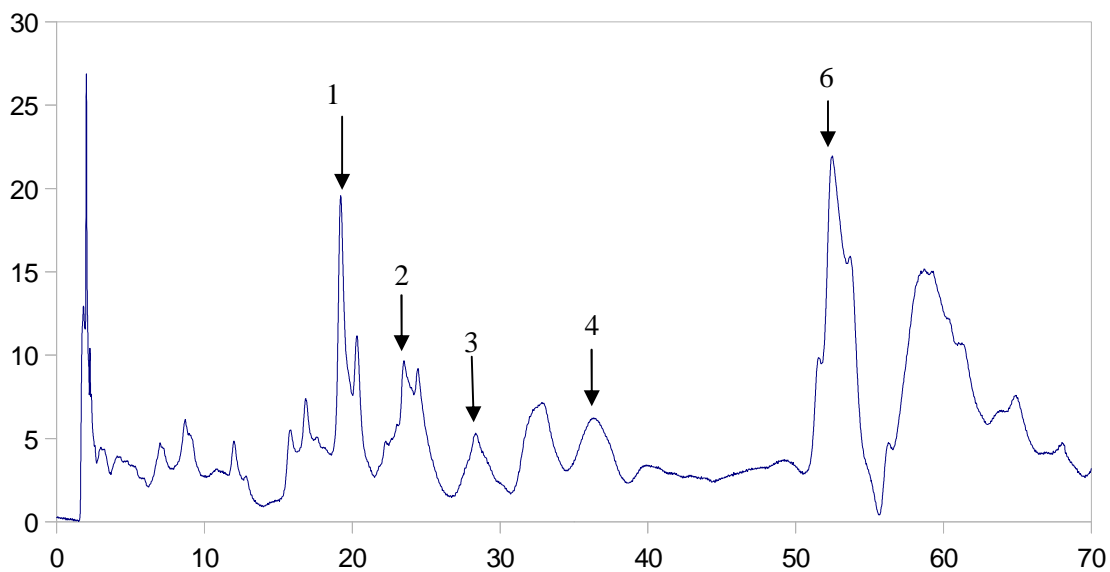


Figure 136. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P5 de jatropha à 280 nm

1: acide chlorogénique, 2: epicatechine, 3: acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine.

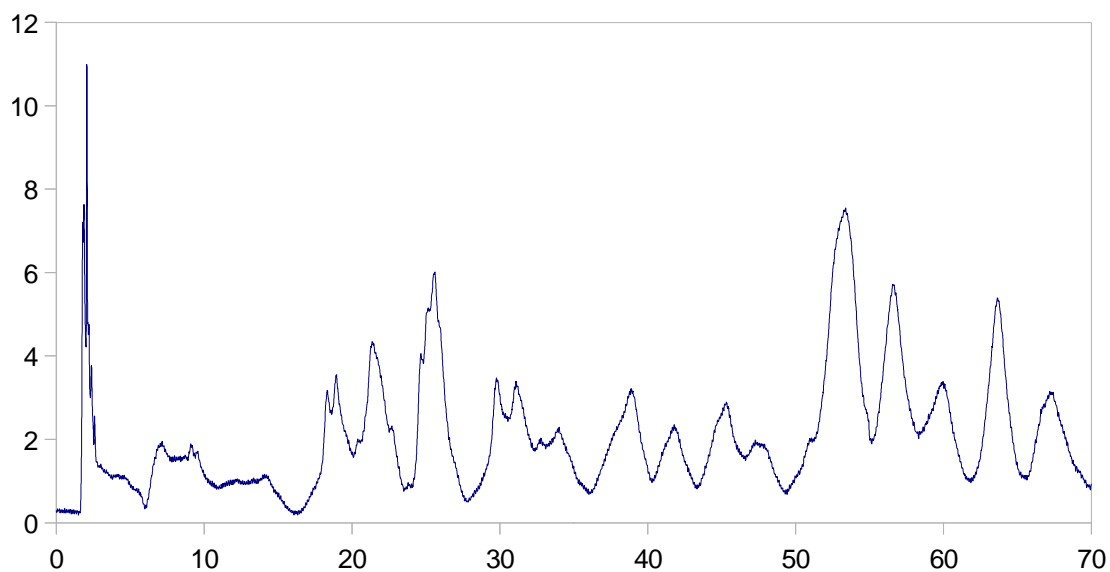


Figure 137. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P5 de jatropha à 320 nm

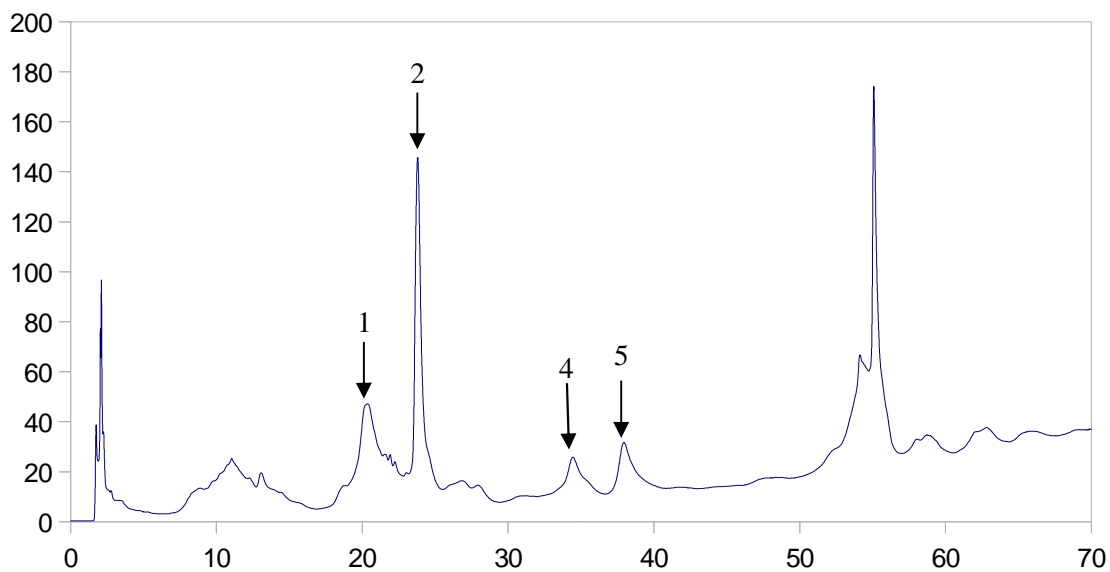


Figure 138. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P6 de jatropha à 280 nm

1 : acide chlorogénique, 2: epicatechine, 4: rutine, 5: vitexine.

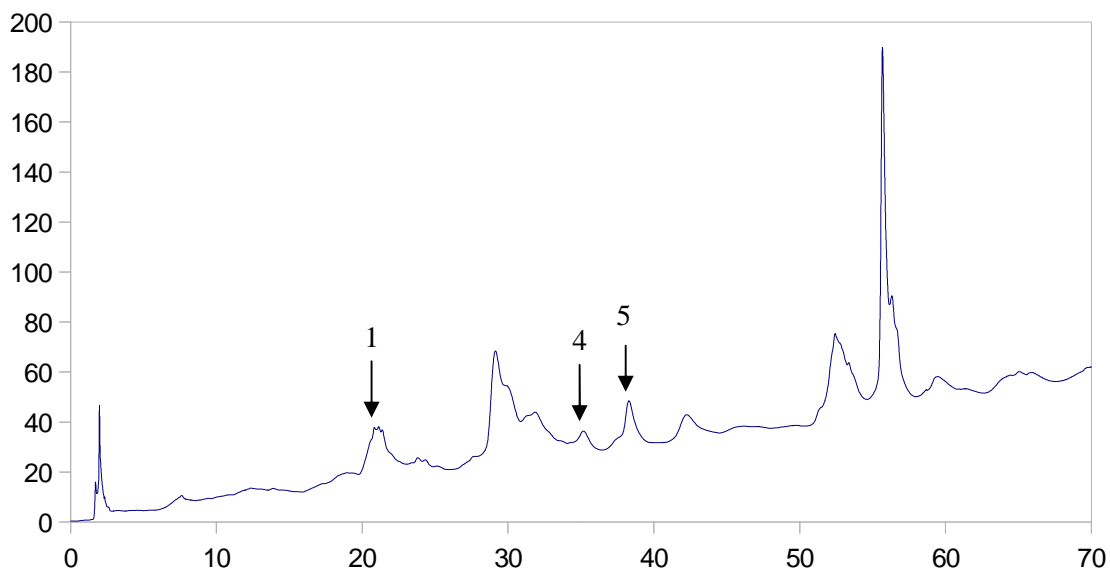


Figure 139. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P6 de jatropha à 320 nm

1 : acide chlorogénique, 4: rutine, 5: vitexine.

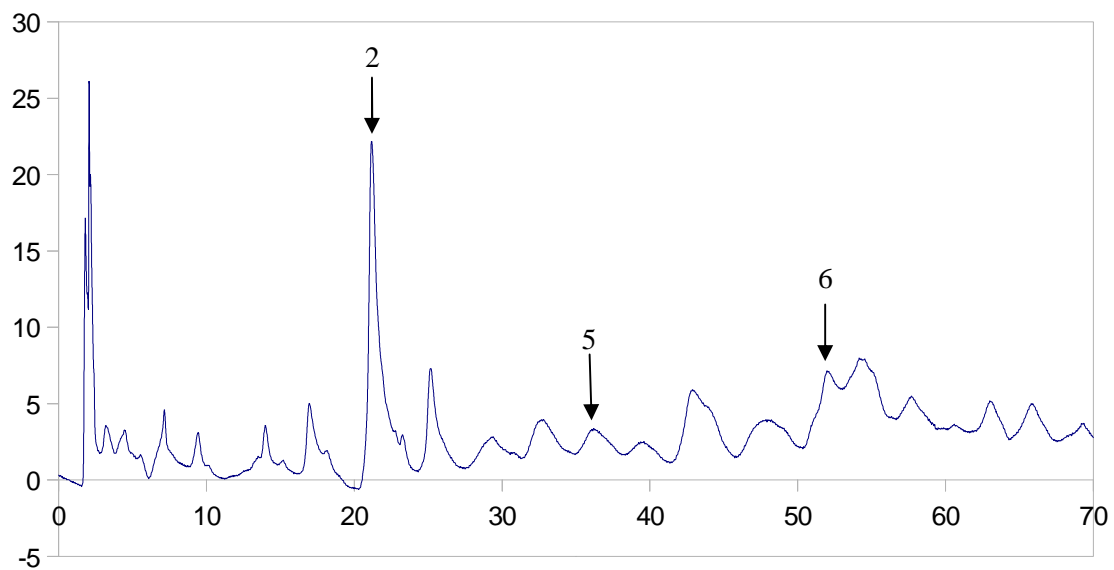


Figure 140. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P6 de jatropha à 280 nm
2 : epicatéchine, 5: vitexine, 6: naringine.

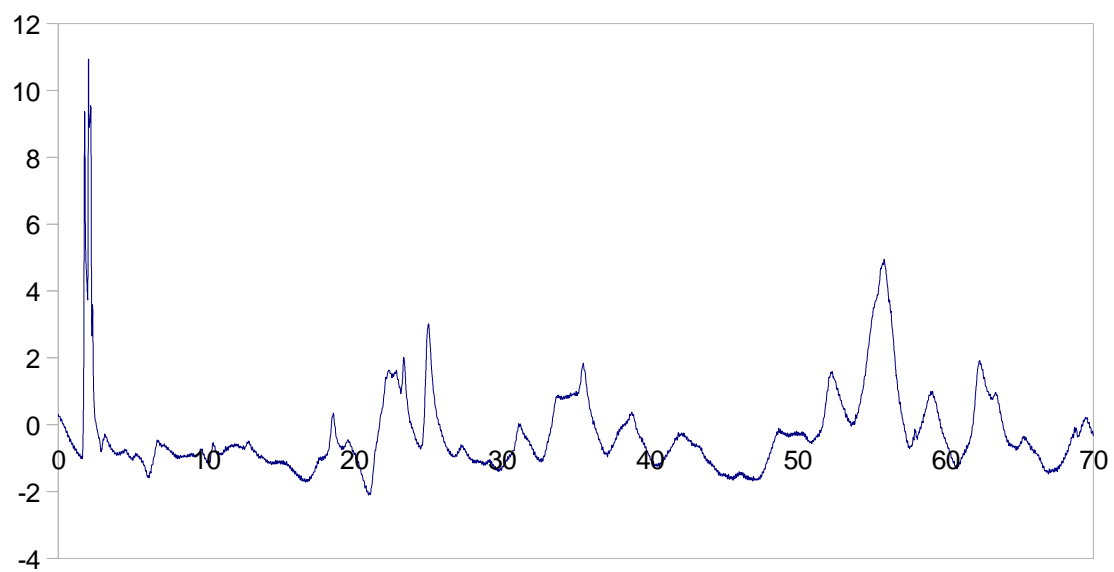


Figure 141. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P6 de jatropha à 320 nm

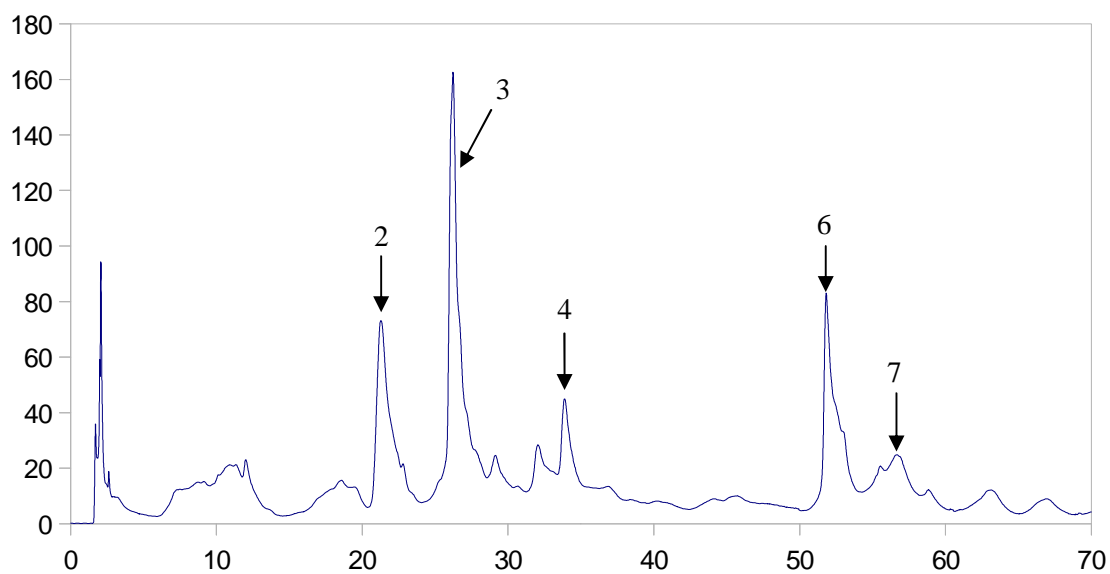


Figure 142. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P7 de jatropha à 280 nm
2: epicatechine, 3: acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine, 7 : acide cinnamique.

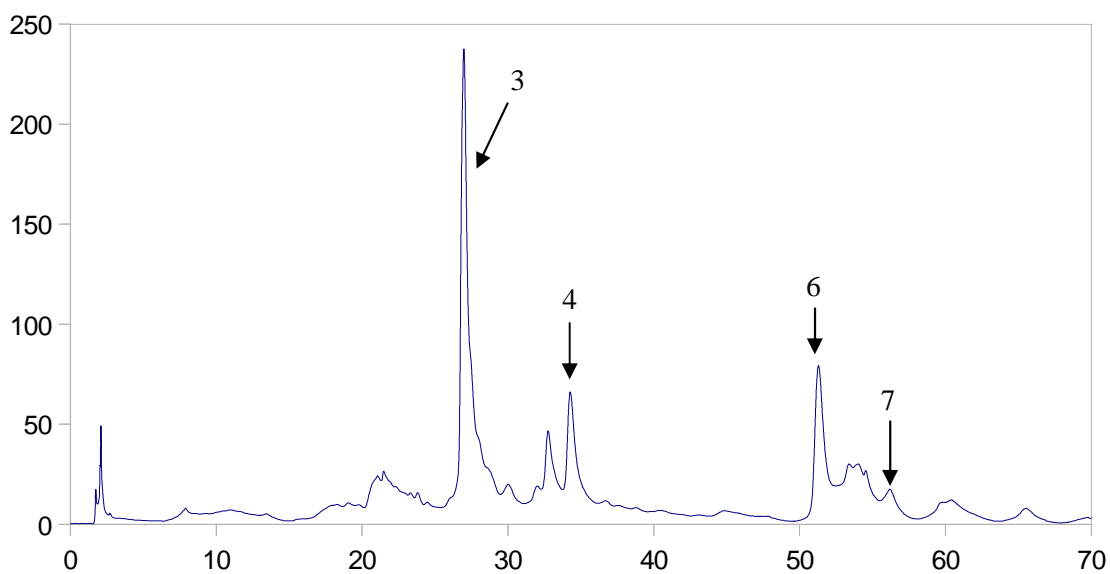


Figure 143. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P7 de jatropha à 320 nm
3: acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine, 7 : acide cinnamique.

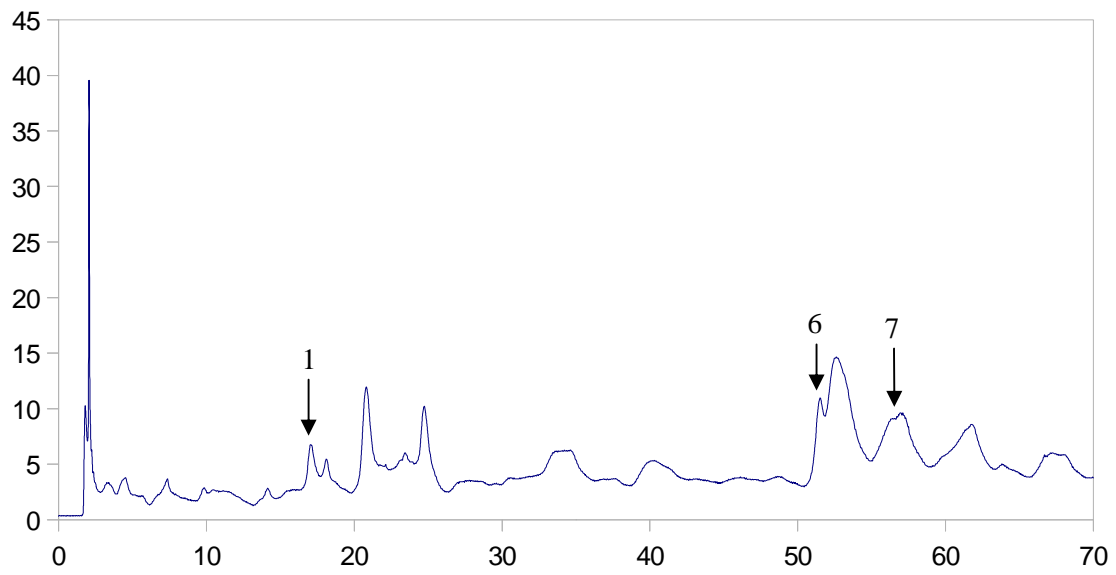


Figure 144. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P7 de jatropha à 280 nm
1 : acide chlorogénique, 6: naringine, 7 : acide cinnamique.

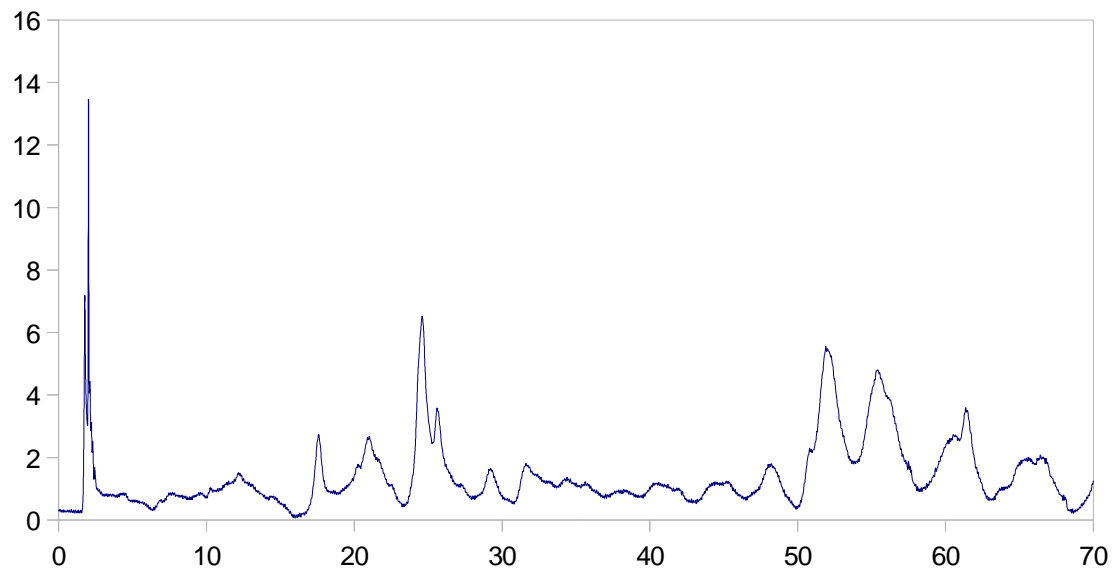


Figure 145. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P7 de jatropha à 320 nm

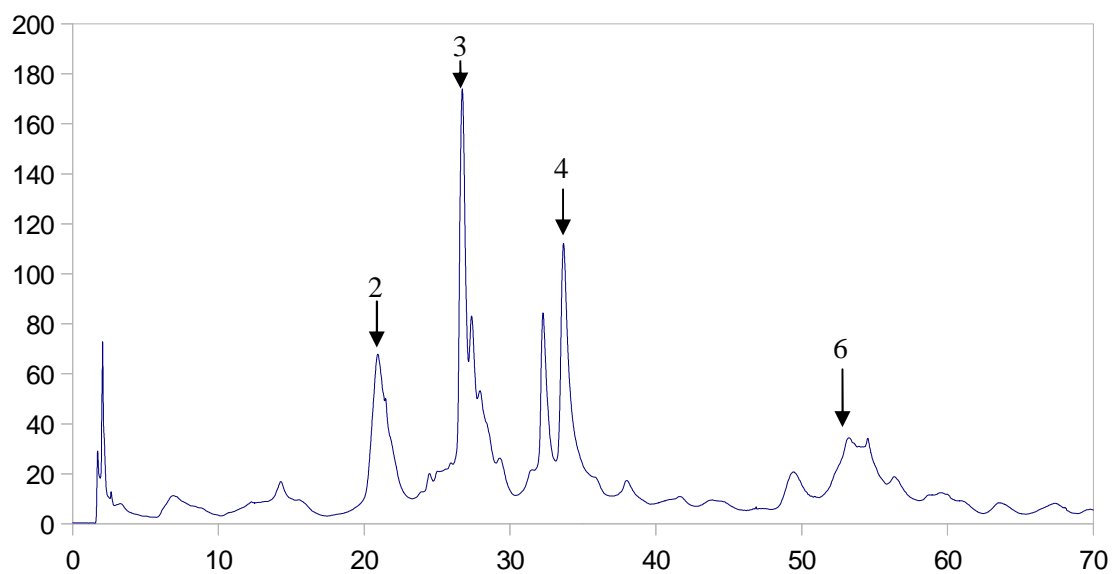


Figure 146. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P8 de jatropha à 280 nm

2 : épicatechine, 3: acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine.

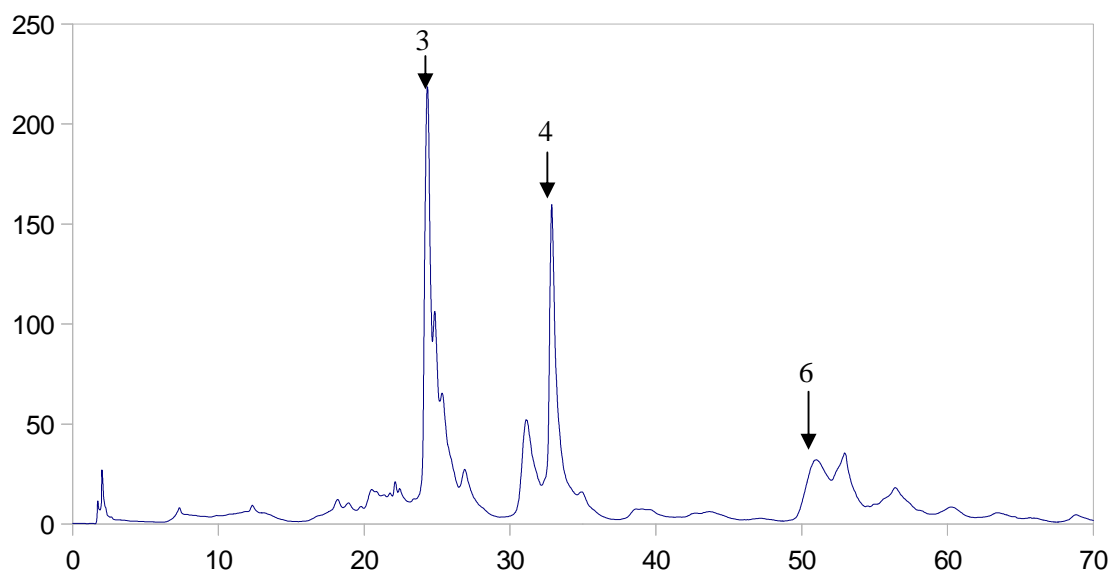


Figure 147. Chromatogramme de l'extrait des feuilles de la population P8 de jatropha à 320 nm

3: acide p-coumarique, 4: rutine, 6: naringine.

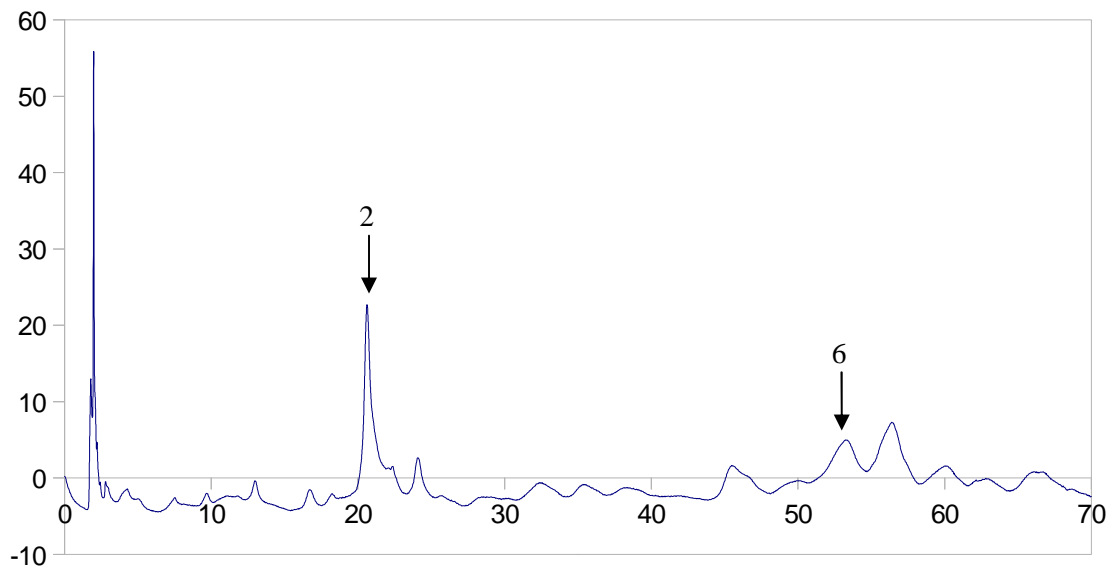


Figure 148. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P8 de jatropha à 280 nm
2 : épicatechine, 6: naringine

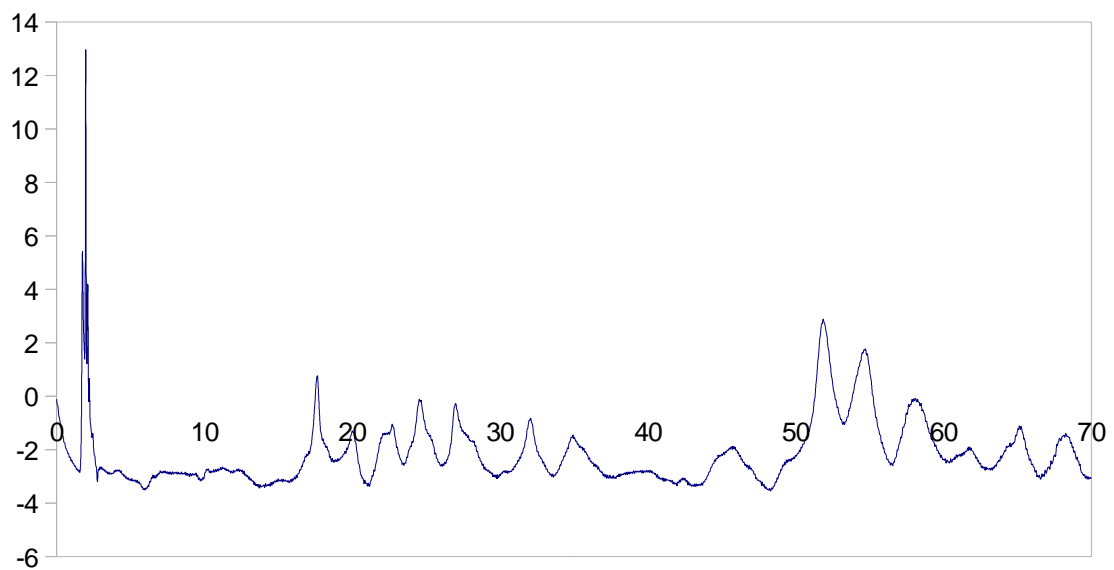


Figure 149. Chromatogramme de l'extrait des racines de la population P8 de jatropha à 320 nm

ANNEXE II

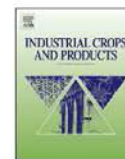
Liste de publications et de communications

Publications

- **Ghnimi W.**, Dicko A., Khouja M.L., El Ferchichi O.H., 2014. Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. *Industrial Crops and Products*, 56, pp 43-51 (IF = 3.208)
- Proceedings: Ghnimi W., El Ferchichi O.H, Khouja M.L., Dicko A., 2014.
*Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L.
*Phytochemical analysis, acetylcholinesterase inhibition, and antioxidant properties of eight populations of *Jatropha curcas* L.
Natural Products Chemistry & research, 2, p117.
- Article soumis : **Ghnimi W.**, El Ferchichi O.H., Khouja M.L., Dicko A., 2014. Phytochemical analysis of phenolic compounds, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of extracts from eight populations of *Jatropha curcas* L.

Communications

- **Ghnimi W.**, El Ferchichi O.H, Khouja M.L., Dicko A., Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. The 2nd International Conference and Exhibition on Pharmacognosy, Phytochemistry & Natural Products, Beijing, China, 2014.
- **Ghnimi W.**, El Ferchichi O.H, Khouja M.L., Dicko A., Phytochemical analysis, acetylcholinesterase inhibition, and antioxidant properties of eight populations of *Jatropha curcas* L. The 2nd International Conference and Exhibition on Pharmacognosy, Phytochemistry & Natural Products, Beijing, China, 2014.
- **Ghnimi W.**, El Ferchichi O.H, Dicko A., Khouja M.L., Etude phytochimique et pouvoir anti-radicalaire de huit populations de *Jatropha curcas* L. 5^{ème} Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales CIPAM, Zarzis, Tunisie, 2014.
- El Ferchichi O.H, **Ghnimi W.**, Fatnassi B., Khouja M.L., Evaluation de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles et des graines de deux Euphorbiaceae : *Jatropha curcas* L. et *Ricinus communis* L. sur des larves de moustiques Culicides : *Cluex pipiens*, 5^{ème} Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales CIPAM, Zarzis, Tunisie, 2014.
- **Ghnimi W.**, El Ferchichi O.H, Khouja M.L., Dicko A., Phytochemical composition and antioxidant activity of methanolic leaf extracts of some *Ricinus communis* L. populations, La Journée des Doctorants Lorrains en Sciences Exactes et Naturelles DocScilor, Pont-à-Mousson, France, 2013.
- **Ghnimi W.**, El Ferchichi O.H, Fatnassi B., Dicko A., Khouja M.L., Composition phytochimique et activité anti-oxydante des extraits méthanoliques des racines de quelques populations Tunisiennes de *Ricinus communis* L. Journées Nationales de Biologie de la Société des Sciences Naturelles de Tunisie SSNT, Hammamet, Tunisie, 2012.



Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L.



Ghnimi Wafa^{a,c,d,*}, Dicko Amadou^b, Khouja Mohamed Larbi^c, El Ferchichi Ouarda Hêla^d

^a Laboratory of Chemistry and Physics Multi-scale Approach of Complex Environments, Lorraine University, 1 Bd Arago, 57078 Metz, France

^b Unit Research Animal and Functionality of Animal Products, Lorraine University, 1 Bd Arago, 57078 Metz, France

^c National Institute for Research in Rural Engineering Water and Forestry, BP N10, Ariana 2080, Tunisia

^d Faculty of Sciences of Bizerta, Carthage University, Jarzouna, 7021 Bizerta, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2013

Received in revised form 23 February 2014

Accepted 24 February 2014

Available online 19 March 2014

Keywords:

Ricinus communis L.

Antioxidant activity

Larvicidal activity

RP-HPLC

GC-MS

Phenolic compounds and flavonoids

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the phytochemical composition of leaves and roots of five Tunisian populations of castor (*Ricinus communis* L.). Levels of total phenolic contents, total flavonoids, and condensed tannins of methanolic extracts were determined by UV-spectrophotometer. Phenolic compounds were identified and quantified by RP-HPLC (reverse phase HPLC). Gentisic acid, catechin, rutin, vanillic acid, vitexin, and gallic acid were detected. GC-MS analysis that uses the FAME (fatty acid methyl ester) method in castor oils revealed the existence of palmitic, stearic, oleic, gondoic, linoleic, and ricinoleic acids. The antioxidant properties of leaves, roots, and oils of castor using the DPPH radical scavenging capacity assays. The study showed a high antioxidant capacity which was expressed by a very low IC₅₀ values for the leaves extracts: Hammamet (0.65 µg/ml), Aouled Amer (2.42 µg/ml), Riadh Andalous (2.34 µg/ml), Nefza (3.91 µg/ml), and Khanguet Hajej (2.39 µg/ml).

Besides, we investigated the larvicidal activity of aqueous extracts of leaves and seeds against *Culex pipiens* L. larvae. Toxicity tests showed a mortality of 100% after 24 h of exposure. The LC₅₀ values for the seed extracts were low: Aouled Amer (570 mg/l), Nefza (603 mg/l), Khanguet Hajej (1260 mg/l), Riadh Andalous (1225 mg/l), and Hammamet (2140 mg/l).

This study permits to exhibit two positive correlation relationships: the first one between the total phenolic compounds, total flavonoid compounds, and the antioxidant activities of leaves and roots extracts, and the second one between the antioxidant activity and the larvicidal activity of the leaves extracts.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, it has been reported that natural antioxidants are very beneficial for health (Arnous et al., 2001). The importance of these antioxidants in protecting from coronary heart disease, cancer, and hypertension is rising by time (Robards et al., 1999; Wolfe and Liu, 2003).

Additionally, it has been showed that the antioxidant activity of these natural antioxidants is mainly related to phenolic compounds such as flavonoids, tannins, and phenolic acids (Chung et al., 1998).

Castor is traditionally used as a medicinal plant. It is the single species of the genus *Ricinus* (Polvêche, 1996). This plant is known as “kharouâa” in Arabic, “ricin” in French and “castor bean” in English (Ghrabi, 2005). It is an annual, perennial, and robust

bush whose height can vary from 3 to 12 m (Ho, 2006). Castor is widespread through tropics and warm temperature regions of the world (Polvêche, 1996; Ivan, 1998). In Tunisia, castor spontaneously grows on degraded lands (Neff and Scheid, 2008), it was introduced and naturalized from north to south of the country (Ghrabi, 2005). This species possesses various biological activities such as hepatoprotective (Visen et al., 1992), anti-inflammatory (Ilavarasan et al., 2005), diuretic (Nath et al., 2011), anti-cancer (Dethiollaz, 2003), anti-bacterial (Khan et al., 1978), insecticidal (Sharma et al., 1990), hypoglycemic (Poonam et al., 2008), and free radical scavenging (Ilavarasan et al., 2005).

Previously, it was reported that this plant is too rich in secondary metabolites especially phenolic compounds and alkaloids (Chauchan et al., 1998; Kang et al., 1985). The role of these compounds is shown in protecting against certain diseases because of their possible interaction with several enzymes and their antioxidant receptors (Macheix et al., 2005). Few studies have demonstrated that these phenolic compounds are isolated from different parts of castor bean plant. Then flavonoids have been

* Corresponding author at: Institute of Chemistry, Physics and Materials, 1 Bd Arago, 57078 Metz, France. Tel.: +33 3 87 31 54 31.

E-mail address: wafaghniemi@gmail.com (G. Wafa).

isolated from leaves such as kaempferol-3-O-beta-D-rutinoside and kaempferol-3-O-beta-D-xylopyranoide (Khafagy et al., 1979; Kang et al., 1985). Tannins and two alkaloids have been also extracted from castor leaves. These alkaloids are ricinine and N-demethylricinine (Kang et al., 1985; Khogali et al., 1992). Other study showed that the indol-3-acetic acid has been isolated from roots (Hall and Medlow, 1975).

In this paper, five Tunisian populations of castor, were studied. In fact, the missing data about phytochemical composition and biological activities of the Tunisian castor bean plant encouraged us to carry out this research. So, we have reported the identification and the quantification of total phenolic compounds, total flavonoid compounds, and condensed tannins from leaves and roots methanolic extracts. We have analyzed the oils composition using the Fatty Acid Methyl Ester method. Moreover, measurements of the antioxidant activity using the DPPH radical scavenging assays were determined for the oils and the methanolic extracts of leaves and roots. Besides, the larvicidal activity against the larvae of *Culex pipiens* L. was been evaluated for the aqueous extracts of leaves and seeds. For the first time, our study reveals two positive correlation relationships: the first one between the total phenolic compounds, total flavonoid compounds, and the antioxidant activities of leaves and roots extracts, and the second one between the antioxidant activity and the larvicidal activity of the leaves extracts.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The leaves, roots, and seeds of castor were collected from five different regions in Tunisia. For each population, the plant material was collected from 10 identified plants. The sources are distributed from the north to the center of the country and belonging to different bioclimatic zones ranging from humid to arid. These populations are Nefza (N), Riadh Andalous (RA), Khanguet Hajej (KH), Hammamet (H), and Aouled Amer (AA). All the castor plants were identified at the National Institute for Research in Rural Engineering Water and Forestry in Tunisia.

2.2. Animal material

The egg, larval, and adult stages of *C. pipiens* L. were obtained from the "Chotrana Lake" in Tunisia. They were identified by Dr. Bejaoui Mustafa in Faculty of Sciences of Bizerta. They were maintained at ambient rearing conditions in the National Institute for Research in Rural Engineering Water and Forestry. For the bioassays, only larval stage 4 was used and all tests were conducted at room temperature.

2.3. Chemicals

Folin-ciocalteu reagent was obtained from VWR international (France). Gallic acid, catechin, sodium nitrite (NaNO_2), and vanillin were obtained from Sigma Aldrich chemistry (France). Sodium carbonate (Na_2CO_3), aluminum chloride (AlCl_3), and sodium hydroxide (NaOH) from Across organics (Belgium).

2.4. Preparation of extracts

Leaves and roots were chopped, dried, and powdered. Plant extracts were prepared via the method used by Kim et al. (2002) and more recently by N'Guessan et al. (2011) with some modification. 10 g of fine powder were macerated in 100 ml of MeOH (80%). After 24 h, the extract was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure at 38 °C using a rotary evaporator.

The residue was dissolved in 100 ml of MeOH (50%) than the mixture was centrifuged for 20 min and was kept at +4 °C. Seeds were peeled, crushed then extracted with soxhlet method. For that, 20 g and 100 ml of *n*-hexane were used. After extraction, the solution was filtered and flowed by solvent removal in a rotary evaporator. The oil was kept at +4 °C for further analyses.

For the larvicidal evaluation, leaves were chopped, dried, and powdered. Seeds were peeled and crushed using a mortar until having a kind of paste. Then, 10 g of plant material was diluted in 100 ml of distilled water previously heated to boiling. The aqueous solution was placed under magnetic stirring for 30 min. Finally, the mixture was filtered using Whatman paper (3MM). The recovered filtrate represents an initial stock solution with 100 g per liter or a concentration equal to 10%.

2.4.1. Estimated quantity of dry residue

In order to give more significations to the quantities of plant material soluble in aqueous extracts, they were concentrated by evaporation in an oven heated to 40 °C for 48 h until obtained a dry residue which quantity is expressed in mg. This helps to express the lethal concentrations of soluble dry residues in water in mg/l.

2.5. Determination of total phenolics

Total phenolic compounds (TPC) were measured by the method used by Waterhouse (1999) with some modification. Briefly, 40 μl of samples were added to test tubes containing 3.16 ml of distilled water followed by addition of 200 μl of Folin-ciocalteu reagent (1 N) and 600 μl of sodium carbonate (Na_2CO_3 , 20%). Samples and blank were thoroughly mixed. After 40 min of incubation at room temperature, the absorbance was read at 725 nm. For the calibration curve, dilute solutions of gallic acid were used and total phenolics were expressed in terms of equivalent amounts of gallic acid per gram of dry matter (GAE/g DM). Spectrophotometer analyses were carried out with UV-visible spectrophotometer Cary 50 Scan.

2.6. Determination of total flavonoids

Total flavonoid compounds (TFC) were dosed by a colorimetric assay described by Zhishen et al. (1999) and more recently used by Chen and Chen (2011) with slightly modification. Then, 250 μl of sample was added to a volumetric flask containing 1 ml of distilled water. At time 0 min, 75 μl of sodium nitrite (NaNO_2 , 5%) was added to the flask. After 5 min, 75 μl of aluminum chloride (AlCl_3 , 10%) was added. After 6 min, 500 μl of sodium hydroxide (NaOH , 1 N) was added to the mixture. At this time the mixture was diluted with 2.5 ml of distilled water. The absorbance was directly read at 510 nm. For calibration curve, dilute solutions of catechin were used and total flavonoids were expressed as mg of catechin equivalent per gram of dry matter (CE/g DM).

2.7. Evaluation of condensed tannins

The condensed tannins (CT) were evaluated with vanillin method developed by Scalbert (1992) then Sun et al. (1998) and more recently by Schofield et al. (2001) with slightly modification using a UV-visible spectrophotometer. In brief, 5 g of each sample was lixiviated in *n*-hexane and the residue was dried at room temperature. Then, 0.5 g of dry residue was added to 15 ml of MeOH-HCl (1%). The tube was vortexed, placed in water bath at 35 °C for 20 min, centrifuged at $1532 \times g$ and finally filtered. 1 ml of filtrate was mixed with 3 ml of vanillin solution (formed by 4 g of vanillin and MeOH-HCl 8%). Samples and blanks were prepared in the same way. All tubes were incubated at 35 °C for 20 min. After this second incubation the absorbance was read at 500 nm. For the calibration curve, different concentrations of catechin were used

isolated from leaves such as kaempferol-3-O-beta-D-rutinoside and kaempferol-3-O-beta-D-xylopyranoide (Khafagy et al., 1979; Kang et al., 1985). Tannins and two alkaloids have been also extracted from castor leaves. These alkaloids are ricinine and N-demethylricinine (Kang et al., 1985; Khogali et al., 1992). Other study showed that the indol-3-acetic acid has been isolated from roots (Hall and Medlow, 1975).

In this paper, five Tunisian populations of castor, were studied. In fact, the missing data about phytochemical composition and biological activities of the Tunisian castor bean plant encouraged us to carry out this research. So, we have reported the identification and the quantification of total phenolic compounds, total flavonoid compounds, and condensed tannins from leaves and roots methanolic extracts. We have analyzed the oils composition using the Fatty Acid Methyl Ester method. Moreover, measurements of the antioxidant activity using the DPPH radical scavenging assays were determined for the oils and the methanolic extracts of leaves and roots. Besides, the larvicidal activity against the larvae of *Culex pipiens* L. was evaluated for the aqueous extracts of leaves and seeds. For the first time, our study reveals two positive correlation relationships: the first one between the total phenolic compounds, total flavonoid compounds, and the antioxidant activities of leaves and roots extracts, and the second one between the antioxidant activity and the larvicidal activity of the leaves extracts.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The leaves, roots, and seeds of castor were collected from five different regions in Tunisia. For each population, the plant material was collected from 10 identified plants. The sources are distributed from the north to the center of the country and belonging to different bioclimatic zones ranging from humid to arid. These populations are Nefza (N), Riadh Andalous (RA), Khanguet Hajej (KH), Hammamet (H), and Aouled Amer (AA). All the castor plants were identified at the National Institute for Research in Rural Engineering Water and Forestry in Tunisia.

2.2. Animal material

The egg, larval, and adult stages of *C. pipiens* L. were obtained from the "Chotrana Lake" in Tunisia. They were identified by Dr. Bejaoui Mustafa in Faculty of Sciences of Bizerta. They were maintained at ambient rearing conditions in the National Institute for Research in Rural Engineering Water and Forestry. For the bioassays, only larval stage 4 was used and all tests were conducted at room temperature.

2.3. Chemicals

Folin-ciocalteu reagent was obtained from VWR international (France). Gallic acid, catechin, sodium nitrite (NaNO_2), and vanillin were obtained from Sigma Aldrich chemistry (France). Sodium carbonate (Na_2CO_3), aluminum chloride (AlCl_3), and sodium hydroxide (NaOH) from Across organics (Belgium).

2.4. Preparation of extracts

Leaves and roots were chopped, dried, and powdered. Plant extracts were prepared via the method used by Kim et al. (2002) and more recently by N'Guessan et al. (2011) with some modification. 10 g of fine powder were macerated in 100 ml of MeOH (80%). After 24 h, the extract was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure at 38 °C using a rotary evaporator.

The residue was dissolved in 100 ml of MeOH (50%) than the mixture was centrifuged for 20 min and was kept at +4 °C. Seeds were peeled, crushed then extracted with soxhlet method. For that, 20 g and 100 ml of *n*-hexane were used. After extraction, the solution was filtered and flowed by solvent removal in a rotary evaporator. The oil was kept at +4 °C for further analyses.

For the larvicidal evaluation, leaves were chopped, dried, and powdered. Seeds were peeled and crushed using a mortar until having a kind of paste. Then, 10 g of plant material was diluted in 100 ml of distilled water previously heated to boiling. The aqueous solution was placed under magnetic stirring for 30 min. Finally, the mixture was filtered using Whatman paper (3MM). The recovered filtrate represents an initial stock solution with 100 g per liter or a concentration equal to 10%.

2.4.1. Estimated quantity of dry residue

In order to give more significations to the quantities of plant material soluble in aqueous extracts, they were concentrated by evaporation in an oven heated to 40 °C for 48 h until obtained a dry residue which quantity is expressed in mg. This helps to express the lethal concentrations of soluble dry residues in water in mg/l.

2.5. Determination of total phenolics

Total phenolic compounds (TPC) were measured by the method used by Waterhouse (1999) with some modification. Briefly, 40 μl of samples were added to test tubes containing 3.16 ml of distilled water followed by addition of 200 μl of Folin-ciocalteu reagent (1 N) and 600 μl of sodium carbonate (Na_2CO_3 , 20%). Samples and blank were thoroughly mixed. After 40 min of incubation at room temperature, the absorbance was read at 725 nm. For the calibration curve, dilute solutions of gallic acid were used and total phenolics were expressed in terms of equivalent amounts of gallic acid per gram of dry matter (GAE/g DM). Spectrophotometer analyses were carried out with UV-visible spectrophotometer Cary 50 Scan.

2.6. Determination of total flavonoids

Total flavonoid compounds (TFC) were dosed by a colorimetric assay described by Zhishen et al. (1999) and more recently used by Chen and Chen (2011) with slightly modification. Then, 250 μl of sample was added to a volumetric flask containing 1 ml of distilled water. At time 0 min, 75 μl of sodium nitrite (NaNO_2 , 5%) was added to the flask. After 5 min, 75 μl of aluminum chloride (AlCl_3 , 10%) was added. After 6 min, 500 μl of sodium hydroxide (NaOH , 1 N) was added to the mixture. At this time the mixture was diluted with 2.5 ml of distilled water. The absorbance was directly read at 510 nm. For calibration curve, dilute solutions of catechin were used and total flavonoids were expressed as mg of catechin equivalent per gram of dry matter (CE/g DM).

2.7. Evaluation of condensed tannins

The condensed tannins (CT) were evaluated with vanillin method developed by Scalbert (1992) then Sun et al. (1998) and more recently by Schofield et al. (2001) with slightly modification using a UV-visible spectrophotometer. In brief, 5 g of each sample was lixiviated in *n*-hexane and the residue was dried at room temperature. Then, 0.5 g of dry residue was added to 15 ml of MeOH-HCl (1%). The tube was vortexed, placed in water bath at 35 °C for 20 min, centrifuged at 1532 \times g and finally filtered. 1 ml of filtrate was mixed with 3 ml of vanillin solution (formed by 4 g of vanillin and MeOH-HCl 8%). Samples and blanks were prepared in the same way. All tubes were incubated at 35 °C for 20 min. After this second incubation the absorbance was read at 500 nm. For the calibration curve, different concentrations of catechin were used

and results were expressed as mg of catechin equivalent per gram of dry matter (CE/g DM).

2.8. RP-HPLC analysis

RP-HPLC analysis was performed according to the method described by Muanda et al. (2009) with some modifications using a Waters 600E coupled to a Waters 486 tunable absorbance detector equipped with a 20 µl sample loop injector. 2 g of dried plant material of castor were extracted with 40 ml of methanol (50%). Extracted samples were filtered using 0.45 µm PTFE filters. A gradient of three mobile phases was used, solvent A: 50 mM of ammonium phosphate (NH₄H₂PO₄) pH = 2.6 (adjusted with orthophosphoric acid H₃PO₄); solvent B: acetonitrile/solvent A (80:20) and solvent C: 200 mM orthophosphoric acid H₃PO₄ pH = 1.7. The gradient profile was changed as follows: 100% of A at 0 min, 95% of A and 5% of B at 4 min, 92% of A and 8% of B at 10 min, 90% of A and 10% of B at 15 min, 14% of B and 86% of C at 25 min, 20% of B and 80% of C at 45 min and 30% of B and 70% of C at 50 min. The column (reverse phase RP-C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm) was equilibrated for 15 min before injection. The flow rate was 1 ml/min and phenolic compounds were detected at 280 nm and at 320 nm. Phenolic standards used in this study were gallic acid, protocatechic acid, catechin, gentisic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, epicatechin, p-coumaric acid, rutin, vitexin, and naringin.

2.9. GC-MS analysis

The fatty acid methyl esters (FAME) were prepared according to the modified method described by PORIM (1995). 0.05 g of oil was dissolved in 1.8 ml of petroleum ether. Then 0.2 ml of sodium methylate was added and vortexed. Then the two layers were separated and 1 µl of the upper layer containing the FAME was injected on a 30 m capillary column (0.25 mm i.d × 0.25 µm film), of a Perkin Elmer-MS Clarus 500 GC-MS. The temperature was programmed to start at 150 °C for 2 min and increased to 300 °C after 30 min, the carrier gas was helium and the temperatures of injector and detector were held at 250 °C.

2.10. Evaluation of antioxidant capacity

The antioxidant capacity was evaluated using the DPPH radical scavenging assay. The method developed by Brand et al. (1995) with some modification was used. Briefly, 200 µM DPPH radical was dissolved in methanol. The mixture was kept away from light. Then, in a test tube, 2.90 ml of the DPPH solution was added to 100 µl of the plant extract. The solution was mixed then incubated in dark at 37 °C for exactly 20 min. After incubation, the absorbance was read at 517 nm. For the control, a solution constituted by 2.90 ml of DPPH solution and 100 µl of MeOH was used. Decrease in absorbance resulted by the addition of the test solution was measured. Then, the inhibition percentage was calculated by the following equation:

$$\% \text{Inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} 517 \text{ nm} - A_{\text{sample}} 517 \text{ nm})}{(A_{\text{control}} 517 \text{ nm})} \times 100$$

From a plot of concentrations and inhibition percentages, IC₅₀ values (IC₅₀ is the concentration of antioxidant required to reduce the original amount of radical by 50%) were determined. The DPPH radical scavenging activity can be also expressed as mg per gram dry weight of vitamin C equivalent (VCE). The radical stock solution was daily prepared. All these tests were replicated three times.

2.11. Evaluation of larvicidal activity

2.11.1. Toxicity tests

The larvicidal activity of aqueous leaves and seeds extracts was evaluated with the method used by Aouinty et al. (2006) with slightly modification. From the initial extract of seeds or leaves (stock solution 100 g/l or 10%) of castor and water of larvae sites, concentrations of 1%, 2%, and 5% were prepared. The tests are performed in 9 cm petri dishes diameter, each containing 20 ml of solution and 10 mosquito larvae of *C. pipiens* of the same caliber (L4 stage). The same number of larvae was placed in a witness petri dish containing 20 ml of larvae water breeding sites. The in vitro bioassays were conducted three times: Three repetitions are performed for each concentration as well as for the witness. The larvae were considered dead if they were immobile and unable to reach the water surface (Macedo et al., 1997). Mortality response was noted after exposure of 1, 2, 4, 6, 12, and 24 h, and the mortality percentage was reported from the average of three replicates.

2.11.2. Determination of lethal concentrations (LC₅₀)

The lethal concentration (LC₅₀) is defined as the concentration that causes 50% of mortality in the population of larvae studied, for a given time and for a single dose (Seveque, 2002). The estimates of LC₅₀ were obtained after 24 h, using the Trimmed Spearman-Kärber's method using the TSK program, ver. 1.5 (Hamilton et al., 1977).

2.12. Statistical analyses

All experiments were replicated at least three times. The statistical analysis was conducted using the SAS program and *P* < 0.05 was considered to be significant.

3. Results and discussion

3.1. Determination of TPC and TFC

Total phenolic compounds (TPC) and flavonoid compounds (TFC) of five Tunisian populations of castor were quantified using the UV-visible spectrophotometric apparatus. Results reported in Figs. 1 and 2 show that the distribution of TPC and TFC in castor varied according to the plant parts.

The total phenolic contents expressed as mg GAE/g of dry matter of the leaves extracts was ranged from 623.7 mg (Hammamet) to 174.25 mg (Nefza). Phenolic concentrations of the other populations were as follows: 533.45 mg (Riadh Andalou), 493.6 mg (Khanguet Hajej), and 487.5 mg (Aouled Amer). For the roots extracts, analysis showed that TPC were 502.28 mg (Hammamet), 232.01 mg (Riadh Andalou), 146.85 mg (Khanguet Hajej), 252.60 mg (Aouled Amer), and 218.66 mg (Nefza).

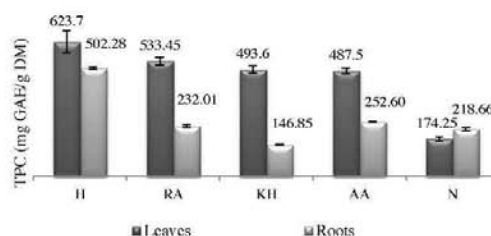


Fig. 1. Total phenolic compounds (TPC) of leaves and roots of five Tunisian populations of castor: Nefza (N), Riadh Andalou (RA), Khanguet Hajej (KH), Hammamet (H), and Aouled Amer (AA).

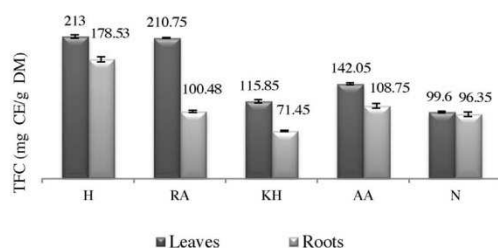


Fig. 2. Total flavonoid compounds (TFC) of leaves and roots of five Tunisian populations of castor: Nefza (N), Riadh Andalous (RA), Khanguet Hajej (KH), Hammamet (H), and Aouled Amer (AA).

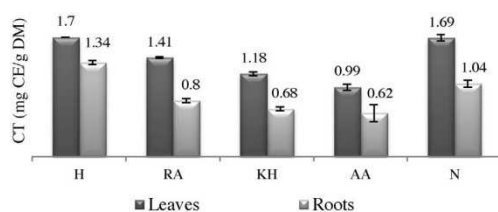


Fig. 3. Condensed tannin contents (CT) of leaves and roots of five Tunisian populations of castor: Nefza (N), Riadh Andalous (RA), Khanguet Hajej (KH), Hammamet (H), and Aouled Amer (AA).

As regards the total flavonoids contents of leaves, Hammamet showed the highest concentration with 213 mg CE/g DM. This was followed by Riadh Andalous (210.75 mg CE/g DM), Aouled Amer (142.05 mg CE/g DM), Khanguet Hajej (115.85 mg CE/g DM), and Nefza (99.6 mg CE/g DM).

For the roots, contents were ranged from 178.53 mg CE/g DM (Hammamet) to 71.45 mg CE/g DM (Khanguet Hajej). Other concentrations were as follows: Riadh Andalous (100.48 mg CE/g DM), Aouled Amer (108.75 mg CE/g DM), and Nefza (96.35 mg CE/g DM).

It is appear that the content of TPC and TFC were higher in the leaves than in the roots for the tested populations except Nefza population where TPC were more concentrated in the roots. The statistical analysis showed that, for the leaves and the roots extracts, the difference between populations is significant for all studied compounds ($P < 0.0001$).

Table 1
Phenolic compounds identified in the castor leaves of five Tunisian populations and their concentrations.

RT (min)	Compound name	Leaves				
		AA μg/ml	H	KH	RA	N
1	Gallic acid	74.7 ± 0.2	38.5 ± 0.4	55.3 ± 0.2	66.4 ± 3	34.4 ± 0.2
2	Protocatechuic acid	56.5 ± 0.3	10.6 ± 0.08	29.95 ± 0.62	32.7 ± 0.1	18.7 ± 0.07
3	Gentisic acid	1102.4 ± 0.1	1092.6 ± 0.2	574.2 ± 0.03	1001.6 ± 0.07	400.2 ± 0.1
4	Catechin	466.1 ± 0.05	83.3 ± 0.2	572.8 ± 0.1	23.5 ± 0.1	35.3 ± 0.07
5	Chlorogenic acid	–	12.3 ± 0.07	–	103.3 ± 0.1	–
6	Vanillic acid	417 ± 0.1	15.5 ± 0.1	–	229.1 ± 0.2	172.2 ± 0.14
7	Caffeic acid	–	20.2 ± 0.2	9.22 ± 0.67	–	19.4 ± 0.3
8	Epicatechin	185.6 ± 0.2	53.3 ± 0.1	75.3 ± 0.07	385.7 ± 0.07	82.3 ± 0.19
9	p-Coumaric acid	–	13.5 ± 0.07	4.7 ± 0.1	–	–
10	Rutin	422.5 ± 0.2	329.5 ± 0.1	342.6 ± 0.1	380.4 ± 0.2	72.8 ± 0.04
11	Vitexin	100.3 ± 0.3	20.2 ± 0.3	–	85.2 ± 0.1	–
12	Naringin	24.7 ± 0.1	19.2 ± 0.1	83.7 ± 0.2	13.1 ± 0.2	65.5 ± 0.07

The difference between populations is significant for all the identified parameters ($P < 0.0001$).

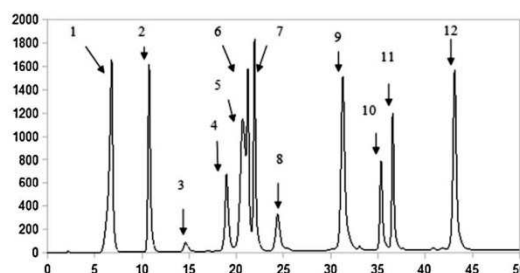


Fig. 4. Chromatogram profile of the used standards 280 nm. 1: gallic acid, 2: protocatechuic acid, 3: gentisic acid, 4: catechin, 5: chlorogenic acid, 6: vanillic acid, 7: caffeic acid, 8: epicatechin, 9: p-coumaric acid, 10: rutin, 11: vitexin, 12: naringin.

3.2. Evaluation of condensed tannins

Fig. 3 presents the values of condensed tannins content in leaves and roots of five Tunisian populations of castor. Then in leaves, condensed tannins content ranged from 1.7 mg CE/g DM (Hammamet) to 0.99 mg CE/g DM (Aouled Amer). Other values were: 1.69 mg CE/g DM (Nefza), 1.41 mg CE/g DM (Riadh Andalous), and 1.18 mg CE/g DM (Khanguet Hajej).

In roots, the results showed that the highest concentration of condensed tannins was 1.34 mg CE/g DM for Hammamet followed by Nefza (1.04 mg CE/g DM), Riadh Andalous (0.8 mg CE/g DM), Khanguet Hajej (0.68 mg CE/g DM) then Aouled Amer with (0.62 mg CE/g DM).

Results showed that the concentration of CT was more important in the leaves than in the roots. For both, leaves and roots, the statistical analysis showed that the difference between populations is significant for this parameter ($P < 0.0001$).

3.3. HPLC analysis

RP-HPLC results were collected in Tables 1 and 2. Phenolic compounds were identified by matching their retention time to the corresponding standard one. Figs. 4 and 5 show the chromatogram profiles and the concentrations of the used standards in the solution at 280 nm and at 320 nm respectively. The quantification of the compounds was determined by comparing its surface with that of the corresponding standard having a known concentration.

Analysis of leaves extracts revealed that the gentisic acid is the most important phenolic compound; levels are ranged from 400.25 μg/ml (Nefza) to 1102.4 μg/ml (Aouled Amer). The Aouled Amer population showed high levels of catechin (466.1 μg/ml),

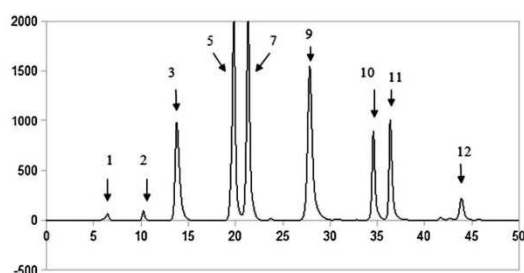


Fig. 5. Chromatogram profile of the used standards 320 nm. 1: gallic acid, 2: protocatechuic acid, 3: gentisic acid, 5: chlorogenic acid, 7: caffeic acid, 9: p-coumaric acid, 10: rutin, 11: vitexin, 12: naringin.

rutin (422.5 $\mu\text{g/ml}$), and vanillic acid (417 $\mu\text{g/ml}$). The Hammamet population is the richest one in phenolic compounds; it contains all the phenolic standards. The Khanguet Hajej population showed high levels of catechin (572.8 $\mu\text{g/ml}$) and rutin (342.6 $\mu\text{g/ml}$). Riadh Andalou population revealed high levels of epicatechin (385.7 $\mu\text{g/ml}$) and rutin (380.4 $\mu\text{g/ml}$). Nefza population showed a high level of vanillic acid (172.2 $\mu\text{g/ml}$).

Our results are in agreement with those reported in the literature that confirmed the isolation of phenolic compounds from the castor leaves. These phenolic compounds are gallic acid, quercetin, gentisic acid, rutin, epicatechin, and ellagic acid (Singh and Chauhan, 2009; Ghosh et al., 2013). Our study revealed that there are other phenolic compounds such as catechin, vitexin, naringin, and protocatechuic acid which are not yet identified in the recent literature.

The roots extracts analysis showed that leaves contain more phenolic compounds. For Aouled Amer population, the vanillic acid is the major compound identified (243.5 $\mu\text{g/ml}$). Hammamet and Riadh Andalou populations showed high level of gentisic acid with

717.1 $\mu\text{g/ml}$ and 264.2 $\mu\text{g/ml}$ respectively. For Khanguet Hajej population the most important compound is the rutin (165.4 $\mu\text{g/ml}$) whereas the catechin (281.8 $\mu\text{g/ml}$) is the most important one identified from Nefza root extract.

3.4. GC-MS analysis

These results show three main groups of fatty acids: the poly-unsaturated omega-6,9 such as the linoleic acid, the mono-unsaturated omega-9 such as the ricinoleic, oleic, and 11-eicosenoic acids and the saturated one such as the palmitic and stearic acids.

Analyses revealed that the ricinoleic acid was the major product in the oil composition, since its corresponding methyl ester presents the higher concentration (78.45–85.9%) followed by linoleic and oleic methyl esters in lower concentrations (5.75–7.95% and 4.5–6.5% respectively). Others methyl esters were identified in very low concentration.

The oils compositions of the five populations of castor were different for only one constituent which was the ricinoleic acid ($P=0.0348$). For the other acids levels, the studied populations were similar and no major differences appear between them.

Our results are in accord with others GC studies of castor oil which report that the ricinoleic acid is the major constituent (Kang et al., 1985). Our results are also in good agreement with the findings of Da Silva et al. (2009) who reported that with the ricinoleic acid there are others fatty acids identified in very low concentrations such as linoleic, oleic, stearic, and palmitic acids. Comparing to other studies, our one shows for the first time the presence of 11-eicosenoic acid (Table 3).

3.5. Antioxidant activity

The antioxidant activity of leaves extracts, root extracts, and castor oil of the five populations of castor was tested by the

Table 2
Phenolic compounds identified in the castor roots of five Tunisian populations and their concentrations.

RT (min)	Compound name	Roots				
		AA $\mu\text{g/ml}$	H	KH	RA	N
1	Gallic acid	14.3 \pm 0.19	23.6 \pm 0.1	21.1 \pm 0.09	16.08 \pm 0.02	44.6 \pm 0.2
2	Protocatechuic acid	85.8 \pm 0.2	5.6 \pm 0.1	–	5.7 \pm 0.07	–
3	Gentisic acid	193.4 \pm 0.2	717.1 \pm 0.2	70.8 \pm 0.14	264.2 \pm 0.3	60.4 \pm 0.3
4	Catechin	54.6 \pm 0.4	116.3 \pm 0.2	6.5 \pm 0.2	–	281.8 \pm 0.15
5	Chlorogenic acid	16.2 \pm 0.3	–	10.93 \pm 0.8	–	–
6	Vanillic acid	243.6 \pm 0.1	377.75 \pm 1.2	–	39.4 \pm 0.3	189.4 \pm 0.2
7	Caffeic acid	–	–	–	–	–
8	Epicatechin	187.4 \pm 0.07	397.6 \pm 0.21	–	120.08 \pm 0.07	45.05 \pm 0.07
9	p-Coumaric acid	–	5.6 \pm 0.4	–	–	–
10	Rutin	81.3 \pm 0.2	95.8 \pm 0.12	165.4 \pm 0.04	222.1 \pm 0.07	50.2 \pm 0.17
11	Vitexin	–	158.4 \pm 0.1	15.8 \pm 0.1	–	43.4 \pm 0.1
12	Naringin	–	9.14 \pm 0.1	–	–	–

The difference between populations is significant for all the identified parameters ($P < 0.0001$).

Table 3
Fatty acids identified in castor oils of five Tunisian populations.

Rt (min)	Compound name	Percentage in oils				
		AA	H	KH	RA	N
1	Methyl palmitate	2.05 \pm 0.4	1.55 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2	1.75 \pm 0.3	1.45 \pm 0.07
2	13-Hexyloxacyclotridec-10-en-2-one	2.1 \pm 0.2	0.45 \pm 0.07	0.9 \pm 0.2	0.55 \pm 0.07	–
3	Methyl linoleate	7.9 \pm 1.6	6.05 \pm 0.4	7.95 \pm 0.7	7.05 \pm 0.7	5.75 \pm 0.07
4	Methyl oleate	6.5 \pm 1.4	5 \pm 0.4	6.35 \pm 0.6	5.25 \pm 0.4	4.5 \pm 0.07
5	Methyl stearate	2.2 \pm 0.4	1.85 \pm 0.2	2.25 \pm 0.2	2.05 \pm 0.2	1.75 \pm 0.07
6	11-eicosenoic acid methyl ester	0.75 \pm 0.07	0.5 \pm 0	0.7 \pm 0	0.6 \pm 0	0.55 \pm 0.07
7	Methyl ricinoleate	78.45 \pm 3.8	84.6 \pm 1.2	79.75 \pm 2.1	82.75 \pm 1.9	85.9 \pm 0.02

Table 4
Antioxidant activity of castor oils of five Tunisian populations.

Test DPPH of castor oils	
Population	IC ₅₀ mg/ml
Hammamet	0.587 ± 0.08
Aouled Amer	0.788 ± 0.02
Nefza	0.773 ± 0.04
Riadh Andalous	0.984 ± 0.08
Khanguet Hajej	0.74 ± 0.12

The difference between populations is significant for IC₅₀ ($P < 0.0001$).

means of DPPH radical scavenging assays. Results were reported in Tables 4 and 5. The values expressed in the tables were mean ± SD of three replicates. The IC₅₀ is the concentration of antioxidant required to reduce the original amount of radical by 50%.

This test confirmed the castor efficiency as antioxidant. This efficiency was shown by low IC₅₀ values. Results showed that the difference between samples, come from different parts of the five populations, is significant. Results showed that Hammamet population possessed the most powerful antioxidant activity when compared to the others populations: IC₅₀ = 0.65 μg/ml for leaves extract, IC₅₀ = 1.03 μg/ml for roots extract and IC₅₀ = 0.587 mg/ml for the oil. The leaves extract of Nefza population and the roots extract of the Khanguet Hajej population were the less effective against DPPH when compared to other leaves and roots extracts, with IC₅₀ values respectively 3.91 μg/ml and 5.78 μg/ml. The present study showed that the castor bean oil of Riadh Andalous population was the less active one when compared to other tested oils (IC₅₀ = 0.984).

Comparing to other studies reported in the literature, our results demonstrate that, the methanolic leaves and roots extracts of the Tunisian castor were more effective than the Indian one. In fact, for the Tunisian roots extracts, the IC₅₀ values were ranged between 1.03 and 5.78 μg/ml, while the IC₅₀ value of the Indian roots extract reported by Ilavarasan et al. (2005) was 12 μg/ml.

Another study conducted by Singh and Chauhan (2009) showed that the IC₅₀ value of the Indian leaves extract was 4.66 μg/ml. Comparing to our results, all the Tunisian leaves extracts were more effective than the Indian one: IC₅₀ values were ranged between 0.65 and 3.91 μg/ml.

Our results are in agreement with those reported by Singh and Chauhan (2009) that showed the methanol extract as the most active one against DPPH (IC₅₀ were ranged between 0.65 and 3.91 μg/ml). Therefore, the antioxidant activity of different solvent extracts of castor dry leaves showed that the IC₅₀ values for the acetone leaves extract and the water leaves extract were respectively 6.04 μg/ml and 5.85 μg/ml (Singh and Chauhan, 2009).

Table 5
Antioxidant activity of five Tunisian populations of castor.

Test DPPH			
Population	Parts	VCE mg/gDM	IC ₅₀ μg/ml
Hammamet	Leaves	59.25 ± 1.06	0.65 ± 0.028
	Roots	48.1 ± 1.27	1.03 ± 0.02
Aouled Amer	Leaves	24.76 ± 0.79	2.42 ± 0.02
	Roots	16.25 ± 0.35	2.49 ± 0.02
Riadh Andalous	Leaves	33.85 ± 0.92	2.34 ± 0.015
	Roots	12 ± 0.35	2.63 ± 0.04
Nefza	Leaves	5.62 ± 0.88	3.91 ± 0.04
	Roots	11.57 ± 0.24	3.2 ± 0.014
Khanguet Hajej	Leaves	25.75 ± 1.06	2.39 ± 0.014
	Roots	4.25 ± 0.35	5.78 ± 0.05

The difference between populations is significant for the tested parameters IC₅₀ and VCE ($P < 0.0001$).

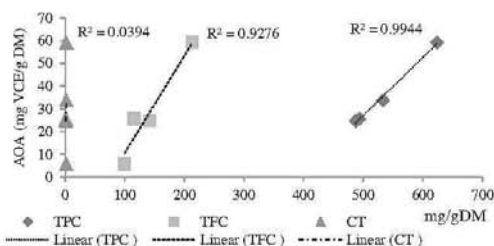


Fig. 6. Relationship between total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), and condensed tannins (CT) and the antioxidant activity of leaves extracts.

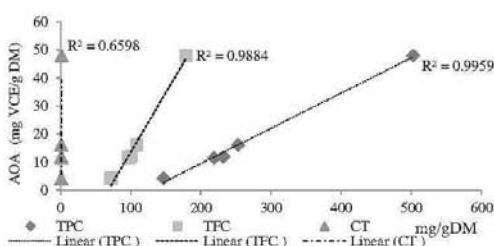


Fig. 7. Relationship between total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), and condensed tannins (CT) and the antioxidant activity of roots extracts.

For the first time, our study shows that a good correlation exists between phenolic compounds, flavonoid compounds and antioxidant activity expressed by the VCE mg/g DM for leaves extracts ($R^2 = 0.994$ and $R^2 = 0.927$ respectively). A similar relationship was observed for roots extracts ($R^2 = 0.995$ and $R^2 = 0.988$ respectively). In contrast, no relationship between the condensed tannins content and the antioxidant activity for both leaves and roots extracts ($R^2 = 0.039$ and $R^2 = 0.659$ respectively) have been found (Figs. 6 and 7).

3.6. Larvicidal activity

The in vitro bioassays revealed that the larvicidal efficiency of the used extracts increased as the concentration and the exposure time increased. Results were collected and presented in Table 6, Figs. 8 and 9.

Among the extracts tested, aqueous seed extracts showed low mortality from 1 h exposure. That mortality increased with time till having 100% of larvae mortality at a concentration of 10% for all populations after 24 h of exposure. For other concentrations,

Table 6
Larvicidal activity of different extracts of castor against *Culex pipiens* larvae.

Population	Part	LC ₅₀ (mg/l)	95% Lower confidence	95% Upper confidence
AA	Leaves	2133 ± 20.1	1006	8293
	Seeds	570 ± 0	410	810
RA	Leaves	1410 ± 0	660	3020
	Seeds	1225 ± 49	780	1810
H	Leaves	1300 ± 14.1	720	2415
	Seeds	2140 ± 35	853	6783
N	Leaves	3030 ± 42.4	850	8180
	Seeds	603 ± 23	383	956
KH	Leaves	2020 ± 28.2	550	6440
	Seeds	1260 ± 0	740	2130

The difference between populations is significant for the LC₅₀ ($P < 0.0001$).

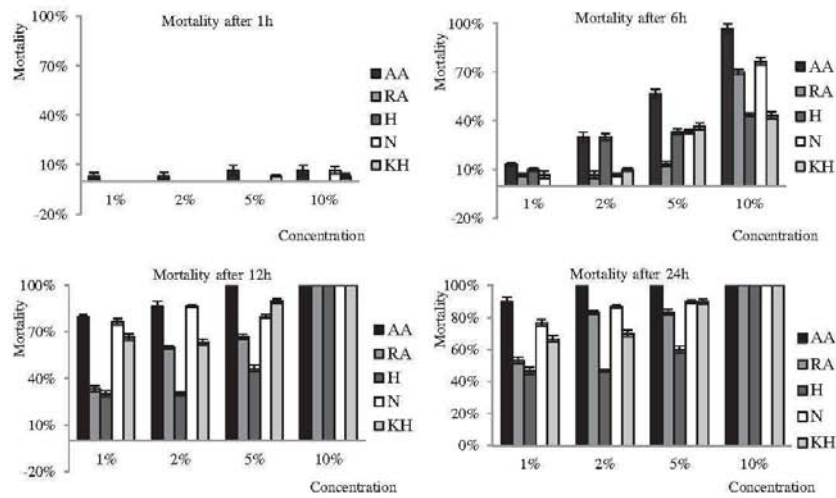


Fig. 8. Evolution of *Culex pipiens* L. mortality over time after exposure to seed extracts from five Tunisian populations of castor: Nefza (N), Riadh Andalous (RA), Khanguet Hajej (KH), Hammamet (H), and Aouled Amer (AA).

larvae mortalities were varied between populations. At 1% concentration, the mortality of *C. pipiens* L. larvae was going from 46.66% (Hammamet) to 90% (Aouled Amer). For the second concentration (2%), mortality was ranged between 46.66% (Hammamet) and 100% (Aouled Amer). Other mortality values were as follow: 70% (Khanguet Hajej), 83.33% (Riadh Andalous), and 86.66% (Nefza). At the concentration of 5%, mortalities were as follow: 60% (Hammamet), 83.33% (Riadh Andalous), 90% for both Nefza and Khanguet Hajej and 100% (Aouled Amer).

The leaves extracts of castor screened for larvicidal activity were found less effective as compared to seeds extracts. Then,

the first dead individuals were observed after 4 h of exposure only in Aouled Amer, Riadh Andalous, and Hammamet populations. After 24 h of exposure, 100% of mortality was obtained at a concentration of 10% in three populations from five tested (Aouled Amer, Hammamet, and Riadh Andalous). Other populations showed a mortality value of 70% for Nefza and 80% for Khanguet Hajej.

The sensitivity of *C. pipiens* L. larvae to leaves and seeds extracts of castor is demonstrated by Table 6 showing the LC_{50} (Lethal concentration) values obtained after treatment for 24 h. The LC_{50} confirmed that seeds extracts are more effective than leaves

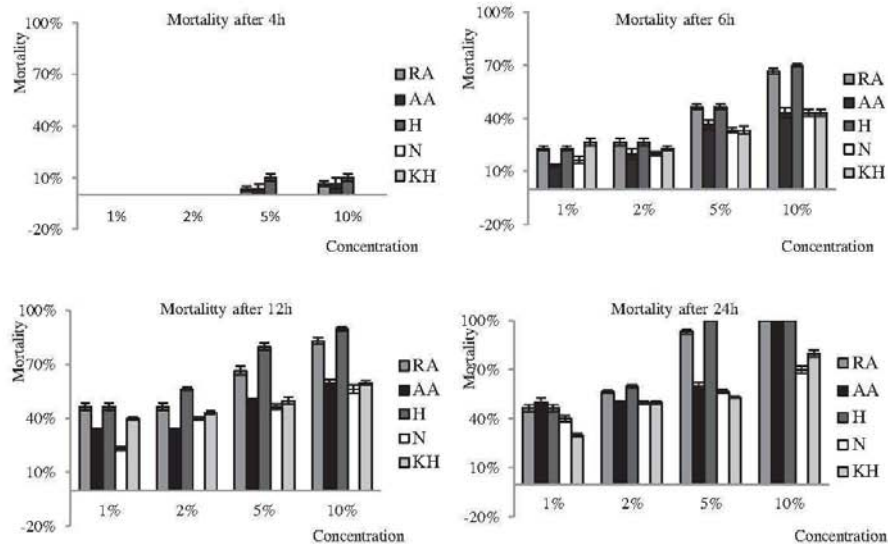


Fig. 9. Evolution of *Culex pipiens* L. mortality over time after exposure to leaves extracts from five Tunisian populations of castor: Nefza (N), Riadh Andalous (RA), Khanguet Hajej (KH), Hammamet (H), and Aouled Amer (AA).

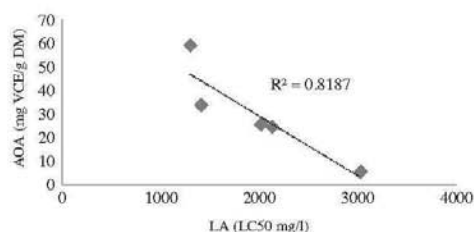


Fig. 10. Relationship between the larvicidal activities (LA) of aqueous leaves extracts and the antioxidant activities of (50%) methanolic leaves extracts of castor.

extracts for most populations. This powerful activity is shown by lowest LC₅₀.

Analyses showed that the seeds extract of Aouled Amer population is the most effective against *C. pipiens* L. larvae and showed the lowest LC₅₀ value (570 mg/l). However, the seeds extract of Hammamet population showed the lowest toxicity against larvae. This low toxicity is confirmed by the highest LC₅₀ value (2140 mg/l). This toxicological study revealed that the leaves extract of Hammamet population was the most toxic with a LC₅₀ (1300 mg/l) while the leaves extract of Nefza population was the less toxic one (LC₅₀ = 3030 mg/l).

These results are in agreement with other studies such as the one carried out by Aouinty et al. (2006). This study showed that the aqueous leaves extracts of some plants are toxic and can therefore be used as a larvicide. Among the plants tested castor showed a low LC₅₀ (600 mg/l). Other aqueous extracts of leaves were tested against some mosquito species: *C. pipiens*, *Aedes scaspis*, *Culiseta longiareolata* and *Anopheles maculipennis* showed the following LC₅₀: 530 mg/l, 3130 mg/l, 3770 mg/l and 3750 mg/l respectively for species *Tetraclinis articulata*, *Nerium oleander*, *Anmii visnag* and *Imulaviscosa*.

In addition, a study elaborated by Alaoui (2002), tested the toxicity of aqueous extracts from leaves of *Mentha pulegium* on *Culicidae* larvae showed a LC₅₀ value of 750 mg/l. Comparing this value to those founded in our study we can conclude that two seed extracts from the five populations tested were more effective than *M. pulegium*. These populations were those of Aouled Amer (570 mg/l) and Nefza (603 mg/l). Other toxicological studies of five species of *Euphorbiaceae* plants (same family of *Ricinus communis* L.), i.e. *Jatropha curcas*, *Pedilanthus tithymaloides*, *Phyllanthus amarus*, *Euphorbia hirta*, and *Euphorbia tirucalli*, were tested against *C. quinquefasciatus*. Petroleum ether extracts showed highest larvicidal effects, with LC₅₀ values of 11.34, 76.61, 113.40, 424.94, and 5.52 mg/l respectively (Rahuman et al., 2008). So these types of extracts were more toxic than aqueous extracts of castor.

Our study shows for the first time, a linear relationship between the antioxidant activity of methanolic leaves extracts and the larvicidal activity of aqueous leaves extracts of castor. Then, Fig. 10 reports a good correlation between VCE (mg/g DM) and lethal concentrations 50 (LC₅₀) with correlation coefficient ($R^2 = 0.818$).

4. Conclusions

The present phytochemical study of five Tunisian populations of *Ricinus communis* L. revealed that the content of TPC, TFC, and CT were higher in the leaves than in the roots. Main phenolic compounds identified were gallic acid, catechin, rutin, and vanillic acid. With regard to the antioxidant efficiency, results showed that the difference between samples, come from different populations, is significant. With regard to the antioxidant efficiency, results showed that Hammamet population possessed the most powerful antioxidant activity when compared to the other

populations (IC₅₀ = 0.65 µg/ml for leaves extract, 1.03 µg/ml for roots extract and 0.587 mg/ml for oil). The toxicological studies of leaves and roots extracts, come from different populations, showed that the difference between them is significant. The toxicological studies showed that the leaves extract of Hammamet population was the most toxic with a LC₅₀ (1300 mg/l) while the leaves extract of Nefza population was the less toxic one (LC₅₀ = 3030 mg/l). As for the seeds extract, Aouled Amer population was the most effective against *C. pipiens* L. larvae and showed the lowest LC₅₀ value (570 mg/l). These results support the view that castor could be used as a source of natural antioxidant and larvicide allowing to promote the exploitation of castor in another field than cosmetic one.

Acknowledgments

We thank Dr. Bejaoui Mustafa (Faculty of Sciences of Bizerta) for helping us to identify the larvae stages of *Culex pipiens* L. We also thank Dr. Sandrine Rup (Lorraine University) for her assistance with GC–MS analysis.

References

- Alaoui, S.N., 2002. Faune culicidienne d'une zone marécageuse de Rabat-Salé: Biologie et contribution à la lutte par des substances naturelles (Biological sciences thesis). Faculty of Science of Mohammed V. Rabat, Morocco, p. 192.
- Aouinty, B., Oufara, S., Mahari, S., 2006. Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles de ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés: *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10, 67–71.
- Amous, A., Makris, D.P., Kefalas, P., 2001. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. J. Agric. Food Chem. 49, 5736–5742.
- Brand, W.W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol. 28, 25–30.
- Chauchan, S.M.S., Mishra, M.K., Parkash, S., Kaushik, R., 1998. Isolation of phenolics from leaves *Terminalia arjuna*. J. Indian Chem. Soc. 75, 328–329.
- Chen, G., Chen, H., 2011. Extraction and deglycosylation of flavonoids from sumac fruits using steam explosion. Food Chem. 126, 1934–1938.
- Chung, K.T., Wong, T.Y., Huang, Y.W., Lin, Y., 1998. Tannins and human health. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 38, 421–464.
- Da Silva, N.L., Batistella, C.B., Maciel Filho, R., Wolf Maciel, M.R., 2009. Biodiesel production from castor oil: optimization of alkaline ethanolic extraction. Energy Fuel 23, 5636–5642.
- Dethiollaz, S., 2003. La ricine, une arme biologique. Protéines à la une, <http://web.expasy.org/proline/dossiers/008/> (accessed 15.11.13).
- Ghosh, S., Thwari, S.S., Srivastava, S., Sharma, A.K., Kumar, S., Ray, D.D., Rawat, A.K., 2013. Acaricidal properties of *Ricinus communis* leaf extracts against organophosphate and pyrethroids resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet. Parasitol. 192, 259–267.
- Ghrabi, Z., 2005. A Guide to Medicinal Plants in North Africa. IUCN Center of Mediterranean Cooperation, Malaga, Spain, p. 199.
- Hall, S.M., Medlow, G.C., 1975. Identification of IAA in phloem and roots pressure saps of *Ricinus communis* by mass spectrometry. Plant Physiol. 56, 177.
- Hamilton, M.A., Russo, R.C., Thurston, R.V., 1977. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11, 714–719.
- Ho, M.W., 2006. Biofuels Republic Brazil. Institute of Science in Society Report, London, England.
- Ilavarasan, R., Moni, M., Subramanian, V., 2005. Anti-inflammatory and free radical scavenging activity of *Ricinus communis* L. root extract. J. Ethnopharmacol. 103, 478–480.
- Ivan, A., 1998. Chemical constituents, traditional and modern uses. In: Medicinal Plants of the World. Ross Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp. 375–395.
- Kang, S.S., Cordell, A., Soejarto, D.D., Fong, H.H.S., 1985. Alkaloids and flavonoids from *Ricinus communis*. J. Nat. Prod. 48, 155–156.
- Khafagy, S.M., Mahmoud, Z.F., Salam, N.E.A., 1979. Coumarins and flavonoids of *Ricinus communis* growing in Egypt. Planta Med. 37, 191.
- Khan, M.R., Ndaalio, G., Nkunya, M.H.H., Wevers, H., 1978. Studies on the rationale of African traditional medicine. Part II. Preliminary screening of medicinal plants for anti-gonococci activity. Pak. J. Sci. R. 47, 9–16.
- Khogali, A., Barakat, S., Abou Zeid, H., 1992. Isolation and identification of the phenolics from *Ricinus communis* L. Delta J. Sci. 16, 198–211.
- Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y., 2002. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars from pulms. Food Chem. 81, 321–326.
- Macedo, J., Consoli, R.A.G.B., Grandi, T.S.M., Dos Anjos, A.M.G., De Oliveira, A.B., Mendes, N., Queiroz, R.O., Zani, C.L., 1997. Screening of Asteraceae (Compositae)

- plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). Mem. I. Oswaldo Cruz. 92, 565–570.
- Macheix, J.J., Fleuriot, A., Jay Allemand, C., 2005. Composés phénoliques des végétaux: un exemple des métabolites secondaires d'importance économique, first ed. Lausanne, Switzerland.
- Muanda, N.F., Koné, D., Dicko, A., Soulimani, R., Younos, C., 2009. Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian medicinal plant parts. ECAM 2011, 1–8.
- N'Guessan, A.H.O., Dago Déliko, C.E., Akhanovna, J., Békro, M., Békro, Y.A., 2011. Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. Génie industriel 6, 55–61.
- Nath, S., Manabendra, D.C., Shubhadeep, R.C., Das, A.T., Sirotkin, A.V., Zuzana, B., Kádasi, A., Nora, M., Adriana, K., 2011. Restorative aspect of castor plant on mammalian physiology. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 1, 236–246.
- Neff, C., Scheid, G.A., 2008. Les biocarburants – analyse du potentiel de production des biocarburants à l'échelle internationale et en Tunisie. Orientations pour la production de biocarburants en Tunisie. GTZ Tunis., 4–5.
- Polvéche, V., 1996. La culture du ricin en Europe. Ingénieries. EAT 6, pp. 49–58.
- Poonam, S., Parchi, A., Krishna, M.Y., Tandon, V., 2008. Antidiabetic activity of 50% ethanolic extract of *Ricinus communis* L. and purified fractions. Food Chem. Toxicol. 46, 3458–3466.
- PORIM Test Methods. 1995. Palm Oil Research Institute of Malaysia Test Methods. Ministry of Primary Industries, Malaysia, pp. 83–121.
- Rahuman, A.A., Gopalakrishnan, G., Venkatesan, P., Kannappan, G., 2008. Larvicidal activity of some euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *C. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 102, 867–873.
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glower, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem. 66, 401–436.
- Scalbert, A., 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: Hemingway, R.W., Laks, P.E. (Eds.), Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance. Plenum Press, New York, pp. 259–280.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analyses of condensed tannins. Anim. Food Technol. 91, 21–40.
- Seveque, J.L., 2002. Etude d'Impact des ICPE, Effet de l'installation. Environnement. , p. 201.
- Sharma, S., Vasudevan, P., Madan, M., 1990. Insecticidal Value of Castor (*Ricinus communis* L.) against Termites. Int. Biodeterior. 27, 249–254.
- Singh, P.P., Chauhan, A.S.M.S., 2009. Activity guided isolation of antioxidants from the leaves of *Ricinus communis* L. Food Chem. 114, 1069–1072.
- Sun, B., Ricardo da Silva, J.M., Spranger, I., 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. J. Agric. Food Chem. 46, 4267–4274.
- Visen, P., Shukla, B., Patnaik, G., Tripathi, S., Kulshreshtha, D., Srimal, R., Dhawan, B., 1992. Hepatoprotective activity of *Ricinus communis* leaves. Int. J. Pharmacogn. 30, 241–250.
- Waterhouse, A., 1999. Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine. Food Anal. Chem. 299, 152.
- Wolfe, K.W.X., Liu, R.H., 2003. Antioxidant activity of apple peels. J. Agric. Food Chem. 51, 609–614.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64, 555–559.

Phytochemical analysis of phenolic compounds, antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of extracts from eight populations of *Jatropha curcas* L.

Ghnimi Wafa^{a,c,d,*}, El Ferchichi Ouarda H la^{c,d}, Khouja Mohamed Larbi^d, and Dicko Amadou^b

^aLaboratory of Chemistry and Physics Multi-scale Approach of Complex Environments, Lorraine University, 1 Bd Arago-57078 Metz, France.

^bUnit Research Animal and Functionality of Animal Products, Lorraine University, 1 Bd Arago-57078 Metz, France

^cCarthage University, Faculty of Sciences of Bizerta, Jarzouna-7021, Bizerta, Tunisia

^dNational Institute for Research in Rural Engineering Water and Forestry, BP N10, Ariana-2080, Tunisia

*Corresponding author address: Institute of chemistry, physics and materials, 1 Bd Arago-57078 Metz, France. Email: wafaghnimi@gmail.com. Tel: (33) 3 87 31 54 31

Abstract

This study was conducted to evaluate, the phytochemical composition of leaves and roots of eight populations of *Jatropha curcas*. Levels of total phenolic contents, total flavonoids, and condensed tannins of methanolic extracts were determined by UV-spectrophotometer. Some phenolic compounds were identified and quantified by RP-HPLC (reverse phase HPLC). Epicatechin, naringin, rutin, vitexin, and p-coumaric acid were detected. GC-MS analysis revealed that the jatropha oils contained mainly the palmitoleic, palmitic, stearic, oleic, and linoleic acids. The antioxidant properties of leaves, roots, and oils of jatropha showed that the best results were obtained for the leaves extracts of Suriname (P8) ($IC_{50} = 8.4 \mu\text{g/ml}$ by DDPH test and $IC_{50} = 0.55\text{mg/ml}$ by ABTS test).

Besides, the anti-acetylcholinesterase activity of leaves and roots extracts of *J. curcas* was investigated revealing that these extracts were effective against the acetylcholinesterase enzyme (AChE). Compared to the galantamine ($IC_{50} = 0.55 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$), the most promising extracts were the leaves extracts of Mato Grosso Brazil (P5) ($IC_{50} = 0.54 \mu\text{g/ml}$), Vale do Jequitinhonha Brazil (P7) ($IC_{50} = 0.47 \mu\text{g/ml}$), and Suriname (P8) ($IC_{50} = 0.57 \mu\text{g/ml}$).

These results indicate that these extracts could be used as natural antioxidant source and in the treatment of the Alzheimer disease too, since they may contribute to increase acetylcholine in cholinergic neurons.

Keywords: *Jatropha curcas*; anti-acetylcholinesterase; Alzheimer disease; antioxidant activity; RP-HPLC; GC-MS; phenolic compounds.

1. Introduction

Recently, there is a great interest in the study of natural antioxidants because they are able to prevent diseases caused by free radicals (Noguchi and Niki, 2000). Many plants contain a wide variety of free radical scavengers such as phenolic compounds, nitrogen compounds, vitamins, and terpenoids (Zheng and wang, 2001). Many researches showed that the phenolic compounds possess many biological effects which are mainly attributed to their antioxidant activity, inhibition peroxidation, and chelating transition metals (Bahman et al., 2007). Other researches confirmed that once the homeostasis between the defense systems and the reactive oxygen species production is disrupted, the oxidative stress promotes many diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular disorders, and Alzheimer disease (Valko et al., 2007; Ingkaninan et al., 2003). The Alzheimer disease (AD) is frequent in aged population, as a result of malfunctioning of biochemical pathways (Heinrich and Theoh, 2004). In fact, the AD is the result of massive or progressive loss of neurons from different region of the brain it still controversial but some studies suggest that dietary supplement with antioxidants may help in solving the mild cognitive impairment due to the AD (Khlifi et al., 2013).

The drugs approved for the AD therapy act by counteracting acetylcholine deficit enhancing its level in the brain (Heinrich and Theoh, 2004). In this respect, use a selective inhibitor for acetylcholinesterase has attracted particular attention for treatment of the AD (Kim et al., 2002). Most of the used AChE inhibitors are alkaloids such as the physostigmine, the tacrine, the donepezil, and the galantamine. These inhibitors show many undesirable side effects such as nausea, vomiting, dizziness, anorexia, diarrhea and hepatotoxicity (Knapp et al., 1994; Rogers et al., 1998; Mukherjee et al., 2007) which increases the interest to found AChE inhibitors inducing fewer side effects.

Recently, several non-alkaloidal AChE inhibitors have been recognized as anti-AD agents such as terpenoids, flavonoids and phenolic compounds (Houghton et al. 2006; Orhan et al., 2009). For this purpose, Ryu et al. (2012) have isolated from the ethanolic extracts of *Broussonetia papyrifera* roots three flavonols namely the papyriflavonol, the brousoflavonol, and the 8-(1,1-dimethylallyl)-5'-(3-methylbut-2-enyl)-3',4',5,7-tetrahydroxy-flavonol, which showed a significant inhibitory potency of AChE enzyme. Aderogba et al. (2013) have examined some phenolic compounds, extract from the leaves of *Croton penduliflorus*, such as quercetin-3-O-rhamnoside, kaempferol-3-O-rhamnoside, protocatechualdehyde and the p-hydroxybenzoic acid. Their study confirmed that these phenolic compounds are potent inhibitors of AChE. Today, Xian et al. (2014) showed in their last study that flavonoids extracted from various Chinese ferns have significant anti-AChE activity.

The *Jatropha curcas* L. is a shrub or tree belonging to the family *Euphorbiaceae* (Bailey, 1953). The center of origin of *J. curcas* is in the northeastern part of South America and the dry areas of Mexico (Makkar et al., 2009). Currently, it is cultivated in many tropical and sub-tropical regions in Africa and Asia (Schmook and Serralta-Peraza, 1997). The name *jatropha* is derived from Greek word “*jatros*” (doctor) and “*trophe*” (food), which implies its medicinal uses (Kumar and Sharma, 2008). Hence, this species possesses various biological activities such as wound-healing (Shetty et al., 2006), anti-inflammatory (Mujumdar and Misar, 2004), anti-parasitic (Fagbenro-Beyioku et al., 1998), antimicrobial (Matsuse et al., 1998), anti-malaria (Asase et al., 2005), anti-diabetic (Jaiswal, 2010), and treatment of burn spot, congestion, headache, hypertension, eczema, and galactogogue (Nath and Choudhury, 2010; Jain and Srivastava, 2005).

Previously, many phytochemical analyses reported that this plant is rich in secondary metabolites such as phenolic, flavonoid, saponin, and alkaloid compounds (Thomas et al., 2008). Numerous studies have isolated some of the phenolic compounds from different parts of *J. curcas* such as orientin, vitexin, vicenin II, apigenin, apigenin 7-O- β -D-galactoside, apigenin 7-O- β -D-neohesperidoside (Abd-Alla et al., 2009), 3-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde, 3-hydroxy-4-hydroxybenzoate acid, nobiletin (Ling-yi et al., 1996), and coffeoyldehyde (Yao et al., 2012).

Owing to the increase of the demand for plant derived drugs, and the lack of knowledge on the antioxidant and anti-AChE activities, we choose to study eight populations of *J. curcas*. Thus, we have reported here, the identification and the quantification of phenolic compounds of leaves and roots methanolic extracts. We have analyzed their oils composition. Moreover, we have determined the antioxidant activity using the DPPH and the ABTS radical scavenging assays, and the inhibitory effects of the tested extracts on the AChE enzyme using the Ellman test.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The leaves, roots, and seeds of *J. curcas* were collected from the region of Nabeul in Tunisia. Eight populations were studied: Arusha Tanzania (P1), Mozambique (P2), Paranà Brazil (P3), Norte de Minas Brazil (P4), Mato Grosso Brazil (P5), Região sudeste Brazil (P6), Vale do Jequitinhonha Brazil (P7), and Suriname (P8). For each population 10 identified plants were selected for the study, all of them were identified at the National Institute for Research in Rural Engineering Water and Forestry in Tunisia.

2.3. Chemicals

Folin-ciocalteu reagent was obtained from VWR international (France). Gallic acid, catechin, vanillin, ascorbic acid, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic (ABTS), 2,2'-azobis-2-amidino-propane dihydrochloride (AAPH), potassium phosphate (KH_2PO_4), acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (AChE), acetylthiocholine iodide (ATCI), 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), galantamine hydrobromide from *Lycoris sp.* And tris (hydroxymethyl) aminomethane were obtained from Sigma Aldrich chemistry (France). Sodium carbonate (Na_2CO_3), aluminum chloride (AlCl_3), sodium nitrite (NaNO_2), and sodium hydroxide (NaOH) from Across organics (Belgium).

2.4. Preparation of extracts

Leaves and roots were chopped, dried, and powdered. Plant extracts were prepared via the method used by Kim et al. (2002) with some modifications. 10 g of fine powder were macerated in 100 ml of MeOH (80%). After 24 h, the extract was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure at 38°C using a rotary evaporator. The residue was dissolved in 100 ml of MeOH (50%) than the mixture was centrifuged for 20 min and was kept at +4°C. Seeds were peeled, crushed then extracted with soxhlet method. For that, 20 g and 100 ml of n-hexane were used. After extraction, the solution was filtered and flowed by solvent removal in a rotary evaporator. The oil was kept at +4°C for further analyses.

2.5. Determination of total phenolics

Total phenolic compounds (TPC) were measured by the method used by Waterhouse (1999) with some modifications. Briefly, 40 μl of samples were added to test tubes containing 3.16 ml of distilled water followed by addition of 200 μl of Folin-ciocalteu reagent (1N) and 600 μl of sodium carbonate (Na_2CO_3 , 20%). Samples and blank were thoroughly mixed. After 40 min of incubation at room temperature, the absorbance was read at 725 nm. For the calibration curve, dilute solutions of gallic acid were used and total phenolics were expressed in terms of equivalent amounts of gallic acid per gram of dry matter (GAE/g DM). Spectrophotometer analyses were carried out with UV-Visible spectrophotometer Cary 50 Scan.

2.6. Determination of total flavonoids

Total flavonoid compounds (TFC) were dosed by a colorimetric assay described by Zhishen et al. (1999) with slightly modification. Then, 250 μl of sample was added to a volumetric flask containing 1ml of distilled water. At time 0 min, 75 μl of sodium nitrite (NaNO_2 , 5%) was added to the flask. After 5 min, 75 μl of aluminum chloride (AlCl_3 , 10%) was added. After 6 min, 500 μl of sodium hydroxide (NaOH, 1N) was added to the mixture. At this time the mixture was diluted with 2.5 ml of distilled water. The absorbance was directly read at 510 nm. For calibration curve, dilute solutions of catechin were used and total flavonoids were expressed as mg of catechin equivalent per gram of dry matter (CE/g DM).

2.7. Evaluation of condensed tannins

The condensed tannins (CT) were evaluated with vanillin method developed by Schofield et al. (2001) with slightly modification using a UV-Visible spectrophotometer. In brief, 5g of each sample was lixiviated in n-hexane and the residue was dried at room temperature. Then, 0.5 g of dry residue was added to 15 ml of MeOH-HCl (1%). The tube was vortexed, placed in water bath at 35 °C for 20 min, centrifuged at 1532 x g and finally filtered. 1 ml of filtrate was mixed with 3 ml of vanillin solution (formed by 4 g of vanillin and MeOH-HCl 8%). Samples and blanks were prepared in the same way. All tubes were incubated at 35°C for 20 min. After this second incubation the absorbance was read at 500 nm. For the calibration curve, different concentrations of catechin were used and results were expressed as mg of catechin equivalent per gram of dry matter (CE/g DM).

2.8. RP- HPLC analysis

RP- HPLC analysis was performed according the method described by Ghnimi et al. (2014) with some modifications using a Waters 600E coupled to a Waters 486 tunable absorbance detector equipped with a 20 μ l sample loop injector. 2 g of dried plant material of *J. curcas* were extracted with 40 ml of methanol (50%). Extracted samples were filtered using 0.45 μ m PTFE filters. A gradient of three mobile phases was used, solvent A: 50 mM of ammonium phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) pH = 2.6 (adjusted with orthophosphoric acid H_3PO_4); solvent B: acetonitrile /solvent A (80:20) and solvent C: 200 mM orthophosphoric acid H_3PO_4 pH = 1.7. The gradient profile was changed as follows: 100% of A at 0 min, 95% of A and 5% of B at 4 min, 92% of A and 8% of B at 10 min, 90% of A and 10% of B at 15 min, 14% of B and 86% of C at 25 min, 16% of B and 84% of C at 45 min and 25% of B and 75% of C at 70 min. The column (reverse phase RP-C18, 150 x 4.6 mm, 5 μ m) was equilibrated for 15 min before injection. The flow rate was 1 ml/min and phenolic compounds were detected at 280 nm and at 320 nm. Phenolic standards used in this study were chlorogenic acid, epicatechin, p-coumaric acid, rutin, vitexin, naringin, and cinnamic acid.

2.9. GC-MS analysis

The fatty acid methyl esters (FAME) were prepared according to the modified method described by PORIM (1995). 0.05 g of oil was dissolved in 1.8 ml of petroleum ether. Then 0.2 ml of sodium methylate was added and vortexed. Then the two layers were separated and 1 μ l of the upper layer containing the FAME was injected on a 30 m capillary column (0.25 mm i.d x 0.25 μ m film), of a Perkin Elmer-MS Clarus 500 GC-MS. The temperature was programmed to start at 150 $^\circ$ C for 2 min and increased to 300 $^\circ$ C after 30 min, the carrier gas was helium and the temperatures of injector and detector were held at 250 $^\circ$ C.

2.10. Evaluation of antioxidant properties

Two tests have been used to evaluate the antioxidant capacity of different extracts of *J. curcas*: the DPPH test and the ABTS test.

2.10.1. DPPH test

The antioxidant capacity was evaluated using the DPPH radical scavenging assay. The method developed by Brand et al. (1995) with some modification was used. Briefly, 200 μ M DPPH radical was dissolved in methanol. The mixture was kept away from light. Then, in a test tube, 2.90 ml of the DPPH solution was added to 100 μ l of the plant extract. The solution was mixed then incubated in dark at 37 $^\circ$ C for exactly 20 min. After incubation, the absorbance was read at 517 nm. For the control, a solution constituted by 2.90 ml of DPPH solution and 100 μ l of MeOH was used. Decrease in absorbance resulted by the addition of the test solution was measured. Then, the inhibition percentage was calculated by the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A \text{ control } 517\text{nm} - A \text{ sample } 517\text{nm})}{(A \text{ control } 517\text{nm})} \times 100$$

From a plot of concentrations and inhibition percentages, IC_{50} values (IC_{50} is the concentration of antioxidant required to reduce the original amount of radical by 50%) were determinate. The DPPH radical scavenging activity can be also expressed as mg per gram dry weight of vitamin C equivalent (VCE). The radical stock solution was daily prepared. All these tests were replicated three times.

2.10.2. ABTS test

The method used in this test was developed by Muanda et al. (2009) with slight modification. 1mM of AAPH and 2.5 mM of ABTS as diammonium salt were mixed in a buffer solution of potassium phosphate (100 mM, pH = 7) containing 150 mM of NaCl. After incubation in a water bath at 68 $^\circ$ C for 20 min, the resulting ABTS solution was diluted with the methanol to get a blue – green coloration having an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. Then, 2.94 ml of ABTS radical anion solution was mixed with 60 μ l of different dilutions of each

simple. Mixtures were incubated at 37 °C for 30 min. A control solution was prepared by 60 µl of methanol and 2.94 ml of ABTS radical anion solution. The decrease of absorbance was measured at 734 nm. A standard curve was prepared using the vitamin C and results were expressed as mg of vitamin C equivalent per gram of dry material (VCE). The radical stock was daily prepared and all the tests were replicated three times.

2.11. Evaluation of the AChE inhibition

The anti-AChE activity was measured by the Ellman test which is developed by Ferreira *et al.* (2006) and more recently by Ouchemoukh *et al.* (2014) with some modifications. 650 µl of Tris-buffer (50 mM, pH = 8), 50 µl of the plant extract with different concentrations and 5 µl of the enzyme solution containing 0.26 unit/ml were incubated during 15 min at 25 °C. The reaction was started when 75 µl of acetylthiocholine iodide (ATCI, 15 mM) and 250 µl of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid (DTNB, 3 mM) were added. After 10 min, the reaction reached the equilibrium and the absorbance of the mixture was measured at 405 nm. A control mixture was prepared using methanol instead of the tested extract and was considered as 100% activity. Galantamine was used as a positive control. Each experiment was performed three times.

Inhibition in % was calculated in the following way:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \frac{(A \text{ sample } 405 \text{ nm})}{(A \text{ control } 405 \text{ nm})} \times 100$$

Extract concentration providing 50 % of inhibition (IC₅₀) was obtained from a plot of concentrations against inhibition percentages.

2.12. Statistical analyses

All experiments were replicated at least three times. The statistical analysis was conducted using the SAS program and $P < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results and discussion

3.1. Determination of TPC and TFC

Total phenolic compounds (TPC) and flavonoid compounds (TFC) of eight populations of *J. curcas* were quantified using the UV-Visible spectrophotometric apparatus. Results reported in Figs. 1 and 2 show that the distribution of TPC and TFC in *J. curcas* varied according to the plant parts.

The total phenolic contents expressed as mg GAE/g of dry matter of the leaves extracts was ranged from 117.05 mg (Regiao sudeste Brazil P6) to 254.3 mg (Suriname P8). Phenolic concentrations of the other populations were as follows: 134.8 mg (Arusha Tanzania P1), 144.5 mg (Mozambique P2), 120.93 mg (Paraná Brazil P3), 138.86 mg (Norte de Minas Brazil P4), 162.42 mg (Mato Grosso Brazil P5), and 125.88 mg (Vale do Jequitinhonha Brazil P7). For the roots extracts, analysis showed that TPC were 118.43 mg (P1), 139.75 mg (P2), 119.48 mg (P3), 124.95 mg (P4), 123.73 mg (P5), 114.23 mg (P6), 108.18 mg (P7), and 109.9 mg (P8).

As regards the total flavonoids contents of leaves, P8 showed the highest concentration with 237.56 mg CE/g DM. This was followed by P5 (120.75 mg CE/g DM), P4 (104.25 mg CE/g DM), P2 (104.16 mg CE/g DM) P1 (90.61 mg CE/g DM), P6 (85.3 mg CE/g DM), P7 (81.26 mg CE/g DM), and P3 (65.66 mg CE/g DM).

For the roots, contents were ranged from 51.33 mg CE/g DM (P7) to 65.45 mg CE/g DM (P5). Other concentrations were as follows: P1 (56.48 mg CE/g DM), P2 (56.3 mg CE/g DM), P3 (59.68 mg CE/g DM), P4 (59.08 mg CE/g DM), P6 (56.6 mg CE/g DM), and P8 (53.83 mg CE/g DM).

These results clearly showed that the content of TPC and TFC were higher in the leaves than in the roots for all the tested populations.

The statistical analysis showed that, for the leaves and the roots extracts, the difference between populations is significant for all studied compounds. For the leaves extracts ($P < 0.0001$) for both TPC and TFC. For roots extracts ($P = 0.0205$) and ($P = 0.0003$) for TPC and TFC respectively.

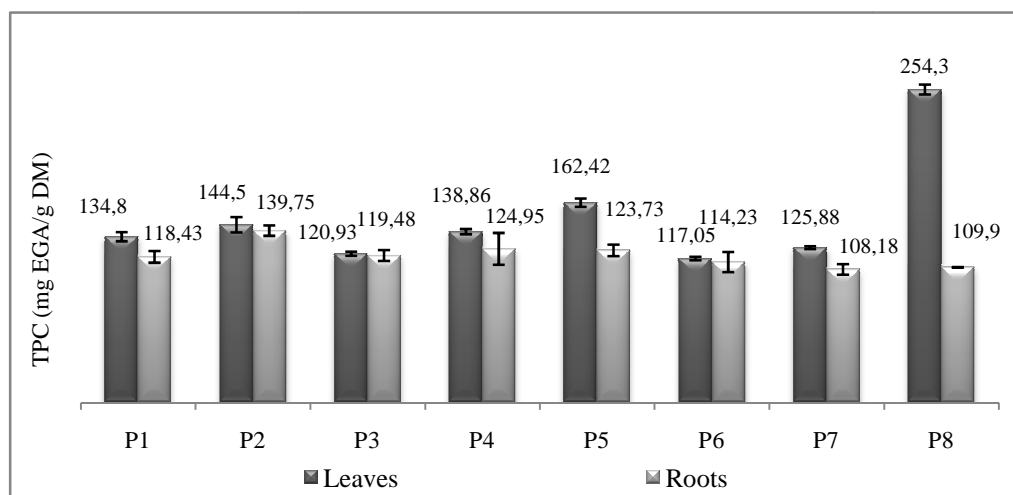


Fig.1. Total Phenolic compounds (TPC) of leaves and roots of eight populations of *J. curcas*: Arusha Tanzania (P1), Mozambique (P2), Parana Brazil (P3), Norte de Minas Brazil (P4), Mato Grosso Brazil (P5), Regiao sudeste Brazil (P6), Vale do Jequitinhonha Brazil (P7), and Suriname (P8).

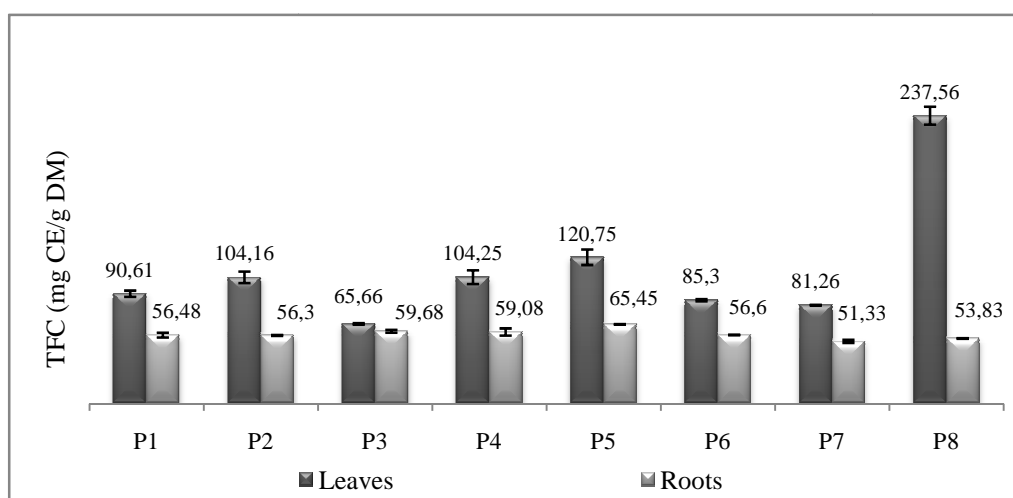


Fig.2. Total flavonoid compounds (TFC) of leaves and roots of eight populations of *J. curcas*: Arusha Tanzania (P1), Mozambique (P2), Parana Brazil (P3), Norte de Minas Brazil (P4), Mato Grosso Brazil (P5), Regiao sudeste Brazil (P6), Vale do Jequitinhonha Brazil (P7), and Suriname (P8).

3.2. Evaluation of condensed tannins

The values of condensed tannins content in leaves and roots of eight populations of *J. curcas* were presented in Figure 3. The condensed tannins content in the leaves are ranged from 1.67 mg CE/g DM (Regiao sudeste Brazil P6) to 3.09 mg CE/g DM (Suriname P8). Other values were: 2.4 mg CE/g DM (Arusha Tanzania P1), 2.52 mg CE/g DM (Mozambique P2), 2 mg CE/g DM (Parana Brazil P3), 2.4 mg CE/g DM (Norte de Minas Brazil P4), 2.57 mg CE/g DM (Mato Grosso Brazil P5), and 2.08 mg CE/g DM (Vale do Jequitinhonha Brazil P7).

In the extracts roots, the results showed that the highest concentration of condensed tannins was 0.47 mg CE/g DM for P1 followed by P5 (0.42 mg CE/g DM), P4 (0.38 mg CE/g DM), P6 (0.35 mg CE/g DM), P7 (0.34 mg CE/g DM), P3 (0.33 mg CE/g DM), P2 (0.32 mg CE/g DM), and finally 0.29 mg CE/g DM for P8.

It's appeared that the concentration of CT was more important in the leaves than in the roots. For both extracts leaves and roots, the statistical analysis showed that the difference between populations is significant for this parameter ($P < 0.0001$).

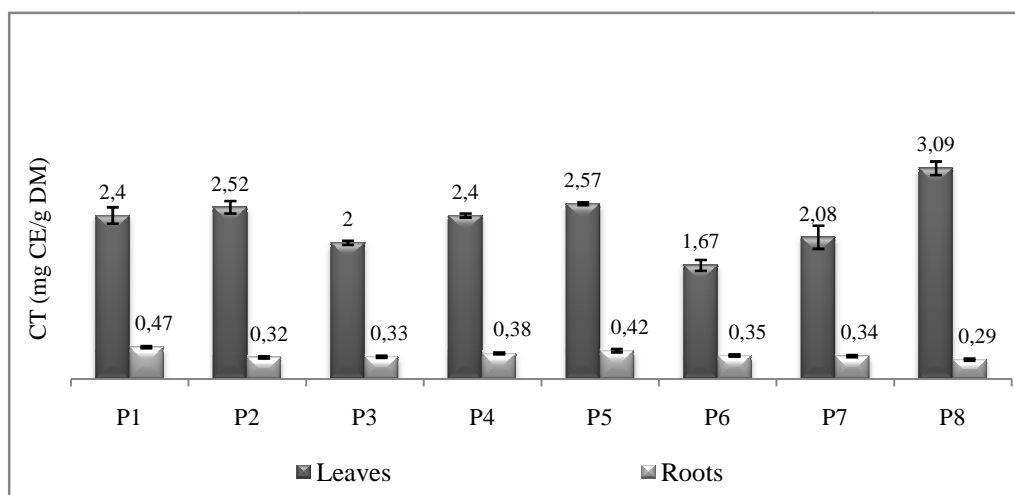


Fig.3. Condensed tannin contents (CT) of leaves and roots of eight populations of *J. curcas*: Arusha Tanzania (P1), Mozambique (P2), Parana Brazil (P3), Norte de Minas Brazil (P4), Mato Grosso Brazil (P5), Regiao sudeste Brazil (P6), Vale do Jequitinhonha Brazil (P7), and Suriname (P8).

3.3. HPLC analysis

RP-HPLC results were collected in tables 1 and 2. Phenolic compounds were identified by matching their retention time to the corresponding standard one. Figs. 4 and 5 show the chromatogram profiles and the concentrations of the used standards in the solution at 280 nm and at 320 nm respectively. The quantification of the compounds was determined by comparing its surface with that of the corresponding standard having a known concentration.

Analysis of leaves extracts revealed differences between the contents of phenolic compounds. Arusha Tanzania population (P1) showed low levels of naringin (33.57 µg/ml), chlorogenic acid (23.75 µg/ml), and rutin (12.23 µg/ml). The Parana Brazil population (P3) showed high levels of epicatechin and naringin with 112.69 µg/ml and 85.05 µg/ml respectively. The Norte de Minas Brazil population (P4) revealed low levels of rutin (38.3 µg/ml) and naringin (17.12 µg/ml). For both Grosso Brazil (P5) and Suriname (P8) populations, the most important compounds are the rutin and the epicatechin. Thus, levels of rutin and epicatechin are respectively 310.12 µg/ml and 175.84 for P5 population and 210.64 µg/ml and 215.73 µg/ml for P8 population. Epicatechin is the major compound identified for the others populations: Mozambique (P2), Regiao sudeste Brazil (P6), and Vale do Jequitinhonha Brazil (P7) their contents were 90.11 µg/ml, 213.13 µg/ml, and 210.04 µg/ml respectively.

Concerning rutin, naringin, and vitexin our results are in agreement with those reported by Namuli et al. (2011) and Abd-Alla et al. (2009). Moreover, we report for the first time that the leaves extracts of *J. curcas* contain chlorogenic acid, epicatechin, p-coumaric acid, and cinnamic acid.

Other compounds in leaves extracts of *J. curcas* plant were reported by other authors such as gallic acid, vanillic acid, pyrogallol, apigenin, isovitexin, orientin, vicenin II, and ellagic acid (Namuli et al., 2011; Abd-Alla et al., 2009; Manpong et al., 2009).

About the roots extracts, the analysis showed that the P1 population showed low levels of chlorogenic acid (12.95 µg/ml) and epicatechin (10.35 µg/ml). For the P5 population, naringin is the major compound identified (45.84 µg/ml). The P7 population, less richest one, showed very low levels of naringin (5.17 µg/ml) and chlorogenic acid (3.23 µg/ml). Analysis of the remainder populations revealed that epicatechin is the most important compound identified with (107.64 µg/ml), (31.83 µg/ml), (3.1 µg/ml), (33.95 µg/ml), and (31.72 µg/ml) for P2, P3, P4, P6, and P8 population respectively.

Our results are in good agreement with the findings of Namuli et al. (2011) who reported the presence of the naringin in the roots extracts of *J. curcas*. Our study showed for the first time that roots extracts contain in low concentrations such as epicatechin, chlorogenic acid, and cinnamic acid. Others autors have reported the presence of vanillic acid, gallic acid, ellagic acid, and nobiletin (Namuli et al., 2011; EL Diwani et al., 2009; Ling-yi et al., 1996).

Table 1: Phenolic compounds identified in the *J. curcas* leaves of eight populations and their concentrations

RT (min)	Compound name	Leaves							
		µg/ml							
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
19.3±0.56	chlorogenic acid	23.75±0.91	-	23.17±0.67	-	-	45.95±0.63	-	-
22.2±0.6	Epicatechin	-	90.11±1.10	112.69±1.01	-	175.84±0.91	213.13±0.04	210.04±0.24	215.73±1.03
27.04±0.85	p-coumaric acid	-	21.94±0.93	-	-	-	-	64.08±0.62	31.01±0.7
35.58±0.73	Rutin	12.23±0.5	38.94±1.2	-	38.3±1.15	310.12±0.53	48.12±0.74	75.65±0.42	210.64±1.02
36.95±0.42	Vitexin	-	-	-	-	32.1±0.56	16.48±0.59	-	-
51.82±0.21	Naringin	33.57±0.82	31.39±0.74	85.05±0.86	17.12±0.24	-	-	83.46±0.27	25.19±0.24
56.88±0.94	cinnamic acid	0.51±0.02	-	-	-	12.8±1.06	-	5.97±0.07	-

The difference between populations is significant for all the identified compounds ($P < 0.0001$).

Table 2: Phenolic compounds identified in the *J. curcas* roots of eight populations and their concentrations

RT (min)	Compound name	Roots							
		µg/ml							
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
19.3±0.56	chlorogenic acid	12.95±0.14	0.62±0.04	-	0.67±0.03	8.01±0.26	-	3.23±0.16	-
22.2±0.6	Epicatechin	10.35±0.91	107.64±0.5	31.83±1.18	3.1±0.24	26.33±1.4	33.95±0.77	-	31.72±0.8
27.04±0.85	p-coumaric acid	-	1.21±0.13	-	-	0.13±0.02	-	-	-
35.58±0.73	Rutin	-	36.9±0.5	-	-	2.38±0.48	-	-	-
36.95±0.42	Vitexin	-	-	-	-	-	1.08±0.02	-	-
51.82±0.21	Naringin	-	26.8±0.84	2.9±0.84	0.88±0.02	45.84±0.53	1.46±0.07	5.17±0.14	6.97±0.1
56.88±0.94	cinnamic acid	0.88±0.05	4.67±0.3	-	0.08±0.007	-	-	1.4±0.07	-

The difference between populations is significant for all the identified compounds ($P < 0.0001$).

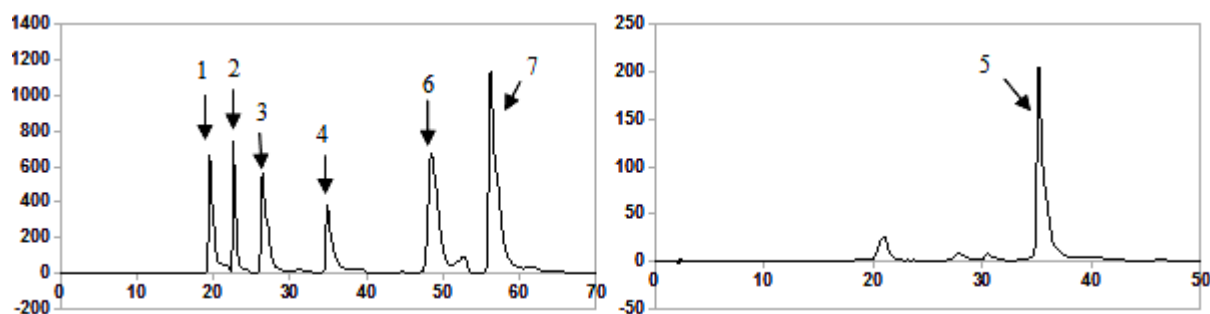


Fig.4: Chromatogram profile of the used standards at 280 nm

1: chlorogenic acid, 2: epicatechin, 3: p-coumaric acid, 4: rutin, 5: vitexin, 6: naringin, 7 : cinnamic acid

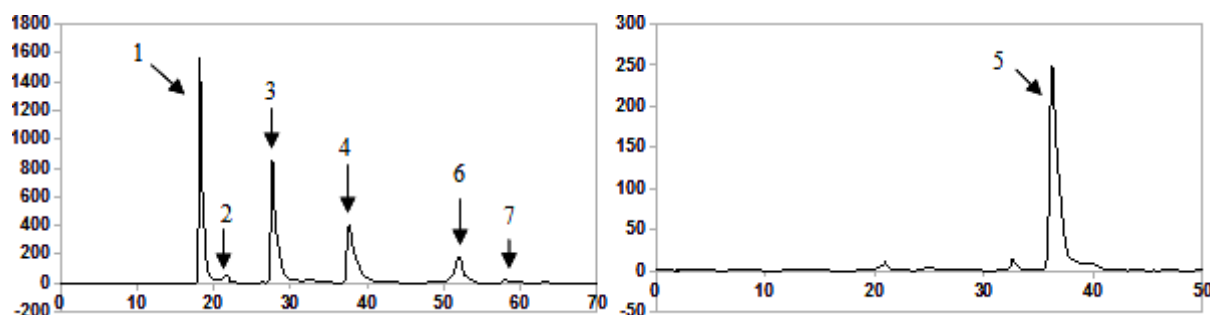


Fig.5: Chromatogram profile of the used standards at 320 nm

1: chlorogenic acid, 2: epicatechin, 3: p-coumaric acid, 4: rutin, 5: vitexin, 6: naringin, 7 : cinnamic acid

3.4. GC-MS analysis

The GC-MS analyses revealed that the jatropha oil contain mainly three fatty acids groups: the saturated group such as the palmitic and the stearic acids, the mono-unsaturated group such as the oleic and the palmitoleic acids and the poly-unsaturated one such as the linoleic acid.

According to table 3, *J.curcas* oils of the different populations had an average content of 78.5% to 81.7% of unsaturated fatty acids and 18.3% to 21.5% of saturated fatty acids. The oleic and the linoleic acids were major products in the oil composition. Their observed percentages were (41.45% – 49.4% and 30.3% – 38.95%) for the oleic and the linoleic acids respectively. The palmitic and the stearic acids concentrations were (12.3% – 14.85% and 5.55% – 6.95%) respectively. The Palmitoleic acid was identified in very low concentration (0.6% – 0.85%).

The oils compositions of the eight populations of *J.curcas* were different for only one constituent which was the oleic acid ($P = 0.0007$). For the other acids levels, the studied populations were similar and no major differences appear between them.

Our results are in accord with others GC studies of *J.curcas* oil. Akbar et al., 2009 reported that the *J.curcas* oil can be classified as an oleic-linoleic oil. Our results are also in good agreement with the works of Gubitz et al. (1999), Martinez-Herrera et al. (2006), and Rodrigues et al. (2013) which reported that the *J.curcas* oil contain the stearic, the palmitic, and the palmitoleic acids in low concentrations. Moreover these authors have mentioned that the myristic, the arachidic, and the behenic acids are also present in the *J.curcas* oil.

Table 3: Fatty acids identified in *J. curcas* oils of eight populations

RT (min)	Compound name	Percentage in oil							
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
7.4	Methyl palmitoleate	0.7±0	0.75±0.2	0.8±0.1	0.85±0.2	0.75±0.07	0.6±0	0.8±0	0.8±0
7.6	Methyl palmitate	12.3±0.1	14.35±2.7	14.85±2.4	14.5±1.6	13.3±0	12.45±0.2	13.2±0.1	14±1.2
9.2	Methyl linoleate	33.05±0.2	30.45±3.7	30.3±3.5	32.9±5.5	36.25±0.7	31.6±0.9	38.95±0.7	36.15±1.6
9.3	Methyl oleate	47.9±0	47.5±0	47.45±0.2	44.9±2.6	43.65±0.9	49.4±0.7	41.45±0.7	42.7±0.5
9.5	Methyl searate	6±0	6.95±0.9	6.65±0.7	6.85±0.9	6.1±0.1	6±0	5.55±0.2	6.35±0.9

The difference between populations is significant for only the methyl ester of oleic acid ($P = 0.0007$)

3.5. Antioxidant activities

The antioxidant activities of leaves and roots extracts of the eight populations of *J. curcas* were evaluated by DPPH and ABTS tests. The oils antioxidant capacity was measured using the DPPH test only. Results were reported in tables 4 and 5. The values expressed in the tables were mean \pm SD of three replicates. The IC_{50} is the concentration of antioxidant required to reduce the original amount of radical by 50%. So more the value of the IC_{50} is low, better is the antioxidant efficiency.

The collected results showed that compared to the others leaves extracts, the leaves extract of the Suriname population (P8) exhibited the higher antioxidant capacity: IC_{50} values were 8.4 μ g/ml and 0.55 mg/ml for the DPPH and the ABTS tests respectively. Compared to the others roots extracts, the Mozambique population (P2) was the most efficient: IC_{50} values were 27.3 μ g/ml and 1.67 mg/ml for the DPPH and the ABTS tests respectively. For the oils, P2 exhibit the higher antioxidant activity ($IC_{50} = 1.53$ mg/ml).

Comparing the antioxidant activities of the leaves extracts, the Parana Brazil population (P3) one was the less effective against free radicals: IC_{50} values were 44.8 μ g/ml and 0.96 mg/ml for the DPPH and the ABTS tests respectively. The roots extract of the Vale do Jequitinhonha Brazil population (P7) was the less effective compared to the others roots extracts ($IC_{50} = 64.4$ μ g/ml; $IC_{50} = 3.45$ mg/ml). Concerning the *J. curcas* oils, the Arusha Tanzania population (P1) was the less efficient against free radicals ($IC_{50} = 1.94$ mg/ml).

The statistical analyses showed that the difference between the samples activities is significant.

Compared to the Oskoueian et al. (2011) works on the Malaysian *J. curcas* methanolic roots extract ($IC_{50} = 57.9$ μ g/ml), six of our *J. curcas* populations P1, P2, P3, P4, P5, and P6 were more effective than the Malaysian one. IC_{50} values for the P1, P2, P3, P4, P5, and P6 populations were 50.1, 27.3, 49, 30.8, 35.3, and 54 μ g/ml respectively.

In contrast, about the methanolic leaves extract studied by Oskoueian et al. (2011) ($IC_{50} = 6.8$ μ g/ml), our study demonstrates that the IC_{50} value of the methanolic leaves extract of the Suriname population (P8) is close to the Malaysian one ($IC_{50} = 8.4$ μ g/ml).

Under the same conditions, another study elaborated by El Diwani et al. (2009) showed that the IC_{50} value of the ethanolic roots extract of the Egyptian *J. curcas* was 0.521 mg/ml. Comparing to our results, it's appear that all the methanolic roots extracts of the eight populations were more effective than the ethanolic one.

The IC₅₀ values of the eight *J. curcas* oils were ranged from 1.53 mg/ml to 1.94 mg/ml. Compared to the leaves and the roots extracts, the oils were less effective.

In addition, the works of Verma et al. (2012) report that the ethanolic, the aqueous, and the hydroalcoholic seeds extracts of *J. curcas* have a higher antioxidant capacities than the oils: the ethanolic (IC₅₀ = 46 µg/ml), the aqueous (IC₅₀ = 36.66 µg/ml), and the hydroalcoholic (IC₅₀ = 32.66 µg/ml).

For the first time, our study shows a positive correlations between the antioxidant activities of leaves extracts and the total phenolic compounds ($R^2 = 0.978$), total flavonoid compounds ($R^2 = 0.902$) and condensed tannins ($R^2 = 0.883$). For the roots extracts a positive correlation was observed only between the antioxidant activity and the total phenolic compounds ($R^2 = 0.905$). In contrast, no relationship could be established between the antioxidant activities and the total flavonoid compounds ($R^2 = 0.697$) and the condensed tannins ($R^2 = 0.260$) (Figs.6 and 7).

Table 4: Antioxidant activity of *J. curcas* oils of eight populations

DPPH Test	
Population	IC50 mg/ml
Arusha Tanzania (P1)	1.94±0.06
Mozambique (P2)	1.53±0.16
Paraná Brazil (P3)	1.58±0.34
Norte de Minas Brazil (P4)	1.72±0.01
Mato Grosso Brazil (P5)	1.69±0.01
Regiao sudeste Brazil (P6)	1.64±0.08
Vale do Jequitinhonha Brazil (P7)	1.54±0.19
Suriname (P8)	1.83±0.1

The difference between populations is significant ($P = 0.0333$).

Table 5: Antioxidant activities of leaves and roots extracts of *J. curcas*

Population	Part	DPPH Test		ABTS Test	
		IC50 µg/ml	EVC µg/g DM	IC50 mg/ml	EVC µg/g DM
Arusha Tanzania (P1)	Leaves	33,2±4,4	630,8±1,13	0,81±0,05	123±2,8
	Roots	50,1±2,1	290±1,4	2,4±0,003	45,25±1,06
Mozambique (P2)	Leaves	24±2,3	762±1,4	0,73±0,02	184±1,4
	Roots	27,3±2,4	672,7±1,06	1,67±0,01	62,75±1,06
Paraná Brazil (P3)	Leaves	44,8±3,7	353,4±1,27	0,96±0,02	91±2,8
	Roots	49±0,7	342,6±0,84	2,2±0,2	48,75±0,35
Norte de Minas Brazil (P4)	Leaves	26,6±4,3	682±1,06	0,77±0,01	150,5±0,7
	Roots	30,8±1,2	648,45±0,77	1,8±0,1	55±1,4
Mato Grosso Brazil (P5)	Leaves	22,6±3,8	990,4±1,97	0,7±0,01	189±1,4
	Roots	35,3±2,1	446,7±0,98	1,89±0,03	52,5±0,7
Regiao sudeste Brazil (P6)	Leaves	40,4±2,8	390,5±1,13	0,96±0,08	91,5±3,5
	Roots	54±2,4	110±1,4	2,9±0,07	44,1±0,14
Vale do Jequitinhonha Brazil (P7)	Leaves	34,3±1,5	591,5±3,5	0,93±0,01	101±1,4
	Roots	64,4±1,6	90,75±1,06	3,45±0,2	39,75±1,06
Suriname (P8)	Leaves	8,4±0,5	1234,5±2,12	0,55±0,03	193,5±2,12
	Roots	60,7±0,2	92±0,7	3,3±0,2	40,75±0,35

The difference between populations is significant for different tested extracts ($P < 0.0001$ for all parameters).

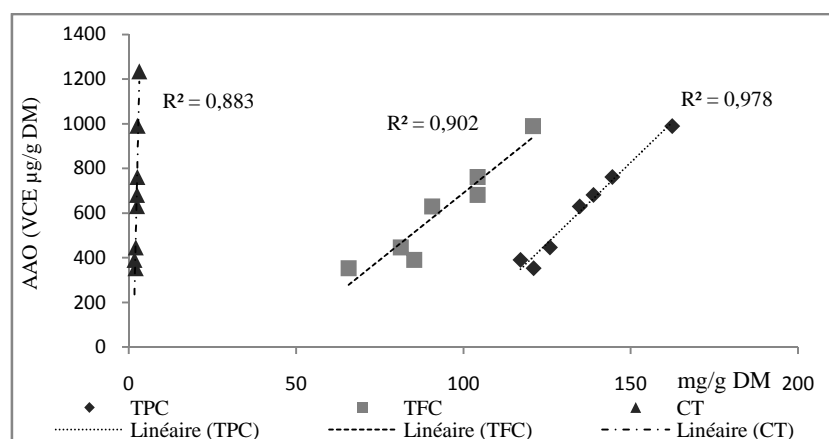


Fig.6. Relationship between total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), condensed tannins (CT), and the antioxidant activity of leaves extracts.

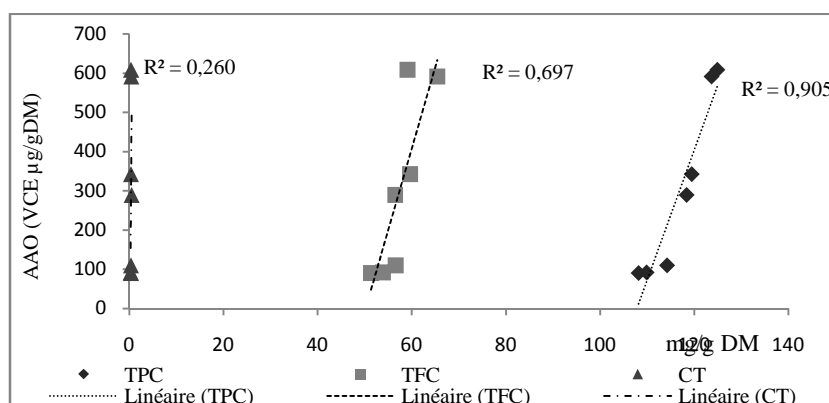


Fig.7. Relationship between total phenolic compounds (TPC), total flavonoid compounds (TFC), condensed tannins (CT), and the antioxidant activity of roots extracts.

3.6. Acetylcholinesterase inhibition

The methanolic leaves and roots extracts of eight populations of *J. curcas* showed an anti-AChE activity. Results reported in table 6 revealed that all the tested extracts are efficient against AChE. Indeed, the IC_{50} values are ranged between $0.47 \mu\text{g/ml}$ for the leaves extract of Vale do Jequitinhonha Brazil population (P7) and $1.64 \mu\text{g/ml}$ for the leaves extract of Paranà Brazil population (P3). Our study showed for the first time that the leaves extract of Vale do Jequitinhonha Brazil (P7) ($IC_{50} = 0.47 \mu\text{g/ml}$) exhibited a more effective activity than the galantamine used as positive control ($IC_{50} = 0.55 \mu\text{g/ml}$). The leaves extracts of Mato Grosso Brazil (P5) ($IC_{50} = 0.54 \mu\text{g/ml}$) and Suriname (P8) ($IC_{50} = 0.57 \mu\text{g/ml}$) populations had a similar activity than the galantamine one which is the major alkaloid used in the AD treatments.

Under similar conditions, Feitosa et al. (2011) have evaluated the anti-AChE activity, they report that the IC_{50} value of leaves extract of *J. gossypifolia* is 0.05 mg/ml . Other works mention that Euphorbiaceae species such as *Acalypha diversifolia*, *Acalypha macrostachya*, *Alchornea grandiflora* (Jaime et al., 2006), *Pera glabrata* (Elaine et al., 2009), and *Jatropha gossypifolia* (Bhunesh and Ajay, 2013) act as AChE inhibitors. These studies support our result showing that the *J. curcas* specie is a potent inhibitor of the AChE enzyme. Moreover, our results are higher than the values found in the literature for the inhibition of the AChE enzyme with plant

extracts reported recently for the Lamiaceae, the Fumariaceae (Adewusi et al., 2011), the Myrtaceae, the Apiaceae and the Liliaceae species (Ouchemoukh et al. 2014).

Table 6: Anti-AChE activity of eight populations of *J. curcas*

Population	Part	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
Arusha Tanzania (P1)	Leaves	0,77 \pm 0,01
	Roots	0,7 \pm 0,007
Mozambique (P2)	Leaves	0,6 \pm 0,007
	Roots	0,65 \pm 0,02
Paraná Brazil (P3)	Leaves	1,64 \pm 0,05
	Roots	0,88 \pm 0,007
Norte de Minas Brazil (P4)	Leaves	0,75 \pm 0
	Roots	0,75 \pm 0,01
Mato Grosso Brazil (P5)	Leaves	0,54 \pm 0,01
	Roots	0,8 \pm 0,01
Regiao sudeste Brazil (P6)	Leaves	0,93 \pm 0,02
	Roots	1,2 \pm 0,02
Vale do Jequitinhonha Brazil (P7)	Leaves	0,47 \pm 0,02
	Roots	0,6 \pm 0,007
Suriname (P8)	Leaves	0,57 \pm 0,007
	Roots	0,9 \pm 0,007
Galantamine		0,55 \pm 0,02

The difference between populations is significant for different extracts activities: $P < 0.0001$.

4. Conclusions

The present phytochemical study of eight populations of *Jatropha curcas* L. revealed that the content of TPC, TFC, and CT were higher in the leaves extracts than in the roots extracts. Main phenolic compounds identified were *p*-coumaric acid, epicatechin, rutin, vitexin, naringin, chlorogenic acid, and cinnamic acid. With regard to the antioxidant efficiency, results showed that the difference between samples, come from different populations, is significant. Our results showed that the leaves extract of Suriname population possessed the best antioxidant activity with IC₅₀ value 8.4 $\mu\text{g/ml}$. The study reports that all the tested extracts possessed excellent activities against the AChE enzyme. For the first time, we found that the leaves extract of Vale do Jequitinhonha Brazil is more effective than the galantamine used as reference (IC₅₀ = 0.47 $\mu\text{g/ml}$).

These results support the view that *jatropha* could be used as a source of natural antioxidant and acetylcholinesterase inhibitor allowing to promote the exploitation of *jatropha* in another field that bioenergetic one.

Acknowledgments

We thank Dr. Sandrine Rup (Lorraine University) for her assistance with GC–MS analysis.

References

- Abd-Alla, H.I., Moharram, F.A., Gaara, A.H., El-Safty, M.M., 2009. Phytoconstituents of *Jatropha curcas* L. Leaves and their Immunomodulatory Activity on Humoral and Cell-Mediated Immune Response in Chicks. *Z. Naturforsch. C.* 64, 495-501.
- Aderogba, M.A., Ndhala, A.R., Van Staden, J., 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activity and mutagenic effects of *Croton penduliflorus* leaf extract constituents. *S. Afr. J. Bot.* 87, 48-51.
- Adewusi, E.A., Moodley, N., Steenkamp, V., 2011. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.* 77, 638-644.
- Akbar, E., Yaakob, Z., Kartom, S., Kamarudin, S.K., Ismail, M., Salimon, J., 2009. Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock. *Eur. J. Sci. Res.* 29, 396-403.
- Asase, A., Oteng-Yeboah, A.A., Odamtten, G.T., Simmonds, M.S.J., 2005. Ethnobotanical study of some Ghanaian anti-malarial plants. *J. Ethnopharmacol.* 99, 273-279.
- Bahman, N., Mohammed, K., Hamidreza, I., 2007. In vitro free radical scavenging activity of five salvia species. *Pak. J. Pharm. Sci.* 20, 291-294.
- Bailey, L.H., 1953. *The Standard Cyclopaedia of Horticulture III*. The McMillan Co., New York, Toronto.
- Bhunesh, P., Ajay, S., 2013. Piscicidal and Anti AChE Activity of Medicinal Plant *Jatropha gossypifolia* (Family-Euphorbiaceae). *World J. Fish & Marine Sci.* 5 (4), 367-372.
- Brand, W.W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25-30.
- Elaine, M.C.L., Daisy M.B.D.P., Fausto, E.B., Amanda, D.S., Cecília, T.T.B., Luce, M.B.T., Maria, C.M.Y., 2009. Chemical composition, acetylcholinesterase inhibitory and antifungal activities of *Pera glabrata* (Schott) Baill. (Euphorbiaceae). *Revista Brasil. Bot.* 32 (4), 819-825.
- El Diwani, G., El Rafie, Sh., Hawash, S., 2009. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of nodes leaves stem and root of Egyptian *Jatropha curcas*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3, 521-530.
- Fagbenro-Beyioku, A.F., Oyibo, W.A., Anuforom, B.C., 1998. Disinfectant/antiparasitic activities of *Jatropha curcas*. *East Afr. Med. J.* 75, 508-511.
- Feitosa, C.M., Freitas, R.M., Luz, N.N.N., Bezerra, M.Z.B., Trevisan, M.T.S., 2011. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Braz. J. Biol.* 71 (3), 783-789.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M.L.M., Araújo, M.E.M., 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J. Ethnopharmacol.* 108, 31-37.
- Ghnimi W., Dicko A., Khouja M.L., El Ferchichi O.H., 2014. Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. *Ind. Crop. Prod.* 56, 43-51.
- Gübitz, G.M., Mittelbach, M., Trabi, M., 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technol.* 67, 73-82.

- Heinrich, M., Teoh, H.L., 2004. Galanthamine from snowdrop – the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 92, 147–162.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors of plant and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 23, 181-199.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *J. Ethnopharmacol.* 89, 261-264.
- Jaime, N., Jimmy, A.H., Yaned, M.C., Oscar, M.M., 2006. In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 101 (7), 783-785.
- Jain, S.K., Srivastava, S., 2005. Traditional use of some Indian plants among islanders of the Indian Ocean. *Indian J. Traditional Knowledge* 4, 345-357.
- Jaiswal, V., 2010. Culture and ethnobotany of Jaintia tribal community of Meghalaya, Northeast India - a mini review. *Indian J. Traditional Knowledge* 9, 38-44.
- Khelifi, D., Manel-Sghaier, R., Laouni, D., Hayouni, A.A., Hamdi, M., Bouajila, J., 2013. Anti-Inflammatory and Acetylcholinesterase Inhibition Activities of *Globularia alypum*. *J. of Medical and Bioengineering* 2 (4), 232-237.
- Kim, W.G., Cho, K.M., Lee, C.K., Yoo, I.D., 2002. Terreulactone A, a novel meroterpenoid with antiacetylcholinesterase activity from *Aspergillus terreus*. *Tetrahedron Lett.* 43, 3197-3198.
- Kim, D.O., Jeong, S.W., Lee, C.Y., 2002. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars from pulms. *Food Chem.* 81, 321-326.
- Knapp, M.J., Knopman, D.S., Solomon, P.R., 1994. The tacrine study group. A 30-week randomized controlled trial of high dose tacrine in patients with Alzheimer’s disease. *J. Am. Med. Assoc.* 271, 985-991.
- Kumar, A., Sharma, S., 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. *Ind. Crop. Prod.* 28, 1-10.
- Ling-yi, K., Zhi-da, M., Jian-xia, S., Rui, F., 1996. Chemical constituents from roots of *Jatropha curcas*. *Acta Bot. Sin.* 38 (2), 161-166.
- Makkar, H.P.S., Francis, G., Becker, K., 2009. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 111, 773-787.
- Martínez-Herrera, J., Siddhuraju, P., Francis, G., Dávila-Ortíz, G., Becker, K., 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. *Food Chem.* 96, 80-89.
- Manpong, P., Douglas, S., Douglas, P.L., Pongamphai, S., Teppaitoon, W., 2009. Response surface methodology applied to the extraction of phenolic compounds from *Jatropha curcas* L. leaves using supercritical CO₂ with a methanol co-solvent. *J. Food Process Eng.* 10, 1-21.
- Matsuse, T., Lim, Y.A., Hatton, M., Correa, M., Gupta, M.P., 1998. A search for antiviral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. *J. Ethnopharmacol.* 64, 15-22.
- Mujumdar, A.M., Misar, A.V., 2004. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 90, 11-15.

- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14, 289-300.
- Namuli, A., Abdullah, N., Sieo, C.C., Zuhainis, S.W., Oskoueian, E., 2011. Phytochemical compounds and antibacterial activity of *Jatropha curcas* Linn. Extracts. *J. Med. Plant. Res.* 5(16), 3982-3990.
- Nath, M., Choudhury, M.D., 2010. Ethno-medico-botanical aspects of Hmar tribe of Cachar district, Assam (Part 1). *Indian J. Traditional Knowledge* 9, 760-764.
- Noguchi, N., Niki, E., 2000. Forum: Therapeutic applications of reactive oxygen and nitrogen species in human disease. *Free Radical Bio. Med.* 28, 1538-1546.
- Orhan, I., Senol, F.S., Gülpinar, A.R., Kartal, M., Sekeroglu, N., Deveci, M., Kan, Y., Sener, B., 2009. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox subsp. caucasicus var. caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1304-1310.
- Oskoueian, E., Abdullah, N., Saad, W.Z., Omar, A.R., Ahmad, S., Kuan, W.B., Zolkifli, N.A., Hendra, R., Ho, Y.W., 2011. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. *J. Med. Plant. Res.* 5(1), 49-57.
- Ouchemoukh, A.N., Madani, K., Falé, P. L.V, Serralheiro, M.L., Araújo, M.E.M., 2014. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Ind. Crop. Prod.* 53, 6-15.
- PORIM Test Methods 1995. Palm Oil Research Institute of Malaysia Test Methods, Ministry of Primary Industries, Malaysia. 83-121. Schofield, P., Mbugua, D. M., Pell, A. N., 2001. Analyses of condensed tannins. *Anim. Food Technol.* 91, 21-40.
- Rogers, S.L., Farlow, M.R., Doody, R.S., 1998. Donepezil study group. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 50, 136-145.
- Rodrigues, J., Miranda, I., Gominho, J., Vasconcelos, M., Barradas, G., Pereira, H., Bianchi-de-Aguiar, F., Ferreira-Dias, S., 2013. Variability in oil content and composition and storage stability of seeds from *Jatropha curcas* L. grown in Mozambique. *Ind. Crop. Prod.* 50, 828-837.
- Ryu, H.W., Curtis-Long, M.J., Jung, S., Jeong, I.Y., Kim, D.S., Kang, K.Y., Park, K.H., 2012. Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies. *Food Chem.* 132, 1244-1250.
- Schmook, B., Serralta-Peraza, L., 1997. *Jatropha curcas*: distribution and uses in Yucatan Peninsula of Mexico. In: Gubitz, G.M., Mittelbach, M., Trabi, M. (Eds.), *Biofuels and Industrial Products from Jatropha curcas*. DBV Graz, pp. 53-57.
- Shetty, S., Udupa, S.L., Udupa, A.L., Vollala, V. R., 2006. Wound healing activities of bark extract of *Jatropha curcas* Linn. in albino rats. *Saudi Med. J.* 27, 1473-1476.
- Thomas, R., Sah, N., Sharma, P., 2008. Therapeutic Biology of *Jatropha curcas*: A Mini Review. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 9(4), 315-324.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell B.* 39, 44-84.
- Verma, S., Gupta, A., Kushwaha, P., Khare, V., Srivastava, S., Rawat, A.K.S., 2012. Phytochemical Evaluation and Antioxidant Study of *Jatropha curcas* Seeds. *Phcog. J.* 4, 50-54.

Waterhouse, A., 1999. Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. Food Anal.Chem. p152.

Xian, X., Jianguo, C., Yunxia, Z., Quanxi, W., Jianbo, X., 2014. Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China. . Ind. Crop. Prod. 58, pp 91-98.

Yao, L., Han, C., Chen, G., Song, X., Chang, Y., Zang, W., 2012. A new asymmetric diamide from the seed cake of *Jatropha curcas* L. Fitoterapia 83, 1318–1321.

Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. J. Agric. Food Chem. 49, 5165-5170.

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



OMICS Publishing Group and the Editors of Journal of Natural Products Chemistry & Research
Journal of Medicinal & Aromatic Plants Journal of Plant Biochemistry & Physiology applaud

Prof./Dr./Mr./Ms. Wafa Ghnimi

Lorraine University, France

for her Poster Presentation

at the “2nd International Conference and Exhibition on
Pharmacognosy, Phytochemistry & Natural Products”
held on August 25-27, 2014 in DoubleTree by Hilton Beijing, China.

Kelvin Chan

The University of Sydney & Western Sydney, Australia





5th International Congress on Medicinal and Aromatic Plants (CIPAM 2014)-ZARZIS (TUNISIA) 17 to 20 March 2014

CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

THE ORGANISING COMMITTEE CERTIFIES THAT:

H. EL FERCHICHI OUARDA

Have presented the work entitled :

ÉVALUATION DE L'ACTIVITE LARVICIDE DES EXTRAITS AQUEUX DES FEUILLES ET DES GRAINES DE DEUX EUPHORBIACEES : *JATROPHA CURCAS* L. ET *RICINUS COMMUNIS* L. SUR DES LARVES DE MOUTSIQUES CULICIDES : *CULEX PIPIENS*

Authored by

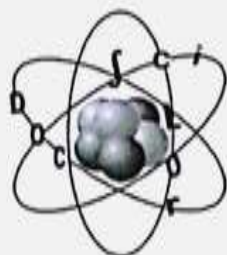
H. EL FERCHICHI OUARDA, W. GHNIMI, B. FATNASSI, M L. KHOUJA

In CIPAM 2014 International Congress on Aromatic and Medicinal Plants
Held in zarzis (Tunisia) during March 17-20 (2014)



Pr. Roua Ben





DocSciLor 2013 - Abbaye des Prémontrés - Pont-à-Mousson

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité d'organisation certifie que G.H.N.I.M.I wafa.....
a participé à la Journée DocSciLor 2013, organisé par le Club Jeunes SCF Lorraine le 6 juin
2013 à l'Abbaye des Prémontrés à Pont-à-Mousson (54).

Le comité d'organisation

Sandrine LITANDE - LANGLE
TICU

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'S. Litandé-Langle', written over a horizontal line.

XXII^{èmes} Journées Nationales de Biologie de la SSNT
Du 15 au 18 Décembre 2012 à EL MOURADI-Hammamet, Tunisie

**SOCIÉTÉ DES SCIENCES
NATURELLES DE
TUNISIE (SSNT)**

- Siège Social :
Faculté des Sciences de Tunis
2092 - El Manar II Tunis - Tunisie
- C.C.B. (RIB) :
12103000450500022145
UIB Agence Essaâdi
- Identifiant : 832326229
- Tél. : 00 216 71 882 200
- Fax : 00 216 71 885 480
- E-mail : ssnt2006@gmail.com



**الجمعية التونسية
للعلوم الطبيعية**

- المقر الاجتماعي :
كلية العلوم بتونس - 2092 المنار II تونس
- الهاتف : 00 216 71 882 200
- الفاكس : 00 216 71 885 480
- المعرف : 832326229

ATTESTATION

NOM DE FAMILLE : GHNIMI

Prénom : Wafa

Institution : Faculté des Sciences de Bizerte

A présenté une communication intitulée :

COMPOSITION PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITE ANTI-
OXYDANTE DE QUELQUES POPULATIONS TUNISIENNES DE
RICINUS COMMUNIS L.

AUX XXII^{èmes} JOURNEES
NATIONALES DE BIOLOGIE DE LA SSNT

Cette attestation est délivrée à l'intéressé (e) pour servir et
valoir ce que de droit.

Tunis le 18 Décembre 2012

Le Président de la SSNT



Pr. Sadok BOUZID

