UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **:**

Master En Chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par
HACEB Imène
KLOUCHI Amira Sirine

Thème :

MISE AU POINT DES PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES EXTRAITS D'UNE PLANTE MEDICINALE

Soutenu publiquement/ le : 22/06 /2022, devant le jury composé de :

Arbia Wassila	Grade : MCA	Université de Médéa	Président
Madani Leila	Grade : MCB	Université de Médéa	Examinateur
Maachou Hamida	Grade : MCA	Université de Médéa	Encadreur
Zouambia Yamina	Grade : MCA	Université de Médéa	Co-encadreur

Année universitaire : 2021/2022

ملخص

في عملنا هذا، نحن مهتمون بتثمين نبات اللزاز، كتلةحيوية وفيرة للغاية في الجزائر. عن طريق استخراج الجزيئات الحيوية النشطة تم بطريقة النقع، باستخدام المذيب: الماء،ماء / ميثانول (50/50٪) و ماء / إيثانول(50/50٪)،انالتحليل النوعي للمستخلصات من خلال إجراء تفاعلات محددة للكشف عن وجود polyphénols، tannins galliques ، glycosides cardiaques و saponosides .ان التحليل كمي "للمركبات الفينولية" باستخدام طريقة اختبار (Folin-Ciacolteu) لتحديد كثافة"البوليفينول الكلي"، وطريقة ثلاثي "كلوريد الألومنيوم" اعطت كثافة"البوليفينول الكلي" 6.92 مغ مكافئ حمض الغاليك مسجلة مع ميثانول/ماء (50/50٪) في حرارة عادية خلال 120 دقيقة وكثافة"الفلافونويد الكلي" 8.18 مع مكافئ حمض الغاليك مسجلة في المستخلص ماء (100 ٪) .

ان تقييم نشاط المضاد للاكسدة اعطت قيمةالتركيز المثبط بنسبة 50٪ بترتيب 0.07مغ / مل لخلاصة الميثانول)/50٪).ان التاثيرالاكثر اهمية للمضاد للبكتيريا سجل في الخلاصات الميثانول المائي و الايثانولالمائي نسبة*Escherichia coli*. ان احسن نشاط مضاد الفطريات تم الحصول عليه بواسطة المستخلص الماء 100٪ نسبة *Saccharomyces cerevisiae*.*اما بالنسبة للنشاط المضاد للالتهاب المتحصل عليه في المختبر (in vitro)* هو بمقدار 99 ٪ الالالتهابتركيز 115.38 ميكروغرام / مل للمستخلص ماء /ميثانول 50٪ مع نشاط الانحلالي بنسبة ضعيفة جدًا تبلغ 10.11٪.

الكلمات المفتاحية: اللزاز،البوليفينول، نشاط مضادات الأكسدة، نشاط مضادات الميكروبات، نشاط مضاد الالتهابات.

Résumé

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à la valorisation de la plante Daphné garou L, biomasse très abondante en Algérie,par extraction de ses biomolécules actives. L'extraction a été faite par macération en utilisant comme solvant : eau, eau/méthanol (50/50 %) et eau/éthanol (50/50 %). L'analyse qualitative des extraits par la réalisation des réactions spécifiques a révélé la présence des polyphénols, des tannins galliques, des glycosides cardiaques et des saponosides. L'analyse quantitative des composés phénoliques en utilisant la méthode de test de Folin-Ciocalteu et la méthode de trichlorure d'aluminiuma donné une teneur en polyphénols totaux de 6.92mgEAG/g enregistrée avec le solvant eau/méthanol (50/50 %) à une température ambiante pendant 120 minutes et une teneur en flavonoïdes de 8.18mgERU/g enregistrée dans l'extrait d'eau (100 %). L'évaluation de l'activité anti-oxydante a donné une valeur de CI50 de l'ordre 0.07mgEAG/ml pour l'extrait eau/méthanol (50/50 %). L'effet antibactérien le plus important a été enregistré pour les extraits hydro-méthanolique et hydro-éthanolique vis-à-vis de l'*Escherichia coli*. La meilleure activité antifongique a été obtenue

avec l'extrait d'eau (100 %) vis-à-vis *Saccharomyces cerevisiae*. L'activité anti-inflammatoire, obtenue in vitro, est de 99% à une concentration 115.38µg/ml pour l'extrait méthanolique avec une activité hémolytique très faible de 10.11%.

Mots clés : Daphné garou, extraction, polyphénols, activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité anti-inflammatoire.

Abstract

In this present work, we are interested in the valorization of the plant Daphne garou.L, very aboundant biomass in Algeria, by extraction of its active biomoleculs. The extraction was done by maceration using as solvent: water, water/methanol(50/50%) and water/ethanol (50/50%).The qualitative analysis carrying out specific reactions to revealed the presence ofpolyphenols, gallic tannins,cardiac glycosides and saponosides .A quantitative analysis of phenolic compounds using the Folin-Ciocalteu test method the aluminum trichloride method gave a total polyphenols content of 6.92mgEAG/g recorded with the solvent water/methanol (50/50 %) at room temperature for 120 minutes and a total flavonoid content of 8.180mgERU/g recorded in the water extract(100%)The evaluation of the antioxidaity gave an CI50 value of around 0.07mgEAG/ml for the methanol/eau (50/50%).The most significant antibacterial effectwas recorded for the hydro-methanolic and hydro-ethanolic extract against*Escherichia coli* extract gave. The bestantifungal activity was obtained with the water extract (100 %) against *Saccharomyces cerevisiae* .The anti-inflammatory obtained in vitro is 99% at a concentration 115.38µg/ml for the extract water/methanol (50/50%)with a very hemolytic activity of 10.11%.

Keywords: Flax-leaved Daphné, extraction, polyphenols, antioxidant activity, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity.

REMERCIMENTS

Tout d'abord, nous remercions Dieu tout puissant, qui nous a permis de mener à bien ce travail.

Nous remercions vivement notre promotrice Mme MAACHO.Hpour les connaissances qu'elle nous a transmises durant notre formation en chimie pharmaceutique. Nous la remercions également pour ses critiques, ses orientations, ses conseils et corrections qu'elle nous a prodigué durant la conduite de ce travail.

Nous remercions vivement notre Co-promotrice Mme ZOUAMBIA.Y pour les connaissances qu'elle nous a transmises durant notre formation en chimie pharmaceutique. Nous la remercions également pour ses critiques, ses orientations, ses conseils et corrections qu'elle nous a prodigué durant la conduite de ce travail.

Un grand merci à Mme ARBIA.W pour l'aide qu'elle nous a fourni, ainsi que pour ses conseils et ses encouragements.

Merci à Mme MADANI.L d'avoir accepté d'examiner ce travail malgré son occupation.

Nous voudrions aussi remercier très chaleureusement nos familles pour le soutien moral et financier.

Enfin, nous exprimons notre gratitude à tous nos enseignants qui nous ont formé, du primaire jusqu'à nos jours.



DEDICACES

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents,
La source de tendresse et l'exemple du dévouement, qui n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous l'amour et les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.Que Dieu vous protège et vous garde pour moi.
Une dédicace spéciale à l'âme de ma grand-mère et de mon grand- père,que dieu ait pitié d'eux.
A ma chère sœur Ikram et mes chers frères Mahdi et Ahmed

Je ne peux exprimer à travers ses lignes tout mon sentiment d'amour envers vous.

A mes chers oncles et leurs petites familles et à mes chères tanteset leurs petites familles. Je vous souhaite que du bonheur.
A celle qui m'a beaucoup aidé pour la réalisation de ce mémoire, mon cher binôme : Imène.

A tous mes amies, mes collègues et Redha , qui font partie de ces personnes rares par leur gentillesse et leurs grands crus .Quelles trouvent ici, le témoignage de tout mon amour et toute ma reconnaissance pour leur inlassable soutien. Je vous souhaite une vie pleine de réussite.

Sirine



DEDICACES

Je rends grâce à ALLAH LE TOUT PUISSANT pour tous les bienfais dont il m'a comblé. Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie mon travail :

A mon honorable père, qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, qui représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de la tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cesser de m'encourager.

A le bonheur de ma vie ma mère, qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour tous les sacrifices qu'elle me contente, toute la confiance qu'elle m'accorde et tout l'amour dont elle m'entoure.

A Yemma.

Que dieu les gardes et les protège.

A mes très chères sœurs Hanène et Fatima-Zahra les mots ne peuvent pas résumer ma reconnaissance et mon amour à votre égard, à mes beaux-frères et à mes très chers : Yanis, Yasmine et Racim.

A celle qui m'a beaucoup aidé pour la réalisation de ce mémoire, mon cher binôme : Sirine.

A Akram et à tous ceux qui me sont chers.

Imène

Table des matières

Remerciement

Dédicaces

Résumé (français , anglais et arabe)

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

INTRODUCTION GENERALE.....1

CHAPITRE I. DAPHNE GAROU

I.1.Introduction…….....…….3

I..2 . Daphné Garou : Daphné gnidium L, Lazzaz.....3

I.2.1.Description de Daphné garou……..…….…….....4

I.2.1.1.Nom vernaculaire..... 4

I.2.1.2.Description botanique.....4

I.2.1.3.Systématiq.....5

I.2.2.Composition et propriétés.....5

I.2.2.1. Composition chimique.....5

I.2.2.2.Propriétés pharmacologique.....6

I..2.3.Investigation toxicologique.....12

CHAPITRE II. METABOLITES SECONDAIRES

II.1.Introduction……..……..……14

II..2.Classification.....15

II.2.1 Composés phénoliques.....15

II.2.1.1. Définition.....15

II.2.1.2.Classification.....16

II.2.1.3.Propriétés des composés phénoliques.....23

CHAPITRE III. EXTRACTION

III.1.ntroduction.....25

III.2.Types d’extraction.....25

III.2.1.Pressage.....25

III.2.2.Décoction.....25

III.2.3.Macération.....25
III.2.4.Infusion.....26
III.2.5.Extraction par solvant.....26
III.2.5.1. Extraction au soxhelt.....27
III.2.5.2 Extraction à reflux.....28
III.2.6. Extraction liquide-liquide.....29
III.2.7. Extraction solide-liquide.....29
III.2.7.1.Hydrodistillation.....30
III.2.7.2.Extraction à la vapeur.....30
III.2.8. Extraction assisté par micro-onde.....31
III.2.8.1.Extraction par ultrason.....31
III.2.9. Technique chimique.....32
III.2.9.1.Lyse ou choc osmotique.....32
III.2.9.2.Modification de la force ionique pH.....33
III.2.9.3.Lyse enzymatique.....33

CHAPITRE IV. PARTIE EXPERIMENTALE

IV.1.Introduction.....34
IV.2.Matériel et produit.....34
IV.2.1.Matériel et produit biologique.....36
IV.3.Préparation et caractérisation physicochimique de Daphné gnidium.L.....36
IV.3.1. Séchage de la matière végétale.....36
IV.3.2.Détermination de la teneur en eau.....37
IV.4.Extraction des composés phénolique.....39
IV.4.2.Caractéristique des extraits.....40
IV.4.2.1.Caractéristique organoléptique 40
IV.4.2.2.Détermination de l'acidité de pH.....41
IV.4.2.3.Détermination de conductivité 41
IV.5.Analyse qualitative et quantatitive des composés polyphénols.....42
IV.5.1.Analyse qualitative.....42
IV.5.1.1.Recherche des polyphénols.....42
IV.5.1.2.Recherche des tannins gallique.....43

IV.5.1.3.Recherche des glycosides cardiaques……..……..……..…..43
IV.5.1.4.Recherche des saponosides……....…..……...……44
IV.5.2.Analyse quantitative …….....……...……45
IV.5.2.1.Dosage des polyphénols…….....……..……..…45
IV.5.2.2.Dosage des flavonoïdes……..…….....……..……50
IV.6.Tension superficielle ……...……...……..…54
IV.6.1.Principe et méthode…….....……..……..….54
IV.6.2.Résultat et discussion…….....…….....55
IV.7.Activité antioxydante…….....……...……...…....58
IV.7.1.Piégeage de radical libre DPPH…….....…….....……..58
IV.7.1.1.Principe……..……..……...…58
IV.7.2.Mode opératoire ……..……..……...….58
IV.7.3.Résultat et discussion…….....……...…….....59
IV.8.Activité antimicrobienne…….....…….....…...61
IV.8.1.Activité antibactrienne …….....…….....62
IV.8.1.1.Mode opératoire……..…….....…62
IV.8.1.2.Résultat et discussion…….....……..…….....63
IV.8.2.Activité antifongique……...…….…….....64
IV.8.2.1.Mode opératoire……..……...…65
IV.8.2.2.Résultat et discussion……..……..…..…65
IV.9..Activité anti-inflammatoire……..…….....66
IV.9.1. Protocole expérimentale…….....…….....67
IV.9.1.1.Préparation de suspension des globules rouges…….....……..……68
IV.9.1.2. Effet des extraits sur la stabilité des membranes des globules rouges (activité anti-inflammatoire).....68
IV.9.1.3.Evaluation de l'activité hémolytique…….....…….……69
IV.9.2. Résultat et discussion….....…….…….71

IV.10.Formulation d’une crème antifongique à base des extraits de DGL…….....……..72

IV.10.1. Protocole expérimentale de la formulatio.....…….…….….72

IV.10.2. Caaractères organoleptique de la crème…….…….....……..73

IV.10.3.Caractérisations physicochimiques de la crème……..…….....…….73

Conclusion générale…….....……...……...76

Références bibliographique

Liste des figures

Figure I.1.Daphné gniduim.L.....3

Figure I.2.Daphné garou…….....……...……..4

Figure I.3.Daphné gnidium a) branche florifère b) branche fruitière c) fleur entière d) fleur longitudinale e) pistil longitudinal f) feuille g fruit h) drupes de fruits chamus avec une seule graine (Aya Khouchlaa et al ,2021)..... 5
Figure I.4.Description systématique du Daphné garou. (Mohammedi, 2013)….....5
Figure I.5.Squelette carbonée des coumarines(a) et des flavonoïdes b).....6
Figure II.1.Structure chimique des polyphénols. 15
Figure II.2.Différentes familles de polyphénols (Collin et Crouzet, 2011).....16
Figure II.3.Structure de l'acide phénolique.....17
Figure II.4.Structure chimique de l'acide caféique 18
Figure II.5.Structure chimique des flavonoïdes.....19
Figure II.6.Structure chimique des flavonones (Crozier, 2003).....19
Figure II.7.Structures chimiques de certains flavan-3-ols (chira et al., 2008)…….. ……20
Figure II.8.Structure chimique des anthocyanes.....20
Figure II.9.structure chimique des tanins. 21
Figure II.10.Structure chimique des tanins hydrolysables. 21
Figure II.11.Structure chimique des tanins condensés.....22
Figure II.12.Structure chimique des quinones. 21
Figure II.13.Structure chimique des coumarines. 23
Figure III.1.Schéma d'un montage de macération. 26
Figure III.2.Shéma d'un monage de l'extraction au soxhlet. 28
Figure III.3.Schéma d'un montage de l'extraction à reflux. 28
Figure III.4.Schéma d'in montage d'une extraction liquide-liquide…….....29
Figure III.5.Schéma d'un montage d'une extraction par hydro distillation.....30
Figure III.6.Schéma d'un montage d'une extraction assistée par micro-ondes..……31
Figure III.7.Schéma d'un montage d'une extraction par ultrasons……..……32
Figure IV.1.Matières végétales séchées.....36
Figure IV.2.Broyage de DGL.....37
Figure IV.3. Appareil utilisé pour le tamisage.....38
Figure IV4.Distribution granolémitrique de la poudre de DGL.....39
Figure IV.5.Extraction(a), filtation(b) et centrifugation (c) des extraits 40
Figure IV.6.pH mètre utilisé.....41
Figure IV.7.Conductimètre utilisé……..42

Figure IV.8. Recherche des polyphénols.....43
Figure IV.9.Recherche de glycosides cardiaques. 43
FigureIV.10.Recherche des saponines……44

Figure IV.11.Protocoles du dosages des polyphénols……46

Figure IV.12.Courbes d'étalonnages de l'AG avec des différentes solvants à 737nm……..47

Figure IV.13.Effets des solvants sur l'extraction des polyphénols totaux…….....49
Figure IV.14 Effet de temps sur la teneur des extraits en PPT 49
Figure IV.15.Effet de température sur l'extraction des polyphénols totaux..... 50
Figure IV.16.Protocole du dosage des flavanoides.……51
Figure IV.17.Courbes d'étalonnages de la rutine avec les differentes extraits à 430 nm..…….52

Figure IV.18.Teneur du flavonoides en fonction de la nature de solvant...……54

Figure IV.19.Mesure de la tension superficielle d'un extrait de DGL.....55
Figure IV.20.Effet de la nature du solvant sur la tension superficielle des extraits. 56

Figure IV.21.Effet de la duréé d’extraction sur la tension superficielle des extraits. 57
Figure IV.22.Effet de température sur la tension superficielle des extraits. 57
Figure IV.23.Dosage de l’activité antioxydante. 59
Figure IV.25.Différentes étapes du test d’antibiogramme 63
Figure IV.26.Récuperation des globules rouges 68
Figure IV.27.Dosage de l’activité hémolytique. 70
Figure IV.28.Tubes après centrifugation 70
Figure IV.29.Lecture à 548 nm. 70
Figure IV.30.Crème antifongique obtenue formée. 72
Figure IV.31.Test de viscosité sur la crème antifongique formulée 74

Liste des tableaux

Tableau IV.1.Matériel et produit. ---------- 35
Tableau IV.2. Caractéristiques de la poudre de DGL.---------- 38
Tableau IV.3.Caractéristiques organolepti des extraits. ---------- 40
Tableau IV.4. pH des extraits obtenus. ---------- 41
Tableau IV.5. Conductivité des extraits obtenus. ---------- 42
Tableau IV.6.Résultat de la recherche des saponines. ---------- 44
Tableau IV.7. Valeurs d'IC50 de l'extrait eau/méthanol (50/50 %)ainsi que celles des standards. ---- 60
Tableau IV.8.Taxonomie des espèces microbienne utilisées.---------- 61
Tableau IV.9.Résultats de l'activité antibactérienne. ---------- 64
Tableau IV.10.Résultats de l'activité antifongique.---------- 66
Tableau IV.11.Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire. ---------- 67
Tableau IV.12.Résultat de l'activité anti-inflammatoire et hémolytique de l'extrait eau/méthanol (50/50 %)…….....…….....……71
Tableau IV.13.Caractère organoleptique de la crème.....…….……..……...…72
Tableau IV.14.Résultats des tests physicochimique de la crème…….....……..…73

Abréviations

DGL	Daphné gniduim.L
PPT	Polyphénols totaux
TPPT	Teneur e polyphénols totaux
AG	Acide gallique
T	température
t	temps
mgEAG/g	Millligramme Equivalent acide gallique par gramme
mn	minute
S/L	Solide / liquide
V	Volume
C	Concentration
pH	Potentiel d'hydrogène
dp	Diamètre de particule
g	Gramme
µg	Microgramme
ml	millilitre
µl	microlitre
UV	Ultraviolet
mgERu/g	Milligramme Equivalent rutine par gramme
TF	Teneur en flavonoïdes
TS	Tension superficielle

$FeCl_3$	Chlorure ferrique
$AlCl_3$	Trichlorure d'aluminium
Na_2CO_3	Carbonate de sodium
K	Facteur de dilution
GR	Globule rouge

CI 50	Concentration inhibitrice 50%
NaCl	Chlorure de sodium
Vs	Volume de l'échantillon
PBS	Tampon phosphate saline
Ru	Rutine
TE	Teneur en eau
rpm	Rotation par minute
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
PKC	Protéine Kinase C
PGE2	Prostaglandine E_2
LPS	Lipopolysaccharide
UVA	Ultraviolet A
UVB	Ultraviolet B
SRB	Sulfate-reducing bacteria

Introduction générale

Depuis l'antiquité, l'homme utilise les plantes qui poussent autour de lui pour se nourrir et se soigner. Il est temps de redécouvrir ces végétaux trop longtemps oubliés, dont nous pouvons mettre à profit les multiples vertus dans notre vie quotidienne. Durant des siècles, nos ancêtres ont accumulé un véritable savoir sur les vertus médicinales des plantes.

En Algérie, l'industrie pharmaceutique, mais également des chimistes cherchent à mieux connaitre le patrimoine des espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle (Zaghouan, 2014). Dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en flore comme l'Algérie, la valorisation de la filière des plantes médicinales est devenue indispensable (Newman et al, 2007). C'est dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine naturel que s'inscrit notre étude.

L'objectif de ce travail est donc de valoriser la plante *Daphné gnidium L* par une contribution à l'extraction de ses biomolécules actives et d'évaluer les propriétés physico-chimiques et médicinales des extraits obtenus.

Pour ce faire, notre mémoire est structuré en deux parties : une partie bibliographique et une partie expérimentale.

La partie bibliographique regroupe trois chapitres :

- Le premier chapitre est relatif à la plante *Daphné gnidium L* notamment une description botanique, composition chimique, propriétés physico-chimiques et propriétés pharmacologiques.
- Dans le deuxième chapitre, nous avons abordé la notion de métabolites secondaires chez les végétaux : définition, classification, propriétés physico-chimiques et biologiques.
- Le troisième chapitre est consacré aux différentes méthodes d'extraction, notamment l'extraction solide-liquide par solvant.

La partie expérimentale est relative à la présentation du matériel et des protocoles expérimentaux utilisés pour l'extraction, la caractérisation des extraits du *Daphné gnidium L* et la recherche de leurs activités antimicrobiennes, anti-inflammatoire et antioxydante ainsi qu'un essai de formulation pharmaceutique contenant ces extraits. Elle englobe aussi tous les résultats obtenus.

Enfin, notre travail est clôturé par une conclusion générale dans laquelle sont récapitulés les principaux résultats obtenus.

I.Daphné garou

I.1.Introduction

Les plantes médicinales sont celles qui renferment une ou plusieurs substances secondaires physiologiquement actives pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de principes actifs utiles (Sofowara, 1996). Donc la valeur d'une plante médicinale dépend de sa richesse plus ou moins grande en un ou plusieurs principes actifs (Debuigne, 1974 ; Georges ,1961 ; Boumediene, 2016). Ces plantes sont donc présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (Moreau, 2003).

Il est peu fréquent que la plante soit utilisée entière ; le plus souvent, il s'agit d'une ou de plusieurs parties définies (feuille, tige, racine etc.) dans le glossaire des termes de pharmacognosie employés dans la Pharmacopée et qui peuvent avoir chacune des utilisations différentes(Vercauteren,2012). Dans notre travail, nous avons choisi la plante Daphné Garou, appelée communément en arabe Lazzaz en vue d'étudier les propriétés physicochimiques de ses extraits.

I.2.Daphné Garou : *Daphné gnidium L*, Lazzaz

Le daphné garou est une espèce appartenant à la famille des *Thyméléacées* (Figure I.1). Il croit dans les garrigues méditerranéennes et les sables atlantiques. Il se trouve dans tout le Tell de l'Algérie (Mohammedi, 2013). La partie la plus utilisée de cette plante est les feuilles.



Figure.I.1.*Daphné gnidium.L*

I.2.1.Description du Daphné Garou

I.2.1.1Noms vernaculaires

Nom français : Garou, Daphné Garou, Thymèle, Saint Bois.

Nom anglais : Flax-leaved Daphne.

Nom arabe : Lazzaz.

I.2.1.2.Description botanique

Le Garou est un arbrisseau vivace, de 60 cm à 2 m de haut ou plus, à tiges nombreuses et dressées de couleur rougeâtre, portant des feuilles d'un vert bleuté, lancéolées, persistantes ou caduques, glabres, linéaires ou ovales-oblongues, aiguës, glanduleuses dessous et terminées par une petite pointe. (Figure.I.2). Les fleurs sont petites, parfumées en panicules terminales. Toutes les inflorescences sont tomenteuses. La période de floraison s'étend d'octobre à mars. Le fruit est une baie charnue, ovoïde, de couleur rouge orangé à maturité (El Fennouni,2012).



Figure.I.2. Daphné garou

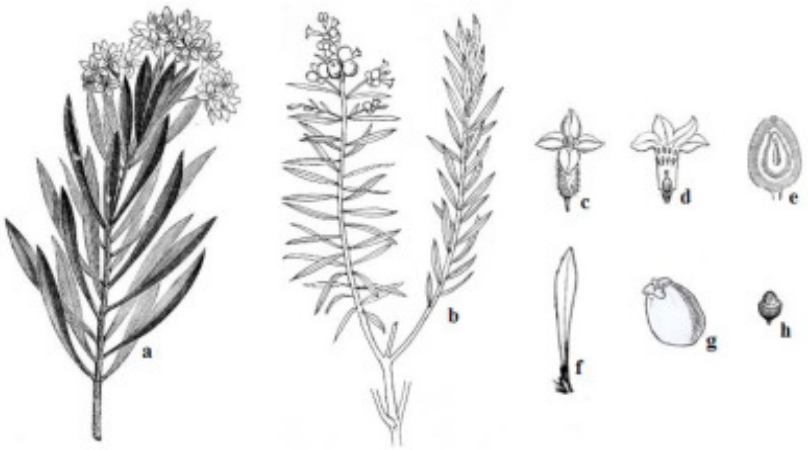


Figure.I.3.*Daphné gnidium* a) branche florifère b) branche fruitière c) fleur entière d) fleur longitudinale e) pistil longitudinal f) feuille g fruit h) drupes de fruits chamus avec une seule graine (Aya Khouchlaa et al, 2021)

I.2.1.3.Systématique

La description systématique du Daphné Garou est donnée dans la figure.I.4

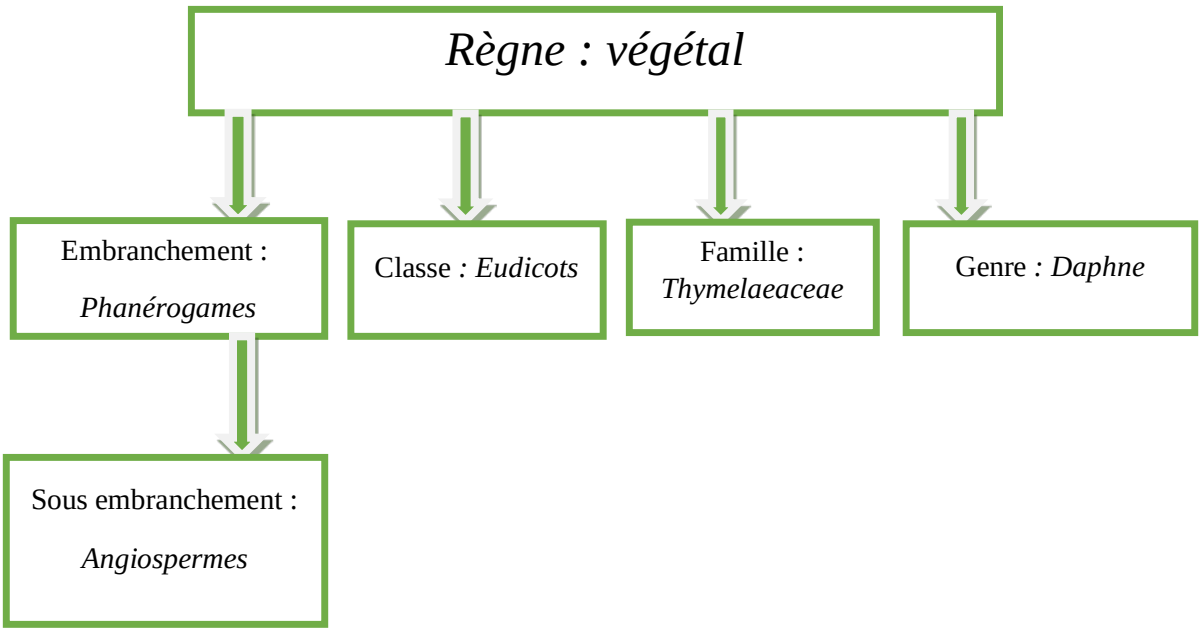


Figure.I.4. Description systématique du Daphné garou. (Mohammedi, 2013)

I.2.2.Composition et propriétés de Daphné Garou

I.2.2.1.Composition chimiques

Le *Daphne gnidium.L*contient principalement (Figure I.5)

- ❖ Des coumarines (Daphnétine, daphnine, acétylimbelliférone, daphnorétine).
- ❖ Des flavonoïdes (lutéolin-3′,7-di-O-glucosidelutéoline, orientine, isoorient quercétine, apigénine-7-O-glucoside, genkwanine, 5-O-b-D-primeverosyl genkwanine, 2, 5, 7,4'- tétrahydroxyisoflavanol).

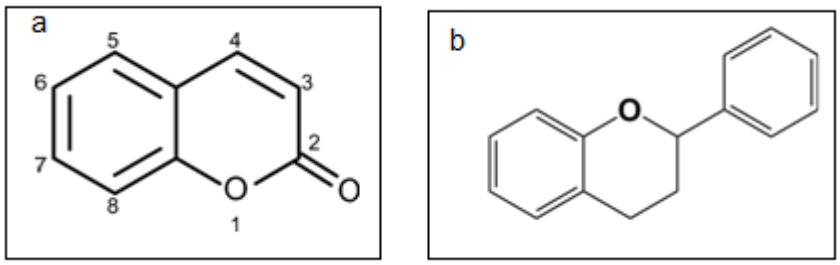


Figure.I.5. Squelette carbonée des coumarines(a) et des flavonoïdes (b).

Les graines et les écorces de différentes espèces de Daphné renferment des diterpènes toxiques, la daphnétoxine (écorce) et la mézéréine (graines).

La composition d'une même espèce peut varier selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée, etc.… Les propriétés peuvent varier également, d'où la nécessité de travailler dans les mêmes conditions, pour avoir la reproductibilité des résultats à l'étape d'analyse et d'identification des molécules que contient une huile ou un extrait. (Mohammedi, 2013)

I.2.2.2.Propriétés pharmacologiques

Les extraits et les huiles essentielles de *D. gnidium L* ont montré la présence des effets pharmacologiques, notamment antiviraux, hémolytiques, anti-inflammatoires, les activités immunomodulatrices, neuroprotectrices et génoprotectrices, ainsi que leurs effets sur l'irritation cutanée, qui sont décrits en détail ci-dessous.

- **Activité antifongique**

L'effet antifongique des extraits de *D. gnidium* a été signalé contre des souches fongiques dans de nombreux travaux. Mohammedi et Atik (2013a, b) ont évalué l'effet antifongique des feuilles des extraits méthanoliques (Algérie) contre *Aspergillus flavus* (MNHN 994294). Les résultats indiquent un effet inhibiteur de l'extrait à 10 µg/mL. Ces résultats suggèrent l'application potentielle de cet extrait dans la protection des céréales et des produits alimentaires de mycélium (forme végétative), les spores et l'aflatoxine B1 produites par *A. flavus*. L'activité de l'extrait aqueux de *D. gnidium*parties aériennes (Maroc)

a été également évaluée contre des isolats fongiques, y compris *Rhynchosporium secalis*, *Alternaria alternate*, *Botrytis cinerea* et *Fusarium oxysporum* (Essouaadi et al. 2015a, b ; Hajji, 2016).

- **Activité antibactérienne**

Allal et ses collaborateurs (Allal et al, 2019) ont mené une vaste étude sur la composition de l'huile essentielle et de l'extrait hydroalcoolique du *D. gnidium* algérien ainsi que sur leurs activités antioxydantes et antimicrobiennes. Ils ont identifié 32 et 99 composants dans l'extrait hydroalcoolique et l'huile essentielle, respectivement, avec un pourcentage élevé de monoterpènes oxygénés, de sesquiterpènes et de composés non oxygénés dans l'huile essentielle.

La comparaison entre l'effet antibactérien de l'extrait de tige, de l'extrait de feuilles, de l'huile essentielle et de l'extrait hydroalcoolique de *D. gnidium,* indique que l'huile essentielle préparée à partir des parties aériennes présente l'effet le plus antibactérien sur les bactéries pathogènes parmi les autres parties testées (Allal et al, 2019)

- **Activité antioxydante**

La recherche d'antioxydants naturels a fait l'objet de nombreuses études sur le *D. gnidium*. Plusieurs groupes de recherche étaient intéressés à quantifier l'activité antioxydante de D. gnidium (Assunta Dessí, 2001 ; Deiana, 2003 ; Dif, 2015 ; Allal 2019 ; Chaabane, 2016 ; Chaves, 2020). Dessí et ses collaborateurs (2001) ont montré que l'extrait méthanol des parties de feuilles de *D. gnidium* (Italie) présentait une activité antioxydante (CI50 = 2,0 µg) dans l'essai examinant l'oxydation de l'acide linoléique et l'autoxydation une oxydation lente qui peut être effectuée par l'oxygène atmosphérique à 37°C. Les mêmes méthodes ont été réalisées par d'autres chercheurs pour montrer la capacité des feuilles et des extraits de tiges à protéger l'acide linoléique contre l'attaque des radicaux libres (in vitro), qui étaient efficaces à 2,5 et 10 µg pour les extraits de feuilles et de tiges respectivement (Deiana,2003).

- **Activité antitumorale**

Plusieurs études ont été effectuées pour évaluer les effets anticancéreux des extraits de *D. gnidium* (Chaouki, 2009, 2015; Chaabane, 2013, 2014, 2016; Sanna, 2015). En effet, Chaouki et al. (2009) ont évalué l'effet de quatre extraits de racines de *D. gnidium* (Maroc) de polarité différente, y compris l'extrait d'hexane, l'extrait de dichlorométhane, l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de méthanol contre les cellules cancéreuses du sein. Ceci a été réalisé en testant l'effet antiprolifératif des différents extraits sur les cellules MCF-7.

L'extrait de dichlorométhane (CI50 = 112± 7 µg/mL après 48 h) a montré la plus forte activité antiproliférante, suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (CI50 = 263± 9 µg/mL après 48 h) et extrait d'hexane (CI50 = 630± 16µg/mL après 48 h), alors que l'extrait de méthanol était inactif.

Chaabane et ses collaborateurs (Chaabane et coll., 2013) ont testé l'activité inhibitrice de quatre produits de feuilles de *D. gnidium* (Tunisie), y compris l'extrait d'acétate d'éthyle, l'extrait total de flavonoïdes oligomères, l'extrait aqueux et l'acétate de β-amyrine, sur la prolifération des cellules de mélanome de souris (B16-F0 et B16-F10). Les produits testés ont inhibé la prolifération cellulaire en fonction de la dose. Après 48 h d'incubation, les valeurs CI50 de l'acétate d'éthyle, de l'oligomère total flavonoïde et des extraits aqueux contre la prolifération des cellules du mélanome B16-F0 étaient de 37,5 ; 62,5 ; 62,5µg/mL, respectivement, tandis que l'acétate de β-amyrine ne dépassait pas 32,54 %. L'analyse du cycle cellulaire a détecté un arrêt de phase G2/M dans les cellules traitées avec des extraits totaux d'oligomères flavonoïdes et d'acétate d'éthyle. Ce dernier a également amélioré la mélanogenèse du mélanome B16-F0.

- **Activité antivirale**

Plusieurs chercheurs ont montré les mécanismes antiviraux de différents composés identifiés à partir d'extraits organiques et aqueux de *D. gnidium.* Chen et Chen, 1996 ; Saraiva et coll., 2001 ; Ho et coll., 2010(Vidal et coll., 2012) ont montré que la daphnétoxine et la daphnoretine présentaient une activité anti-VIH in vitro. De plus, la daphnoretine a supprimé l'expression de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) par le biais de la régulation descendante de PKC (Chen et Chen, 1996 ; Ho et al. 2010).

L'apigénine inhibe la voie cellulaire c-Jun N-terminale kinase (JNK) et empêche l'entrée du virus dans le site interne d'entrée ribosomique (IRES) (Lv et coll., 2014 ; Qian et coll., 2015). Genkwanin a inhibé l'enzyme de transcriptase inverse (RT) du VIH-1 (Ci et coll., 2019), tandis que cette molécule a été évaluée par rapport à un autre virus comme le virus de la pomme de terre M (PVM). Cette molécule a nui aux stades d'attachement et d'internalisation du virus de la peste porcine africaine (ASFV) (Hakobyan et coll., 2019).

- **Activité hémolytique**

Pour évaluer l'effet cytotoxique des extraits de plantes, l'activité hémolytique représente un indicateur de cytotoxicité générale envers les cellules saines normales (Da Silva, 2004). Dans ce contexte, les chercheurs ont mené des recherches in vitro pour évaluer l'effet hémolytique de *D. gnidium* sur les érythrocytes humains (groupes sanguins O) de volontaires en bonne santé. L'extrait méthanolique des feuilles de *D. gnidium* (Algérie) a montré une hémolyse de 7,060 % à 500 µg/mL (Zohra et Fawzia, 2014). Cette activité a également été confirmée in vitro par Ameni et al. (2015). Les résultats ont montré une activité antihémolytique significative avec un pourcentage d'hémolyse (H%) 0%, et 1,9%, respectivement, après 1 h d'incubation.

Cet effet a été attribué aux composés phénoliques qui protègent les érythrocytes du stress oxydatif. Plusieurs chercheurs (Aya Khouchlaa, Naoual El Menyiy , Fatima-Ezzahrae Guaouguaou,2021)ont signalé l'activité antioxydante de *D. gnidium* suggérant l'application potentielle de la plante contre l'hémolyse.

- **Activité anti-inflammatoire**

L'activité anti-inflammatoire des extraits organiques de *D. gnidium* provenant des racines et des feuilles (Maroc et Tunisie, respectivement) a été évaluée in vitro (Chaouki et coll., 2009 ; Harizi et coll., 2011). Chaouki et al. (2009) ont testé l'effet anti-inflammatoire des extraits d'hexane, de dichlorométhane, d'acétate d'éthyle et de méthanol des racines de D. gnidium sur des cellules MCF-7 cultivées. L'extrait de dichlorométhane à 500 µg/mL a inhibé la production de PGE2 de 43,5 %. En 2011, Harizi et al. (2011) ont évalué l'activité anti-inflammatoire in vitro des feuilles de *D. gnidium* extrait d'acétate d'éthyle sur les lignées immunitaires de souris. L'extrait d'acétate de feuilles de cette plante, riche en

polyphénols et en flavonoïdes, a été testé sur des macrophages à des concentrations de 0, 1, 25, 50 et 100 μg/mL. Ils ont signalé une inhibition, liée à la dose, de la fonction pro-inflammatoire des macrophages.

À 50 μg/mL, les extraits d'acétate d'éthyle ont considérablement réduit la production de PGE2 (768 78 pg/mL) par rapport aux cellules traitées au LPS (2677 ±213 pg/mL) et plus de 85 % et 80 % ont été inhibés(Aya Khouchlaa, Naoual El Menyiy , Fatima-Ezzahrae Guaouguaou,2021)

- **Effets sur les lésions cutanées**

L'effet du *D. gnidium* sur les lésions cutanées a été étudié in vivo par Pisarda et al. (1998). Ils ont évalué l'irritation primaire aiguë et la phototoxicité des feuilles et des écorces de l'extrait méthanolique de *D. gnidium* (Italie) sur les lapins. La sensibilisation cutanée a également été évaluée. Les résultats de cette étude ont montré que les feuilles et les écorces ne montraient aucun signe d'irritation après un test épicutané ouvert. Toutefois, l'extrait méthanolique de l'écorce a montré une réaction modérée à l'irritation primaire aiguë, une réaction cutanée photochimique induite et des lésions cutanées graves après une exposition aux rayons UVA et UVB. Tandis que l'extrait de feuilles de *D. gnidium* avait une bonne tolérance cutanée.

- **Autres propriétés**

En plus de leurs activités pharmacologiques, les chercheurs ont rapporté autres effets biologiques des extraits de *D. gnidium*, comme l'activité allélopathique. Ladhari et al. (2011) ont évalué l'effet phytotoxique de l'extrait aqueux de *D. gnidium* des racines, des tiges et des feuilles (Tunisie) sur deux cultures (*Lactuca sativa L.*, et *Raphanus sativus L.*) et deux mauvaises herbes (*Peaganum harmala L.*, et *Scolymus maculatus L.*). Les résultats ont montré que l'extrait aqueux des racines et des feuilles a entraîné une réduction moyenne de la germination des graines (67 % pour les mauvaises herbes et 61 % pour les cultures), tandis que l'extrait des tiges était plus toxique pour *S. maculatus* (chardon) que pour *P. harmala* (peganum) avec une réduction significative de la croissance des semis (73,5% et 51%, respectivement).

Perez Izquierdo et Ocete (1994) ont signalé l'activité insecticide de l'extrait de *D. gnidium*. Les extraits éthanoliques de feuilles de D. gnidium de Dos Hermanas (Séville,

Espagne) ont été étudiés sur *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Les auteurs ont testé l'effet insecticide de l'extrait éthanolique de la plante sur la consommation alimentaire de *L. decemlineata*. Ils ont signalé un degré satisfaisant d'inhibition alimentaire des chrysomèles à des doses de 40 et 30 μg/cm2 avec FR50 = 0,21 0,6 et FR50 = 0,37 0,12, respectivement.

Maistrello et al. (2005) ont également évalué in vitro des extraits éthanoliques, provenant de la même région, à différentes concentrations (1, 2 et 3 g/L) sur le développement de *Xanthogaleruca luteola*. Les auteurs ont testé l'activité insecticide de l'extrait éthanolique de la plante sur la survie, la durée de la phase et le gain de poids de *X. luteola* ajouté à leur alimentation naturelle. Ils ont signalé une réduction significative de la survie des larves, de l'émergence des adultes et du gain de poids avec l'apparition de malformations ainsi qu'une augmentation de la durée de la période larvaire.

D'autres études ont été réalisées par Belbah et al. (2016), et Djouahra-Fahem et al. (2019) sur l'utilisation d'extraits de *D. gnidium* à des fins d'inhibition de la corrosion. En 2016, Belbah et al. (2016) ont testé l'effet de la poudre et de l'extrait de feuilles de *D. gnidium* (Algérie) sur la qualité de l'électrodéposition de nickel du bain de Watts. Les résultats ont montré que la poudre de feuilles de *D. gnidium* inhibait la réaction de réduction du nickel et améliorait la qualité des dépôts aussi efficacement que le glycérol et le formaldéhyde, tandis que l'extrait de feuilles de *D. gnidium* diminuait les micro-fissures des dépôts de nickel. Récemment, Djouahra-Fahem et al. (2019) ont évalué l'extrait méthanolique des parties aériennes de *D. gnidium* (Algérie) par rapport à une biocorrosion causée par le SRB en évaluant l'inhibition de la croissance, la perte de poids et les essais électrochimiques. L'extrait méthanolique a montré une valeur de résistance à la polarisation de 28,9 kΩ cm^2 à une concentration de 0,25 g/L. L'efficacité de protection a augmenté et atteint un pourcentage de 95,99 % à 1,6 g/L (Djouahra-Fahem et coll., 2019).

I.2.2.3.Investigation toxicologique

Le contact de la sève avec la peau peut causer chez certaines personnes des dermatites. L'ingestion des fruits déclenche une ulcération du tube digestif, on observe une violente inflammation de la bouche, avec tuméfaction des lèvres et de la langue, ptyalisme, vomissements. Secondairement s'installe une diarrhée souvent hémorragique avec coliques. Enfin, dans les cas graves, on note l'apparition de signes neurologiques : une ataxie avec convulsions, céphalées et vertiges. Dans les cas plus graves, on assiste à un œdème du

poumon, une néphrite et diminution du rythme cardiaque, jusqu'au point de causer la mort (Ferrari, 2002 ; EL Fennouni, 2012).

Afin de mettre en évidence la toxicité de l'extrait aqueux de feuilles de *D. gnidium*, Benhissen et al. (2015) ont évalué l'effet de cet extrait à trois concentrations différentes. (27, 60 et 100 g/L) sur la mortalité des larves du quatrième stade de Culex pipiens (L4) pendant 15 jours. Ils ont déterminé les doses létales de 100 (DL100), les concentrations létales et les temps létaux (CL50 %, CL90 %, LT50 % et LT90 %). Les auteurs ont également évalué l'effet de l'extrait aqueux, à la dose la plus faible (27 g/L), sur la fécondité et la fertilité des femelles adultes de Culex pipiens *D. gnidium*a causé un taux de mortalité élevé selon les concentrations utilisées et le temps d'exposition. Le taux de mortalité a atteint 75,31 %, 84,26 % et 84,26 % à la fin du 15ème jour du traitement pour les concentrations 27, 60 et 100 g/L, respectivement, avec une corrélation entre les doses utilisées et les taux de mortalité des larves L4 traitées pour 48, 125, et 240 h. En ce qui concerne les paramètres toxicologiques, les valeurs de la CL50 % variaient entre 380,19 et 6,08 g/L, tandis que celles de la CL90 % variaient entre1862,08 et 4,48 g/L. Pour les temps létaux, la LT50 % était de 13, 5 et 3 jours pour les concentrations 27, 60 et 100 g/L, respectivement, alors que la LT90 % était de 47, 8 et 6 jours pour les concentrations 27, 60 et 100 g/L, respectivement. Le traitement avec une dose sublétale de l'extrait a perturbé la fécondité et la fertilité des femelles adultes ainsi que la production d'œufs.

En 2016, Chaabane et ses collaborateurs ont étudié la toxicité aiguë de deux extraits à plusieurs doses chez la souris (Chaabane et al. 2016a, 2016b). Les animaux ont reçu différentes doses d'extrait de méthanol de feuilles de *D. gnidium* (Tunisie) (150, 250, 350, 500 et 800 mg/kg.) sur une période de sept jours, afin de déterminer la dose létale médiane (DL50). Les pourcentages de mortalité étaient de 25 %, 50 %, 75 % et 100 % à des doses de 150, 350, 500 et 800 mg/kg, respectivement, et une valeur estimée de la DL50 de 350 mg/kg (Chaabane et coll., 2016a). Dans la deuxième expérience, cinq groupes de souris ont également reçu plusieurs doses de l'extrait aqueux des parties aériennes de *D. gnidium* (100, 200, 300, 500 et 600 mg/kg) (Tunisie). Aucune mortalité n'a été observée aux différentes doses testées (Chaabane et coll., 2016c). Ces paramètres indiquent que les différentes parties de cette plante n'ont pas montré d'effets secondaires graves par rapport aux doses testées et que d'autres études de toxicité chronique sont nécessaires pour explorer les effets nocifs de l'utilisation de D. gnidium pendant longtemps.

II.Métabolites secondaire

II.1.Introduction

On désigne par « métabolite secondaire » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Paropposition, les métabolites primaires sont directement impliqués dans les grandes voies du métabolisme basalde la cellule. Chez les végétaux, les métabolites secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tel que les polyphénols, les terpènes et stérols, les alcaloïdes, etc. Ces métabolites secondaires se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus végétaux (Bourgaud, 2013).

Les métabolites secondaires ont une répartition limitée, dans la plante elle-même. Ils sont typiquement produits dans un organe, tissu ou type cellulaire spécifique à des stades particuliers du développement (par exemple durant le développement de la fleur, du fruit, de la graine ou de la plantule). Ils sont souvent synthétisés dans une partie de la plante et stockés dans les vacuoles d'une autre partie. En outre, leur concentration dans la plante varie souvent dans de grandes proportions au cours d'une période de 24 heures (Raven et al. 2003).

En ce qui concerne leurs fonctions chez les plantes, les métabolites secondaires exercent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement. Ils assurent des fonctions clés dans la résistance aux contraintes biotiques (phytopathogènes, herbivores, etc.) et abiotiques (UV, température, etc.). Sur le plan agronomique, le rôle de ces composés dans la protection des cultures est connu (résistance aux maladies cryptogamiques, aux infections bactériennes, à certains insectes), mais a été relativement peu exploité concernant le développement de variétés résistantes. Ces métabolites secondaires constituent, aujourd'hui, un des leviers d'une possible intensification écologique de l'agriculture, en substituant notamment l'usage d'intrants chimiques par des mécanismes de défense naturelle des plantes.

D'un point de vue pharmacologique, les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés chimiques présents chez les végétaux. On estime aujourd'hui qu'environ 1/3 des médicaments, actuellement sur le marché, contiennent au moins une telle substance végétale. Cette efficacité pharmacologique des métabolites

secondaires s'est traduite par le développement de médicaments majeurs sur les 30 dernières années, tel que le Taxotère ou la Vinorelbine, utilisés dans le traitement de certains cancers (Bourgaud, 2013).

II.2. Classification des métabolites secondaires

Il y a trois classes principales de métabolites secondaires chez les plantes : les substances phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (Raven et al. 2003).

II.2.1.Composés phénoliques

II.2.1.1.Définition

L'appellation «polyphénols» ou «composés phénoliques» regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules. Ils sont divisés en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Figure II.1.) Hennebelle et al., 2004). Allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins, ils sont synthétisés par l'ensemble des végétaux et ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences).

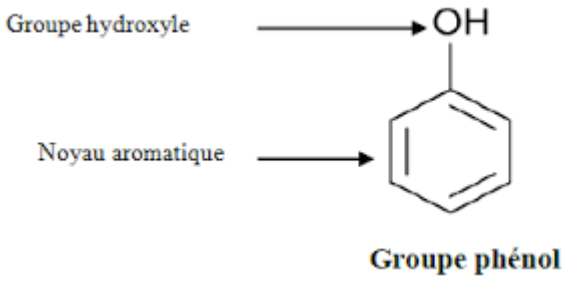


Figure.II.1. Structure chimique des polyphénols

Les polyphénols sont les antioxydants les plus présents dans la nature et aussi dans nos assiettes. Ils permettent aux plantes de se défendre contre les phénomènes d'oxydation, certaines agressions extérieures et contre le pourrissement (Menat, 2006). Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui

varient entre les différents tissus. Certains sont des précurseurs de polymères pariétaux, comme la lignine et la subérine. D'autres sont des polymères intracellulaires tels que les tanins condensés et les tanins hydrolysables (Regnault-Roger et al. 2008).

II.2.1.2.Classification

Les composés phénoliques (ou polyphénols) représentent un groupe de métabolites secondaires complexe comportant plusieurs familles (Figure6) :dérivés des acides benzoïque et cinnamique, flavonols, flavones, isoflavanones, flavanes, flavanones, chalcones, aurones et stilbène.

Les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les non flavonoïdes (acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques, les stilbènes et les tannins hydrolysables) et les flavonoïdes (Chira et al. 2008 ; Peti et al. 2009).

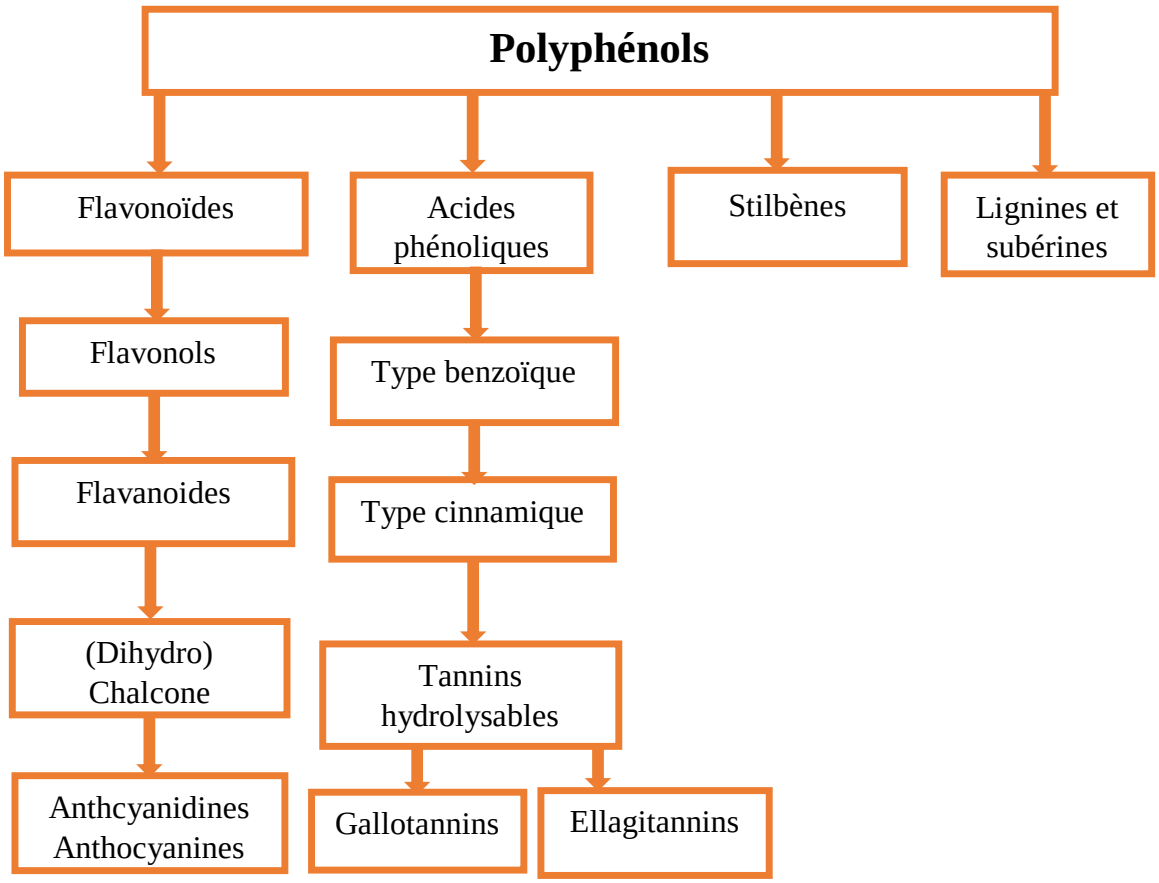


Figure II.2 : Différentes familles de polyphénols (Collin et Crouzet, 2011).

- **Polyphenols simples**

- **Acides phénoliques**

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Figure.II.3).Ilssont représentés par deux sous-classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (Bruneton, 2008).

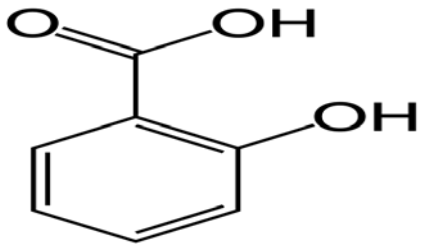


Figure.II.3. Structure de l'acide phénolique

- **Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)**

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides (Bruneton, 2008 ; Skerget et al., 2005). Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais (Manach et al., 2004).

- **Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)**

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés (Skerget et al., 2005) et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, Oarylglucosides) ou des polyols tels que l'acide quinique.

L'acide caféique (Figure.II.4)est le principal représentant de cette catégorie. Il est présent dans de nombreux végétaux (graine de café, tomate, olive, pomme), en particulier dans les fruits. Il représente 75 à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits, principalement sous forme d'ester de l'acide quinique (acide chlorogénique) (Manach et al., 2004). L'acide chlorogénique est présent en très forte concentration dans la pomme (430 mg/kg) et dans le café, (Manach et al., 2004).

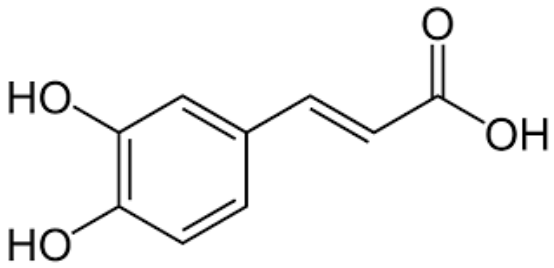


Figure.II.4. Structure chimique de l'acide caféique

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 (Figure.II.5)(Ghedira, 2005). Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Crozier, 2003). Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 4, 5 et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides (Chira et al., 2008).

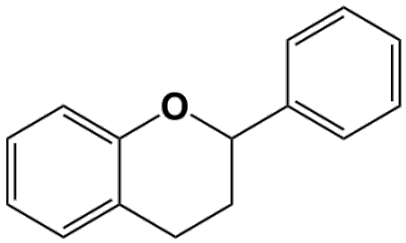


Figure.II.5. Structure chimique des flavonoïdes

- **Flavanones**

Les flavanones sont caractérisées par l’absence de la double liaison entre C2 et C3 et par la présence d’un centre de chiralité en C2 (Figure.II.6) (Bruneton, 2008 ; Chira et al., 2008).

Les agrumes constituent la principale source alimentaire de flavanones. Les principaux aglycones sont l'ériodictyol dans le citron, la naringénine dans le pamplemousse et l'hespéritine dans l'orange (Manach et al., 2004).

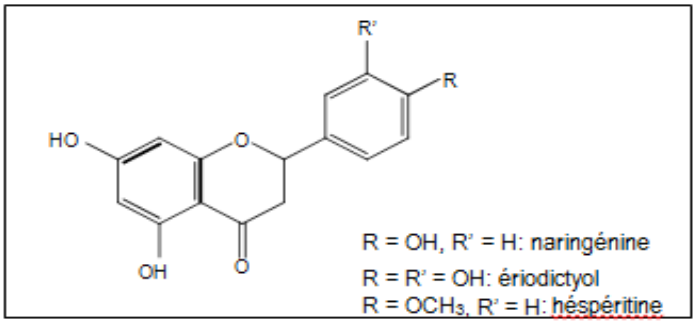


Figure.II.6. Structure chimique des flavonones (Crozier, 2003)

- **Flavonols**

Les flavonols se distinguent par la présence d'un groupement OH en position C3 et d'une double liaison en C2-C3 Ils existent soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Les sucres les plus souvent impliqués sont des aldoses: D-glucose et L rhamnose (Crozier, 2003). Leurs principaux représentants sont la quercétine,le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches sont les oignons (350-1200mg/kg de matière fraiche) (Hertog et al., 1992), le poireau, le chou et les baies telles que le cassis (115 mg/kg de matière fraiche) (Hakkinen et al., 1999). Le thé contient aussi des flavonols à hauteur de 45 mg/L (Hertog et al., 1993).

- **Flavan-3 ols**

Les flavan-3-ols ou dérivés de catéchine sont la catégorie de flavonoïdes la plus complexe. Ces composés vont des simples monomères, catéchine et son isomère épicatéchine, jusqu'aux oligomères et polymères, les proanthocyanidines. De plus, les flavan-3- ols peuvent être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines (épicatéchine gallate, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate) (Figure.II.7) (Chira et al., 2008).

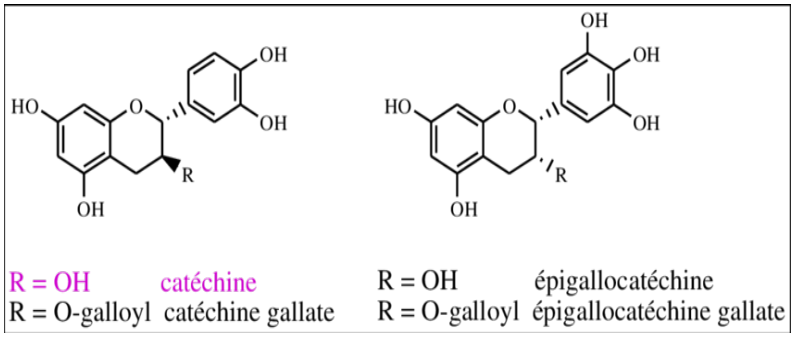


Figure.II.7: Structures chimiques de certains flavan-3-ols (chira et al., 2008)

- **Anthocyanosides**

Les anthocyanes ou pigments anthocyaniques sont des composés hydrosolubles, de teinte rouge, violette ou bleue, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Les anthocyanes (Figure.II.8) sont présents dans la nature uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides. Ces pigments sont très répandus dans le règne végétal et proche des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques (Catier et Roux, 2007). Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavon» généralement glucosylé en position C3 (Bruneton, 2009).

Les anthocyanosides, dont les couleurs vives attirent les insectes et les oiseaux, jouent un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion des graines. Un fort pouvoir colorant et l'absence de toxicité font de ces hétérosides des colorants naturels susceptibles de remplacer, dans l'industrie alimentaire, les colorants synthétiques : leur innocuité et leur acceptabilité par le consommateur compensent leur instabilité (pH, température, lumière) et leur coût de production parfois élevé (Bruneton, 2009).

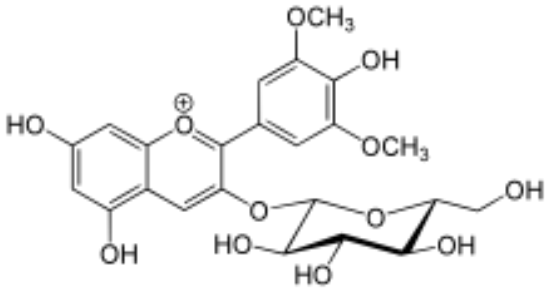


Figure.II.8. Structure chimique des anthocyanes

- **Polyphénols complexes (tanins)**

➢ **Tannins**

Ces composés résultent généralement de la condensation des formes simples des flavonoïdes (Figure.II.9). Selon la nature des constituants impliqués et le type de condensation, il est classique de distinguer deux grands groupes de tannins différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Reed, 1995 ; Khanbabaee et Ree, 2001).

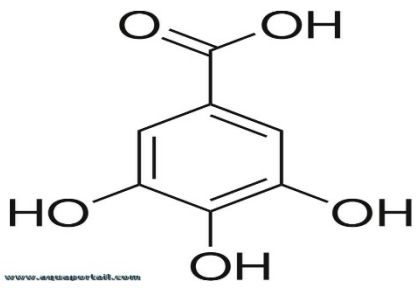


Figure.II.9. Structure chimique des tanins

➢ **Tanins hydrolysables**

Ce sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable de molécules d'acides phénols, le sucre est généralement le glucose (Figure.II.10). Les tannins hydrolysables sont scindés en deux groupes : les tannins galliques ou gallotannins qui donnent par hydrolyse des sucres et uniquement de l'acide gallique, et les tannins ellagiques dont l'hydrolyse donne en plus des sucres et de l'acide gallique, de l'acide éllagique. (Richeter, 1993).

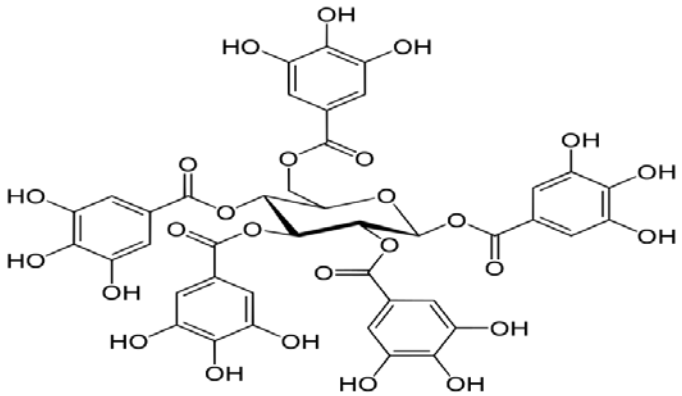


Figure.II.10. Structure chimique des tanins hydrolysables

- **Tannins condensés**

Ils sont constitués par la polymérisation de molécules élémentaires qui possèdent des structures générales des flavonoïdes dont les plus importantes sont les flavan-3-ols (catéchines), et les flavan-3-4-diols (leucoanthocyanidines) (Figure.II.11). (Hagerman, 2002). La copolymérisation des catéchines et leucoanthocyanidines est également possible (Nazck et Shahidi, 2004).

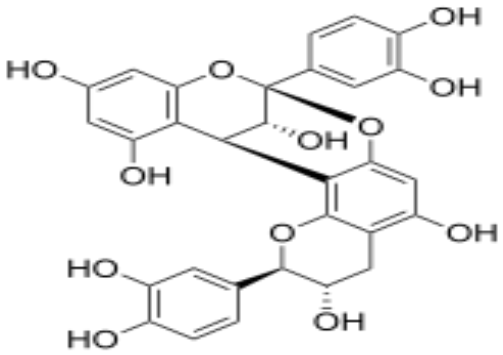


Figure.II.11. Structure chimique des tanins condensés

- **Quinones**

Les quinones sont des composés oxygénés qui résultent de l'oxydation de dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou par un motif 1,2- dicétocyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones) (Figure.II.12). La di-one peut être conjuguée aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé : naphtalène (naphtoquinones), anthracène (anthraquinones), naphtodianthrène (naphtodianthrone)... (Bruneton, 2009).

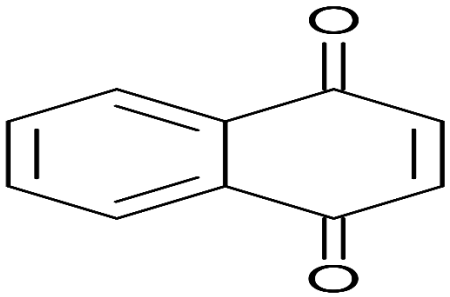


Figure.II.12. Structure chimique des quinones

- **Coumarines**

Les coumarines sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide coumarique (Figure.II.13). Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor, 2002). Elles sont cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées.

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. L'odeur de foin fraîchement coupé de la coumarine est très utilisée en parfumerie et dans les produits cosmétiques (Kansole, 2009).

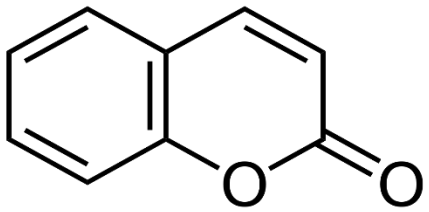


Figure.II.13. Structure chimique des coumarines

II.2.1.3.Propriétés des composés phénoliques

A. Propriétés physicochimiques

La présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal. Les polyphénols sont généralement extraits, selon leur solubilité, par les solvants polaires tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone et l'eau. Cependant, cette solubilité varie d'une classe de composés à une autre dépendant des substitutions (méthylation ou glycosylation) sur les groupements hydroxyles (Macheix et al., 2005 ; Naczk et Shahidi, 2006).

Tous les composés phénoliques des végétaux absorbent dans l'UV et certains d'entre eux comme les anthocyanes, flavonols, chalcones et aurones absorbent dans le visible et participent alors à la coloration des organes végétaux (fleurs, fruits…) (Macheix et al., 2005).

B. Propriétés biologiques

Certaines plantes et épices font partie de la pharmacopée traditionnelle asiatique depuis des siècles, mais ce n'est que récemment que les études scientifiques ont permis de confirmer ces propriétés médicinales attribuées aux polyphénols. Il a été reconnu que les flavonoïdes possédaient des activités anti-inflammatoire, antiallergique, hépatoprotectrice, antithrombotique, antivirale et anticarcinogène.

L'activité antioxydante des composés phénoliques est la mieux connue et provient de leur haute réactivité. Ils agissent comme donneurs de protons ou d'électrons et piègent les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (·OH), superoxydes (O2·-) et radicaux peroxylipidiques. De plus, les dérivés sont stables (Ghedira, 2005).

Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer les effets délétères des substances oxydantes (Pietta, 2000).

Les flavonoïdes peuvent inhiber plusieurs enzymes telles que : les hydrolases, oxydoréductases, ADN synthétases, ARN polymérases, phosphatases, protéinephosphokinases, oxygénases, et aminoacide oxidases. Certaines enzymes sont impliquées dans le stress oxydant (enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase et la lipo-oxygénase). Il a été démontré que certains flavonoïdes comme l'apigenine, la quercétine et la myricétine inhibent fortement la xanthine oxydase (Havsteen, 2002).

III..1.Introduction

L'extraction est le processus de séparation en génie chimique. Elle est utilisée pour extraire sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange initial en fonction de propriétés physicochimiques.

En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du composé, de la nature de l'échantillon et de son état physique. Quelle que soit la technique choisie, l'optimisation des conditions d'extraction peut varier en fonction de la préparation de l'échantillon. Il existe de nombreuses méthodes d'extraction.

III.2.Types d'extraction

III.2.1.Pressage

L'extraction par pression est un procédé permettant l'extraction de l'huile des graines et des noix qui ne fait pas appel à des composés chimiques. Il s'agit d'une méthode naturelle d'extraction de l'huile d'une matière première qui implique une extraction sous haute pression en une seule étape.

Cette méthode se veut une solution de rechange plus saine à la méthode d'extraction chimique à l'hexane utilisée pour l'extraction de plusieurs huiles conventionnelles. A l'aide d'une presse, presser les organes ou les parties de la plante en question pour en extraire le jus.

III.2.2.Décoction

Cette méthode convient principalement aux parties souterraines des plantes, telles que les racines et l'écorce, dont les principes actifs sont difficiles à libérer pendant le processus de trempage. Il s'agit d'extraire des composés d'intérêt de la plante en la trempant dans de l'eau puis en la faisant bouillir (Sellal, 2019)

III.2.3. Macération

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste à mettre en contact le matériel végétal avec le solvant pendant une durée bien déterminée et à température ambiante ou à température élevée, avec ou sans agitation (Figure.III.1). Cette

technique est basée sur la solubilité du composé biologiquement actif dans le solvant d'extraction. (Sellal, 2019)



Figure.III.1. Schéma d'un montage de macération

III.2.4.Infusion

L'extraction par infusion implique l'utilisation d'eau chaude. Cette technique est simple, n'utilise aucun solvant et limite la croissance bactérienne, mais elle peut extraire de grandes quantités d'extrait et prendre beaucoup de temps. (Sellal, 2019)

III.2.5.Extraction par solvant

Il s'agit de faire couler la substance à extraire dans un solvant en la dissolvant. Il peut s'agir d'eau, mais il s'agit généralement d'un solvant organique : éthanol, cyclohexane, éther de pétrole, toluène, etc. Dans l'extraction par solvant, les plantes sont mélangées à un solvant. Le composé à extraire est piégé dans la cellule par la membrane cellulaire et nécessite donc un solvant pouvant la traverser. De plus, des traces de solvants peuvent être présentes dans les molécules à extraire ou dans la matière végétale transformée. (Sellal, 2019)

Le choix du solvant suit trois critères et nécessite la connaissance des propriétés des paramètres physique du solvant.

- Etat physique du solvant : Le solvant doit être liquide à la température et à la pression auxquelles l'extraction est effectuée.
- Miscibilité : Le solvant doit être non miscible avec la phase qui contenait à l'origine le composé à extraire.

- Solubilité : Le composé à extraire doit être soluble dans le solvant. C'est -à-dire que la solubilité dans le solvant est beaucoup plus élevée que dans le milieu dans lequel il a été trouvé à l'origine (généralement un milieu aqueux).
- Densité du solvant : Il est nécessaire de connaitre ce paramètre car il détermine si la phase organique contenant le composé à extraire est au-dessus ou au-dessous de la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter.

Le solvant d'extraction doit également être :

- Facile à éliminer après extraction, d'où un point d'ébullition bas. Leur point d'ébullition doit être plus éloigné possible du point d'ébullition du produit à extraire.
- Chimiquement inerte vis-à-vis de la solution à extraire.
- Non toxique

L'extraction par solvant organique s'effectue comme suit :

III.2.5.1.Extraction au soxhlet

L'appareil soxhlet (Figure.II.2). Se compose de trois parties : le ballon contenant le solvant, l'extracteur et le réfrigérant. La cartouche en cellulose, contenant l'échantillon de plante broyé, est placée dans l'extracteur en verre. Le ballon est chauffé grâce à une source de chaleur (chauffe ballon, bain de sable, …). Lors de l'ébullition, les vapeurs passent par le tube de dérivation et se condensent dans le réfrigérant. Le solvant liquide arrive ensuite dans la cartouche et extrait peu à peu les composés solubles. Lorsqu'une partie du solvant, enrichie par les composés extraits, commence à retourner dans le ballon par le tube, une dépression se crée au niveau du tube capillaire, puis tout le liquide contenu dans l'extracteur revient dans le ballon. A nouveau, le solvant bout et contribue à une deuxième extraction suivit par un deuxième siphonage, et ainsi de suite. Cette manipulation est menée en continu pendant suffisamment de temps pour que tout le composé à extraire se retrouve dans le ballon. Il suffit, alors de récupérer le contenu du ballon puis d'évaporer le solvant (Sellal, 2019)

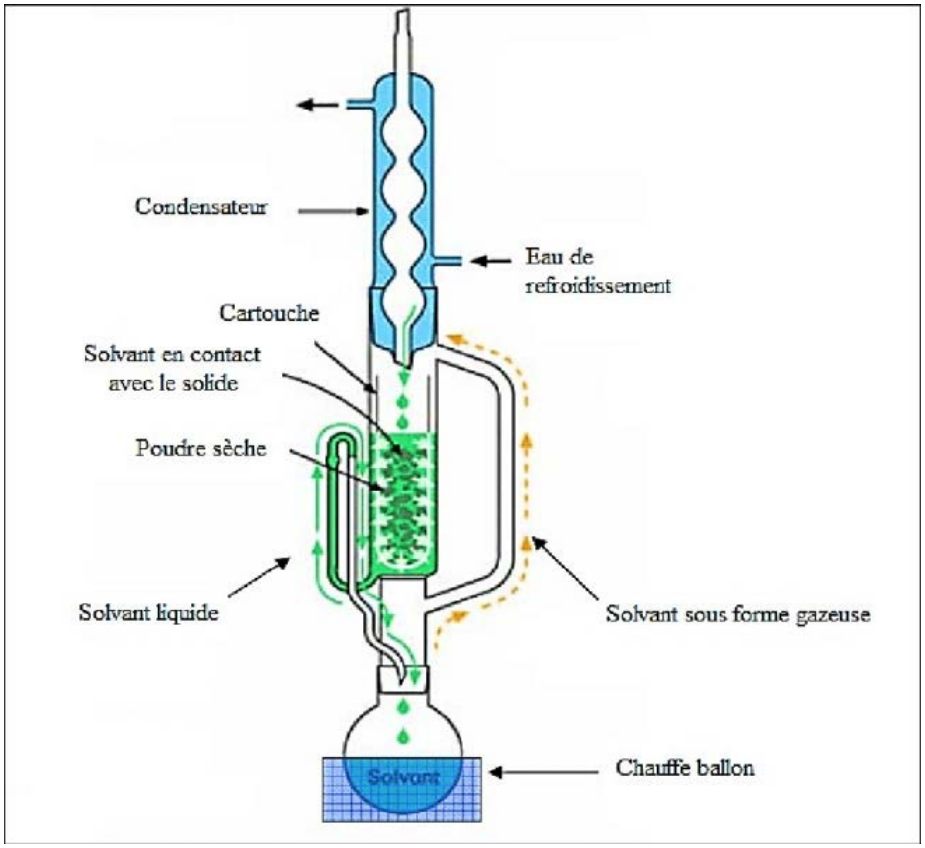


Figure.III.2. Schéma d'un montage de l'extraction au soxhlet

III.2.5.2.Extraction à reflux

C'est une méthode d'extraction solide-liquide qui consiste à mettre l'échantillon finement divisé, en contact d'un solvant adéquat à température donnée, pendant un temps plus au moins long et sous agitation comme montre la figure.III.3. (Sellal, 2019)

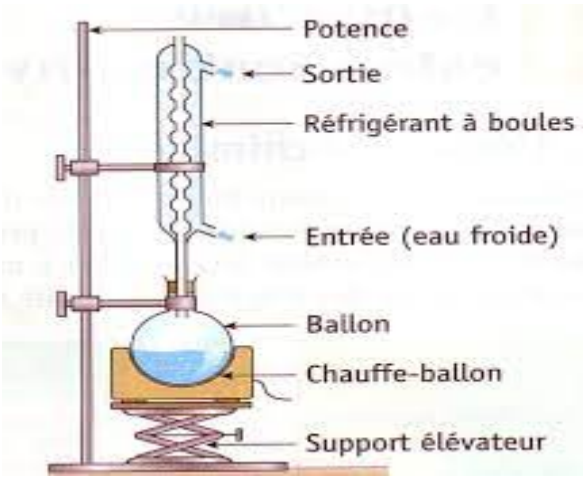


Figure.III.3. Schéma d'un montage de l'extraction à reflux

III.2.6.Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est l'une des techniques de préparation d'échantillons les plus anciennes. C'est une opération fondamentale de transfert de matière entre deux phases liquides non miscibles, sans transfert de chaleur. Cette technique permet d'extraire une substance dissoute dans un solvant, à l'aide d'un autre solvant, appelé solvant d'extraction, dans lequel elle est plus soluble. Le solvant initial et le solvant d'extraction ne doivent pas être miscibles. L'extraction liquide-liquide est réalisée par le contact intime du solvant avec la solution dans des appareils destinés à mélanger les deux phases (ampoules, colonnes, mélangeurs). La séparation des phases s'obtient par décantation gravimétrique ou centrifuge.

On distingue deux types d'extraction liquide-liquide :

- Extraction liquide-liquide discontinue (Figure.III.4). Elle est réalisée grâce à des ampoules à décanter.
- Extraction liquide-liquide continue : Lorsque le produit à isoler est relativement soluble dans la phase à extraire, l'extraction discontinue peut se révéler insuffisante. On peut alors utiliser une méthode d'extraction en continu. Le solvant est recyclé et passe continuellement à travers la solution à extraire.
-

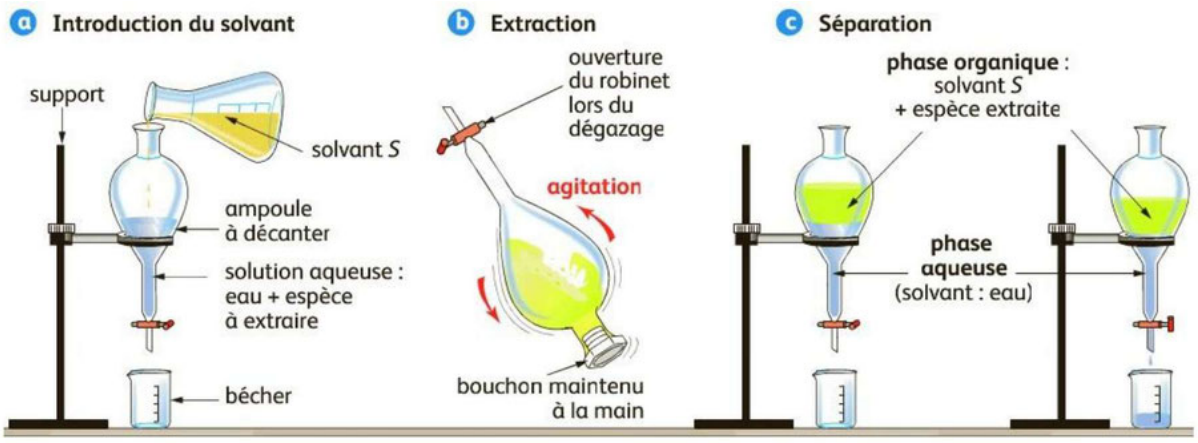


Figure.III.4. Schéma d'in montage d'une extraction liquide-liquide.

III.2.7.Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est un phénomène lent qui permet d'extraire une substance présente dans un solide pour la faire passer dans un solvant liquide (Sellal, 2019)

III.2.7.1.Hydrodistillation

C'est une méthode largement utilisée pour extraire les huiles essentielles. Elle montre ses limites lorsque les molécules à extraire sont fragiles et ne résistent pas à l'échauffement. Le processus consiste à immerger le matériel végétal dans un bain d'eau (Figure.III.5).

L'ensemble est ensuite bouilli, généralement à pression atmosphérique. La chaleur fait éclater le sac d'huile et les molécules odorantes qu'il contient sont libérées. Ces molécules aromatiques forment un azéotrope avec la vapeur d'eau. (Sellal, 2019)

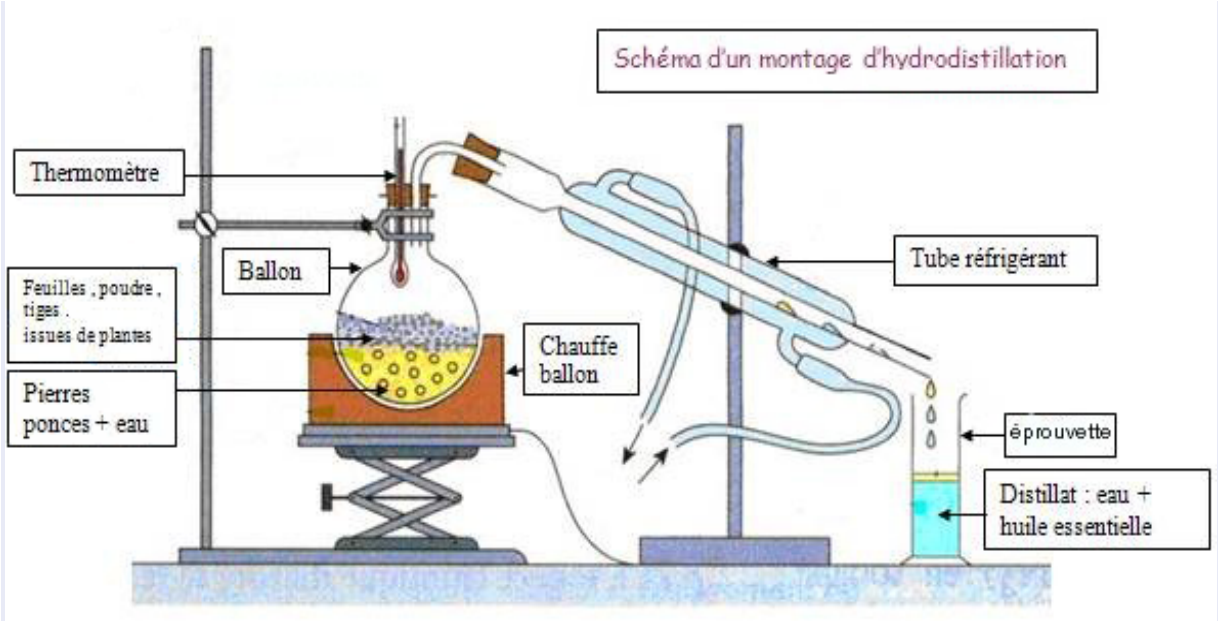


Figure.III.5. Schéma d'un montage d'une extraction par hydro distillation

III.2.7.2.Entrainement à la vapeur

L'entrainement à la vapeur est réalisé en déposant les parties de la plante utilisées sur des grilles dans un récipient appelé alambic, sans que le matériel végétal ne soit en contact avec l'eau. La vapeur d'eau produite par une chaudière traverse les fruits. Ainsi les huiles parfumées contenues dans ces fruits se mélangent à la vapeur d'eau. Celle-ci s'élève alors et entraine avec elle les parfums. Au contact du froid, la vapeur parfumée se condense et devient liquide. Ce liquide tombe dans un vase florentin, l'huile essentielle est ensuite séparée par décantation (Sellal, 2019)

III.2.8.Extraction assistée par micro-ondes

Contrairement à un chauffage classique, c'est le produit traité qui est la source de chaleur. Le dégagement de chaleur s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Le champ magnétique de haute fréquence (2,45 GHz), appliqué dans le four micro-ondes, permet un échauffement, un frottement entre les dipôles, qui conduit ensuite à un dégagement de chaleur (Sellal, 2019). Le principe est appliqué à plusieurs méthodes conventionnelles parmi lesquelles nous citons :

- Extraction par solvant assistée par micro-ondes (Figure.III.6).
- Entrainement à l'air assisté par micro-ondes ;
- Hydrodistillation assistée par micro-ondes ;
- Extraction sans solvant assistée par micro-ondes.

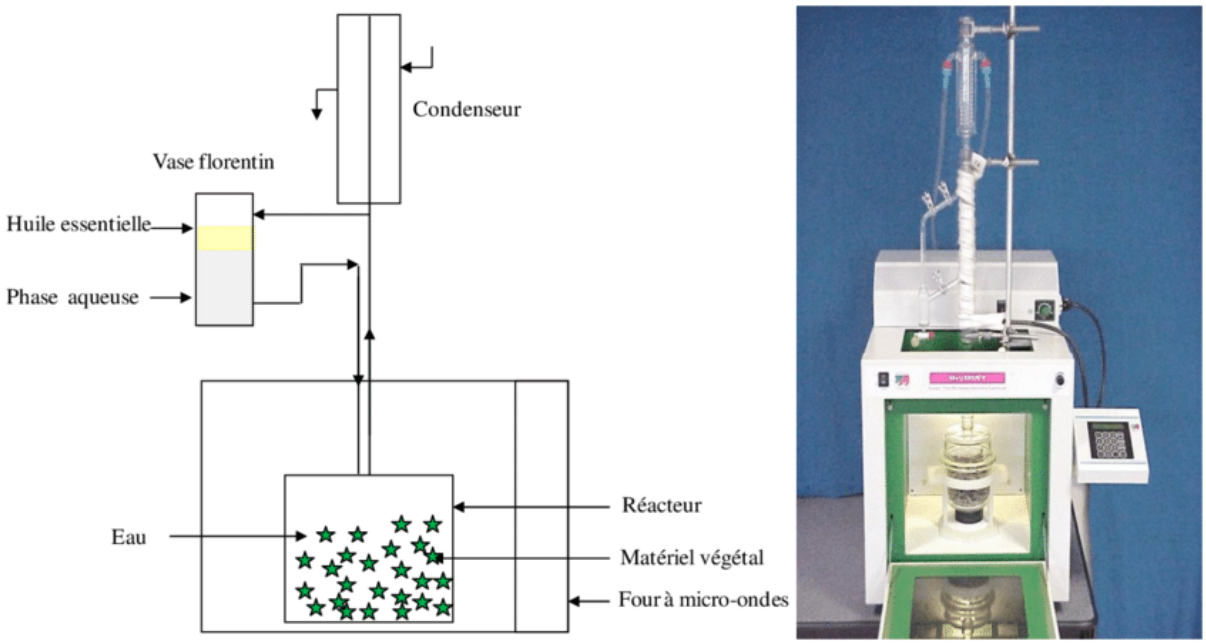


Figure.III.6. Schéma d'un montage d'une extraction assistée par micro-ondes

III.2.8.1.Extraction par ultrasons

L'extraction de composés biologiquement actifs par ultrasons (20-100 kHz) est une technique des technologies émergentes qui offrent une reproductibilité massive dans un court laps de temps, trois fois plus vite plutôt qu'une simple extraction par solvant. Facile à mettre en œuvre et faible consommation de solvant et d'énergie. En effet, l'immersion des matières premières dans l'eau ou dans un solvant, est également soumise à l'action des ondes ultrasonores (Figure.III.7) (Sellal, 2019)



Figure III.7.Schéma d'un montage d'une extraction par ultrasons

Cette technologie peut être utilisée pour extraire des composés aromatiques ou des essences de plante, mais elle a été principalement développé pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (Sellal, 2019)

III.2.9.Techniques chimiques et enzymatiques

Ces techniques comprennent la lyse ou le choc osmotique, la modification de la force ionique ou de pH et lyse enzymatique (Sellal, 2019)

III.2.9.1.Lyse ou choc osmotique

Le choc osmotique consiste à cultiver des cellules fragiles dans une solution hypotonique, permettant à l'eau de pénétrer dans les cellules, les faisant gonfler jusqu'à ce que la membrane lipidique se rompe et permette à son contenu de pénétrer dans le milieu. La perturbation des organites est un inconvénient de cette technique (Sellal, 2019)

III.2.9.2.Modification de la force ionique ou du pH

La modification de la force ionique du milieu en ajoutant des ions ou en modifiant le pH peut entrainer la rupture de la membrane plasmique dans certains types de cellules. Ces traitements peuvent rendre la membrane plus perméable aux composants du milieu (Sellal, 2019)

III.2.9.3.Lyse enzymatique

Pour lyser les parois cellulaires qui protègent la membrane plasmique de plusieurs cellules (levures, plantes et bactéries), différentes enzymes peuvent être utilisées, comme le lysozyme du blanc d'œuf (Sellal, 2019)

IV.1.Introduction

Ce travail, qui a été réalisé au niveau du laboratoire de chimie de la faculté des sciences de l'université de Médéa et laboratoire physico-chimique et microbiologie de groupe SAIDAL -Dar El-Beida- d'Alger, a pour objectif l'extraction des composés phénoliques à partir d'une plante très connue en médecine traditionnelle par ses propriétés pharmacologiques (anti virale, antifongique…). Il s'agit de Daphné Garou poussée au niveau de la wilaya de Médéa.

Une étude phytochimique des espèces végétales passe généralement par la récolte de la plante et sa conservation, puis le broyage et/ou préparation pour l'extraction. Enfin, le matériau est prêt pour l'extraction et la caractérisation des extraits.

Pour ce faire, notre partie expérimentale est structurée comme suit :

- Préparation et caractérisation de la matière végétale ;
- Extraction des composés phénoliques ;
- Caractérisation physicochimique des extraits obtenus ;
- Analyse qualitative et quantitative des extraits obtenus ;
- Etude des activités antioxydante, antibactérienne, antifongique et anti-inflammatoire ;
- Formulation d'une crème antifongique à base des extraits obtenus.

IV.2. Matériel et produit

Les différents produits et matériels utilisés lors de la réalisation de la partie expérimentale sont regroupés dans le tableau IV.1.

Tableau.IV.1: Matériel et produit.

Produits	Matériels
• Ethanol • Méthanol • Eau distillée • Folin-Ciocalteu • Bicarbonate de sodium Na_2CO_3 • Rutine hydraté (pureté ≥94%) • Chlorure d'aluminium $ALCL_3$ • Acide gallique Sigma (97.5-102.5%) • Acide sulfurique H_2SO_4 • Perchlorure ferrique $FeCl_3$ • DPPH Sigma (0.5%) • Bleu de méthylène • Chlorure de sodium NaCl • Solution tampon phosphatée (PBS) • Eau physiologique • Milieu culture Mueller-Hinton • Sabouraud • Sang (A+)	• Plaque chauffante et barreau magnétique. • Centrifugeuse type Hettich ba21 • Etuve. • Spectrophotomètre Uv-vis Cintra 303 Shimadzu GBC V4074 • Tensiomètre Du Nouy • pH- mètre (Selecta P) • Conductimètre (Selecta P) • Tamiseuse (Controlab) • Viscosimètre • Thermomètre • Balance électronique de précision • Bec Bunsen • Autoclave • Papier filtre • Béchers, Eprouvette graduée,Tubes à essais, Fioles jaugés, Micropipette • Boite de Petri • Ecouvillons • Disque en papier absorbant de diamètre 9mm • Pince

IV.2.1.Matériel et produit biologique

Le matériel biologique utilisé est les feuilles de *Daphné gnidium L,* récoltées au niveau de région d'Ouzera (Wilaya Médéa).Cette biomasse est notée DGL.

Les souches bactériennes utilisées, fournies par SAIDAL, sont : *Escherichia coli, Bacillus subtilis* et*Staphulococcus aureus.*

Concernant les souches fongiques, nous avons utilisé une levure fournie par SAIDAL :

Saccharomyces cerevisiae.

IV .3. Préparation et caractérisation physicochimique de *Daphné gnidium L*

IV.3.1. Séchage de la matière végétale

Les feuilles de DGL ont été récoltées en mois de Septembre dans la région d'Ouzera, wilaya de Médéa, elles ont été lavées à l'eau de robinet et séchées à l'air libre puis conservées dans des sacs en plastique dans un endroit sec jusqu'à utilisation.

Les feuilles de la planteconservée ontété lavées avec l'eau distillée et séchées pendant 24 heures.Les feuilles de DGL séchées sont présentées dans la figure IV.1.

Avant séchage Après séchage



Figure IV.1. Matières végétales séchées

IV.3.2.. Détermination de la teneur en eau

Le taneur en eau de la biomasse utilisée a été calculé en utilisant l'équation IV.1.

$$TE(\%) = \frac{m0-m1}{m0} \times 100 \qquad \text{(IV.1)}$$

Avec :

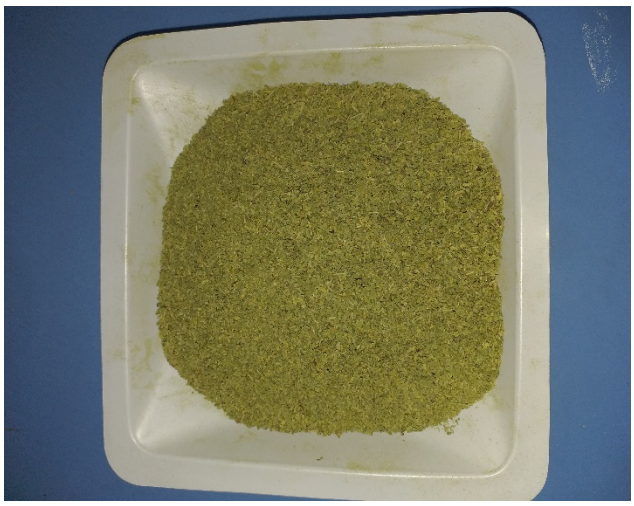
m_0 : masse des feuilles avant séchage.

m_1 : masse des feuilles après séchage.

Le résultat de l'évaluation de la TE a donné une valeur de 10.4% .Ce résultat, montre que les feuilles de DGL présentent une teneur en eau assez importante d'où l'intérêt du séchage avant extraction afin d'obtenir des rendements appréciables.

IV.3.3.Broyage et tamisage de la matière première

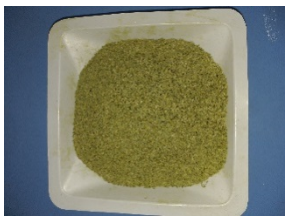
Après le séchage des feuilles DGL, elles seront broyées (figure IV.2.). La poudre obtenue sera préservée à l'abri de l'air et humidité.



FigureIV.2. Poudre de DGL

Les caractéristiques organoleptiques de la poudre obtenue sont données dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2. Caractéristiques de la poudre de DGL

Poudre	Couleur	Odeur
	verte	Forte

La méthode de tamisage selon la norme AFNOR X 31-107 ,1994 permet de classer les différentes poudres d'un échantillon solide en exploitant une série de tamis, déposés les uns sur les autres, du diamètre supérieur vers le diamètre inférieur. L'échantillon est placé au sommet (tamis de diamètre supérieur) et l'appareil est mis en marche. La poudre restante dans chaque tamis (refus) est pesée puis convertie en pourcentage (Ghomari, 2008). L'appareil utilisé est montré dans la figure IV.3. et les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV.4.



Figure IV.3. Appareil utilisé pour le tamisage de la poudre de DGL

D'après la figure.IV.4, la distribution granulométrique de la poudre de DGL est une courbe gaussienne avec un diamètre moyen des particules de 0.5 mm. . Donc la poudre utilisée a un diamètre de particule dp = 0.5 mm.

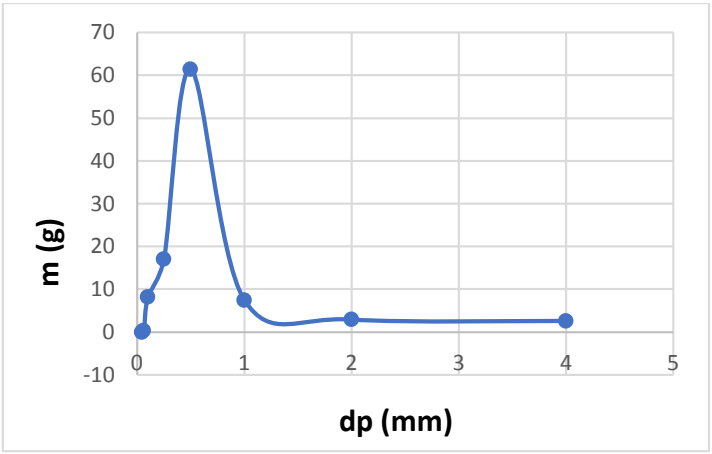


Figure.IV.4. La distribution granulométrique de la poudre de DGL

IV.4.Extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols à partir de la matière végétale (feuille DGL) est faite en utilisant une extraction solide/liquide. En générale, le choix du solvant dépend de la nature des composés à extraire et de leur solubilité dans le solvant choisie. Dans notre étude nous avons procédé à l'extraction des polyphénols par une macération en utilisant deux mélanges binaires 50/50 %(eau /méthanol et eau/éthanol) et l'eau distillée 100%.

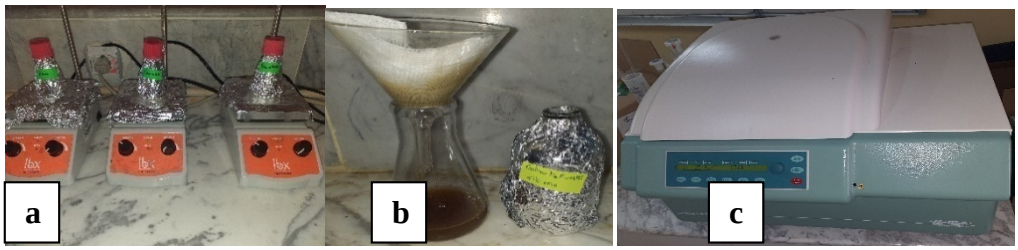
IV.4.1.Protocol expérimental

Nous avons opté pour le protocole décrit par Romani et all (2006) avec quelques modifications :

Une masse de la poudre de DGL a été macérée dans un volume approprié d'une solution aqueuse des solvants : eau, eau/éthanol (50/50 %) et eau/méthanol (50/50 %) sous agitation sous les conditions opératoires suivantes :

- Rapport masse de la poudre /solvant d'extraction : S/L=1/35
- Durée d'extraction : 90mn ,120 mn, 150 mn
- Température : ambiante (≈25°C), 35°C, 55°C.

  Le mélange a été ensuite filtré à l'aide d'un papier filtre et le filtrat a été centrifugé pendant 10mn à 4000t/mn (figure IV.5.). Les extraits ont été conservés à 4°C et à l'abri de la lumière.



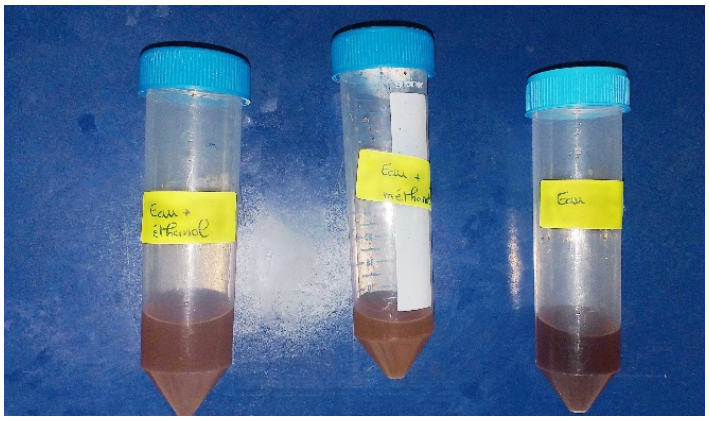
FigureIV.5 : Extraction (a), filtration (b)et centrifugation (c) des extraits de DGL

IV.4.2.Caractéristique des extraits

IV.4.2.1.Caractéristique organoleptique

L'aspect, l'odeur et la couleur des extrais obtenus sont résumés dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3. Caractéristiques organoleptiques des extraits

	**Aspect**	**Couleur**
Eau	Homogène visqueux	Marron
Eau/éthanol	Liquide homogène	Marron
Eau/méthanol	Liquide homogène	Marron

IV.4.2.2. Détermination de l'acidité pH

LepH des trois extraits a été mesurés à l'aide d'un pH- mètre de type JENWAY (figure IV.6.). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau IV.4.

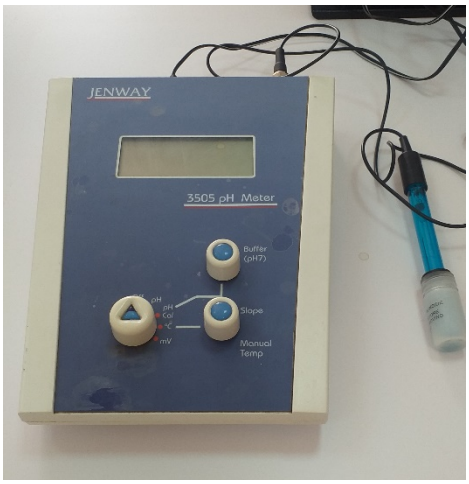


Figure IV.6.pH-mètre utilisé

Tableau IV.4. pH des extraits obtenus.

Extrait	**pH**
Eau	5.20
Eau/ éthanol	4.65
Eau/ méthanol	4.51

Ces résultats montrent que les extraits de DGL ont un caractère acide. Ce caractère confirme la présence des composés acide, tel que l'acide gallique, dans les différents extraits.

IV.4.2.3.Détermination de conductivité

La conductivité des différents extraits a été mesurée à l'aide d'un conductimètre de type BANTE (Figure IV.7.) et les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV.5.



Figure IV.7. Conductimètre utilisé

TableauIV.5. Conductivité des extraits obtenus

Extrait	**Conductivité(µs/cm)**
Eau	4780

Ces résultats nous permettent de dire que l'extrait aqueux (100 %) est très riche en espèces ioniques dissoutes que les extraits hydro-éthanoliques et hydrométhanoliques.

Eau/éthanol	836
Eau/ méthanol	1158

IV.5.Analyse qualitative et quantitative des composés polyphénols

IV.5.1.Analyse qualitative

Dans cette partie de notre travail, nous avons réalisé plusieurs tests qualitatifs sur les extraits de DGL en se basant sur des études antérieurs (Mazari, 2010 ; Rajeshwar, 2013 ; Yam ,2009) qui consistent à réaliser des réactions spécifiques conduisant à l'apparition d'un précipité ou un changement de couleur confirmant la présence de certains constituants.

IV.5.1.1.Recherche des polyphénols

Pour détecter la présence despolyphénols, quelques gouttes de perchlorure ferrique ($feCL_3$,10%) ont été ajoutées à 2ml d'extrait.

Nous avons remarqué la formation d'un précipité noir-vert intense (figure IV.8.) qui est le signe de la présence des polyphénols d'après (Rajeshwar, 2013)

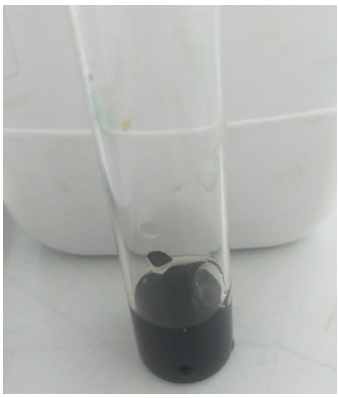


Figure IV.8. Recherche des polyphénols

IV.5.1.2.Recherche des tannins gallique

Dans ce cas, 1 à 2 gouttes de $FeCl_3$ ont été ajoutées à 1 ml de l'extrait et 1 ml de l'eau distillé.L'apparition d'une coloration bleu-vert indique la présence de tanins galliques.

IV.5.1.3.Recherche de glycosides cardiaques

La recherche des glycosides cardiaques a été effectuée en utilisant le test décrit par Yam (Yam,2009).1 ml de l'extrait a été mélange à 2 ml de chloroforme. Ensuite 1 ml de H_2SO_4a été ajouté. L'apparition d'une couleur brune-rougeâtre (figure IV.9).



Figure IV.9. Recherche des glycosides cardiaques

IV.5.1.4.Recherche des saponosides

La présence d'agent tensioactif ou saponines dans les extraits obtenus a été détectée par la méthode de moussage :

- Mettre 4 ml de l'extrait dans un tube à essai.
- Agiter avec vortex pendant 3 min
- Laisser au repos 5 min
- Mesurer la hauteur de la mousse par une règle.

  Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV.10. et le tableau IV.6.

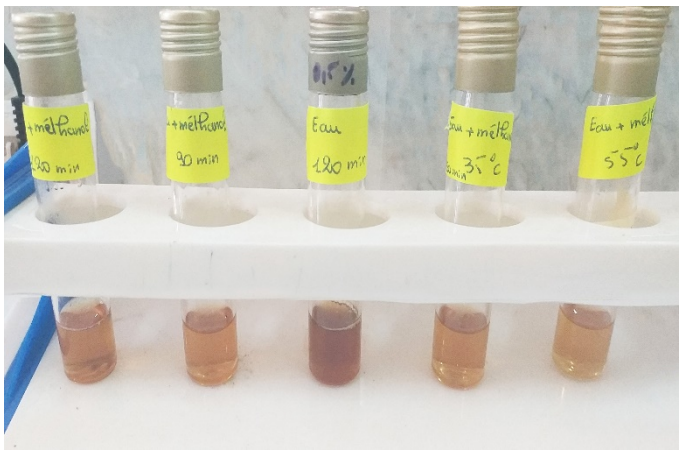


Figure IV.10. Recherche des saponines

Tableau IV.6. Résultats de la recherche des saponines

Extrait	Hauteur (mm)
Eau/méthanol (120 min)	1
Eau/méthanol (90 min)	0
Eau (120 min)	3
Eau/méthanol (55°c)	0
Eau/méthanol (35°c)	0

Nous remarquons la formation de la mousse dans l'extrait de l'eau (120 min) et celui de l'eau/méthanol (50/50 %) (120 min), alors qu'aucune mousse n'a été observée dans les autres extraits préparés. Ces résultats signifient la présence des saponines dans les feuilles de daphné garou. Cependant, ils ont plus d'affinité à l'eau et au mélange binaire eau/méthanol.

IV.5.2.Analyse quantitative

IV.5.2.1.Dosage des polyphénols

Les polyphénols totaux (PPT) ont été déterminés par spectrophométrie UV-Visible en utilisant la méthode de Folin –Ciacalteu (Singleton, 1999) .Le réactif de Folin- ciacolteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange de deux acides : acide phosphotungstique ($H_3PW12O40$) et acide phosphomolybdique ($H_3PMo12O40$) .Il est réduit lors de l'oxydation des phénols pour former un complexe bleu stable d'oxydes de tungstène et molybdène.

L'absorption maximum est 737nm, est proportionnelle à la quantité des composés phénoliques présents dans les extraits. Le dosage PPT est effectué en comparaison avec une gamme étalon d'acide gallique (AG) (Obied, 2005). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de l'AG par gramme de matière végétale en utilisant l'équation de la régression linéaire (Y=a X) de la courbe d'étalonnage tracée pour AG.

A. Mode Opératoire

Les différentes étapes réalisées pour le dosagedes PPT sont résumées par l'organigramme de la figure IV.11. Le blanc utilisé à la même composition en remplaçant 0.1 ml de l'extrait par 0.1 ml du solvant d'extraction .Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmesconditions opératoires en utilisant l'AG comme contrôle positif aux différentes concentrations (0, 10, 20, 40, 60,80 µg/ml) préparé à partir d'une solution mère (100 µg/ml) d'acide gallique (Bessas La rutine, 2008). Les courbes d'étalonnages sont réalisées avec les différents solvants :

Eau, eau/éthanol (50/50 %) et eau/méthanol (50/50%) et sont présentées dans la figure IV.12.

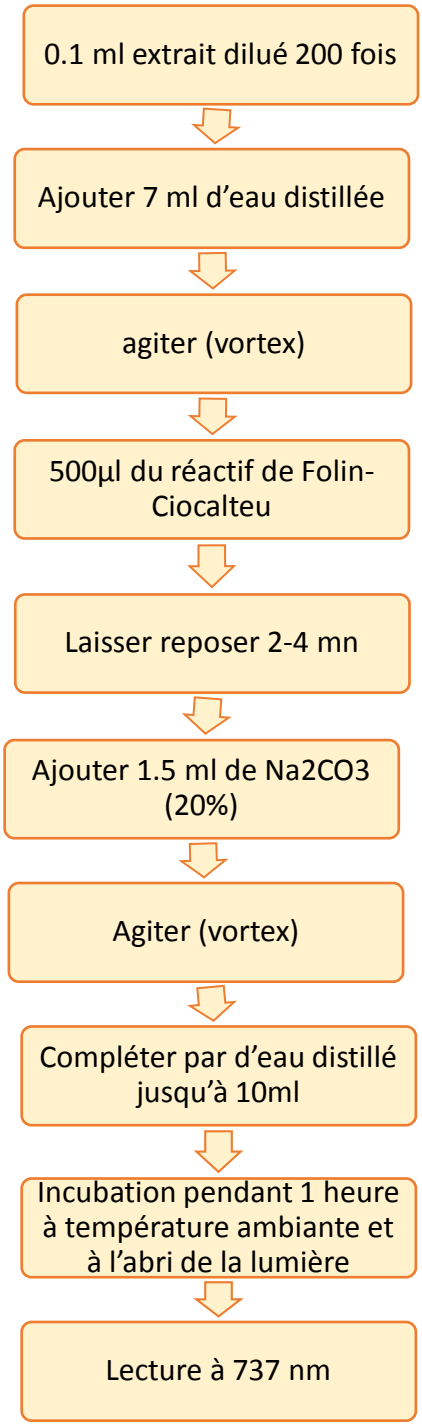


Figure.IV.11. Protocole dudosage des polyphénols totaux

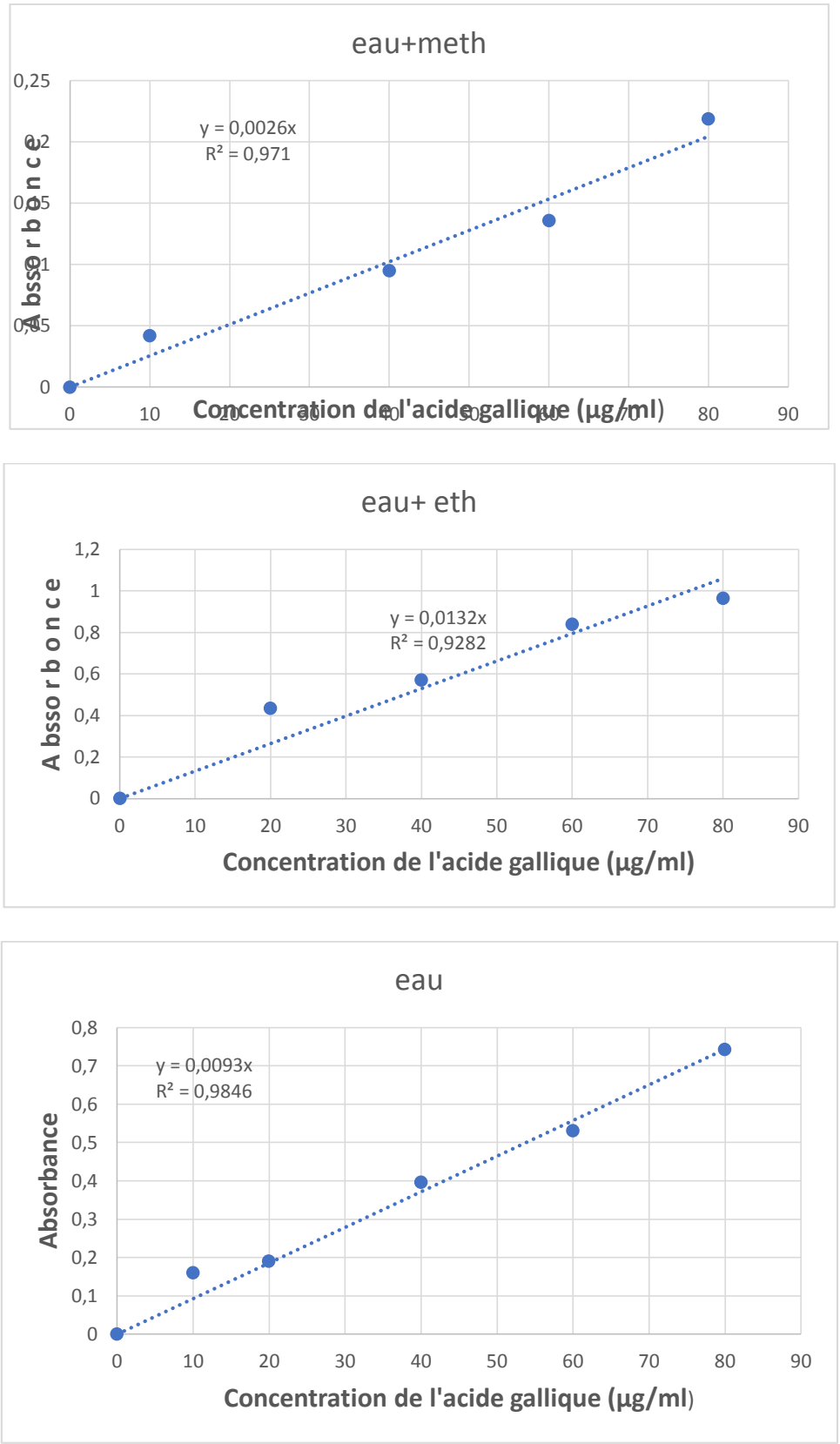


Figure.IV.12. Courbes d'étalonnage de l'acide galique avec les différents solvants à 737nm

Les teneurs en PPT sont exprimées en milligramme équivalent d'AG par gramme de la matière sèche selon l'équation (IV.2.)

$$TPP = \frac{Vs \times C \times K}{mp} \text{(IV.2).}$$

Avec :

TPP : teneur en polyphénol totaux (mg EAG/g)

Vs : volume de l'échantillon (ml)

C : concentration de l'échantillon à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)

K : facteur de dilution

mp : masse d'échantillon en (g)

B.Résultats et discussion

Les principaux résultats relatif au dosage des PPT dans les différentes extraits sont présentés ci –dessus (paramètres d'extraction) là où nous avons groupé les résultats en trois groupes : effet de la nature du solvant, effet de la durée d'extraction et effet de la température d'extraction.

C. Paramètres d'extraction

- **Effet dela nature du solvant**

Les résultats du dosage des PPT ; des extraits obtenus sous les conditions suivantes : S/L=1/35 T=25°C (ambiante), t=120 mn , dp=0.5 mm ; sont présentées dans la figure IV.13.

L'analyse des résultats nous a permis de noter que eau/méthanol (50/50 %) représente le meilleur solvant d'extraction des PPT des feuilles de Daphné Garou (6.92 mgEAG/g) comparé à l'eau et à l'eau/ éthanol avec des teneurs en PPT de 0.0078 mg EAG/g et 0.413 mgEAG/g respectivement. Ceci montre que les composés phénoliques ont une bonne affinité pour le méthanol.

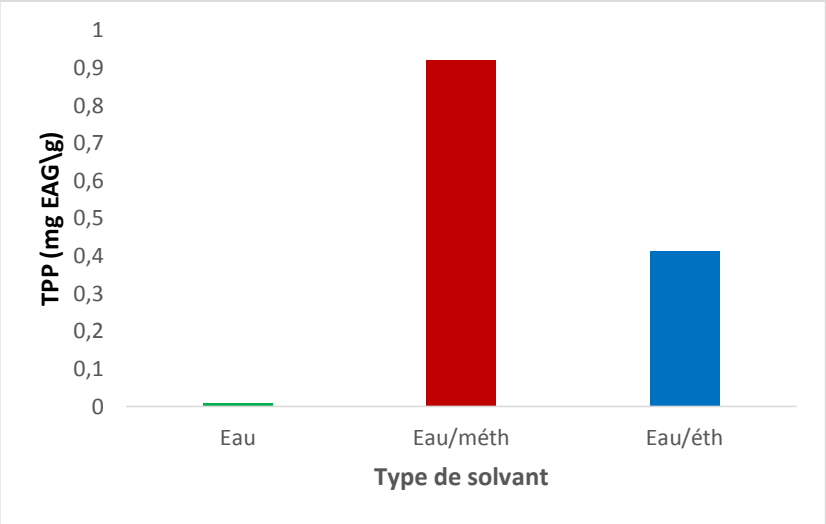


Figure IV.13. Effets des solvants sur l'extraction des polyphénols totaux.

S/L=1/35 et T= ambiante et t=120 min et dp=0.5mm.

- **Effet du la durée d'extraction**

Pour l'étude de l'effet du temps d'extraction sur la teneur en PPT, les principaux résultats obtenus sont illustrés dans la figure IV.14.

Selon les résultats obtenus, nous observons que la diminution et l'augmentation de la durée d'extraction n'a pas amélioré la teneur en PPT .La meilleur teneur en PPT est obtenue après 120 mn d'extraction avec une valeur de 6.92 mg EAG/g.

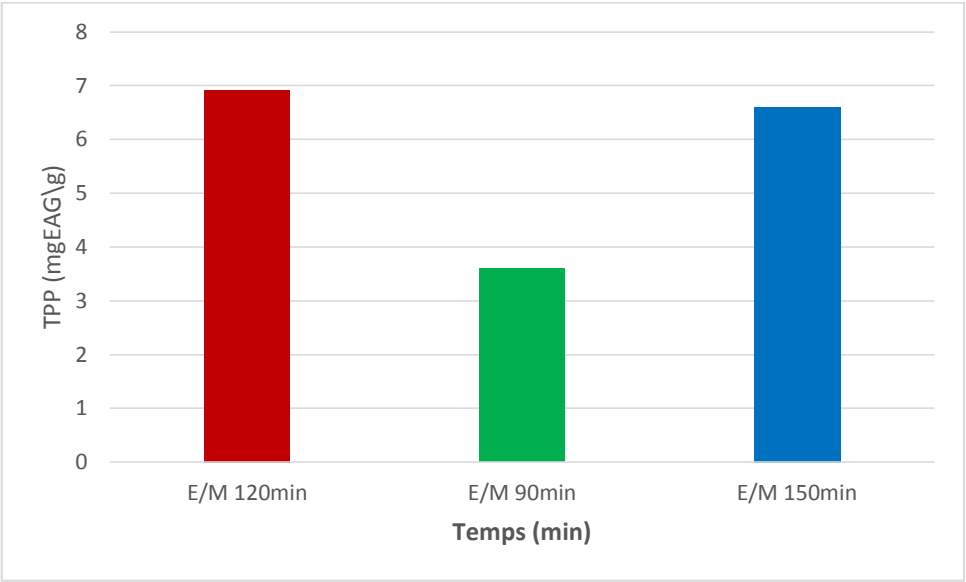


Figure IV.14. Effet du temps sur la teneurdes extraits en PPT.

Méthanol 50% et S/L=1/35 et T= ambiante et dp=0.5mm

- **Effet du température**

Les résultats de l'éffet de la température sur la teneur en PPT sont donnés dans la figure IV.15.

A travers ces résultats, nous pouvons conclure que l'augmentation de la température n'a pas amélioré l'extraction des PPT. La teneur en PPT dans ce cas a diminué de 6.82 mg EAG/g (25°C) à 0.821 mg EAG/g (35°C) et à 4.158 mg EAG/g (55°C). Cette diminuation peut être justiée par la dégradation des substances d'intérêt sous l'effet de la température.

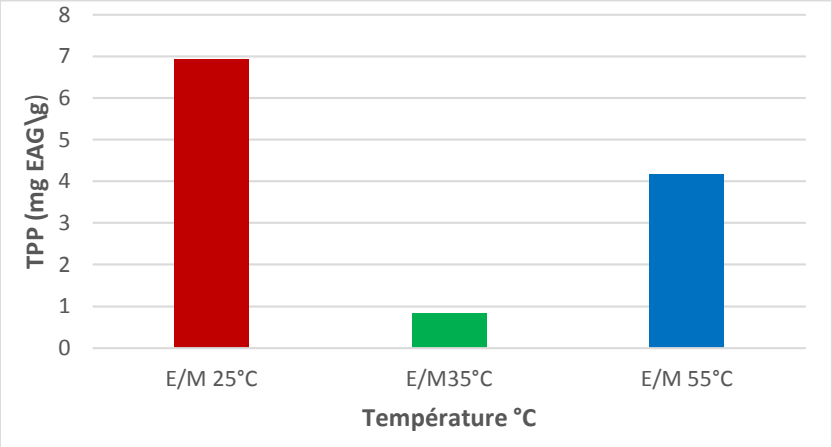


Figure IV.15. Effet de température sur l'extraction des polyphénols.

Méthanol 50% et S/L=1/35 et t=120min et dp=0.5mm

IV.5.2.2.Dosage des flavonoïdes

L'évaluation quantitative des flavonoïdes totaux dans différents extraits est réalisée selon la méthode au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) (Ayoola, 2008). Ce dernier forme un complexe très stable avec les groupements hydroxydes (OH) des phénols. Le complexe formé, ayant une couleur jaune, absorbe la lumière visible à une longueur d'onde de 430 nm.

Une gamme étalon est établie séparément avec la rutine avec une concentration connue (Obeid, 2005).

A. Mode opératoire

Les différentes étapes réalisées pour le dosage des flavonoïdes des différents extraits par la méthode au trichlorure d'aluminium sont résumées dans l'organigramme de la figureIV.16.

Le blanc utilisé à la même composition en remplaçant 2ml de l'extrait par de 2ml de solvant d'extraction.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la rutine comme contrôle positif à différentes concentrations (0, 25, 50, 75, 100 µg/ml) préparés à partir d'une solution mère de (200µg/ml).La courbe d'étalonnage de la rutine est donnée dans la figure IV.17.

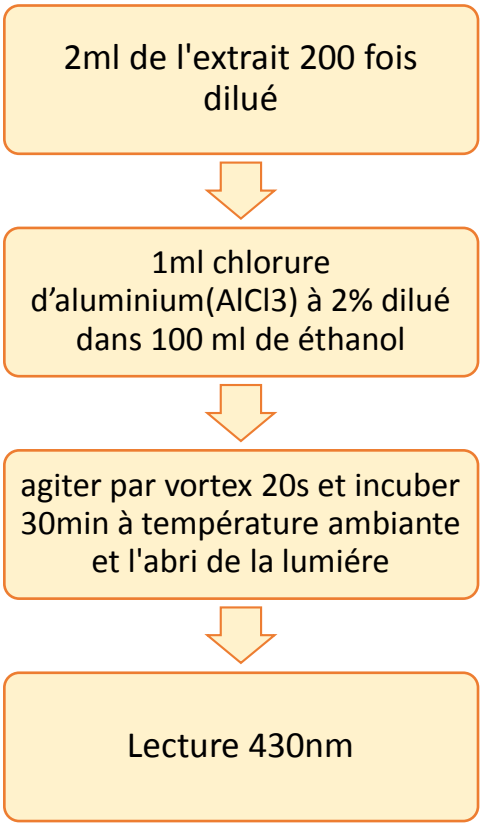
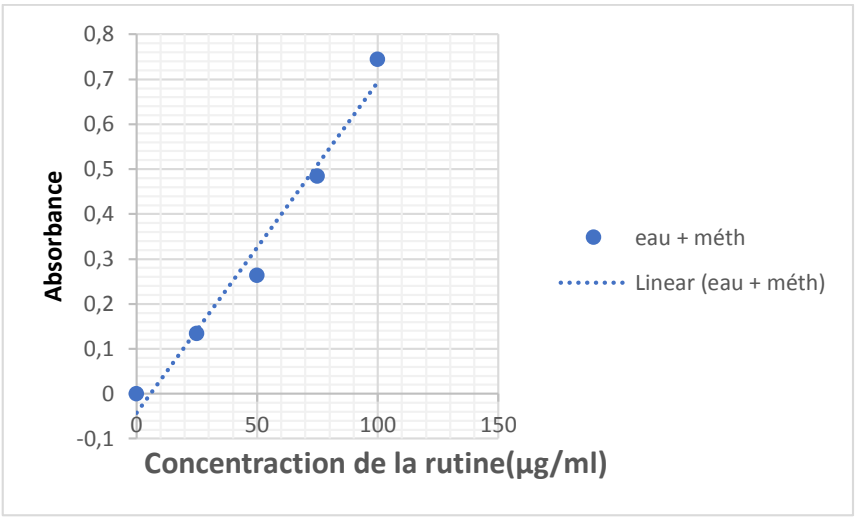
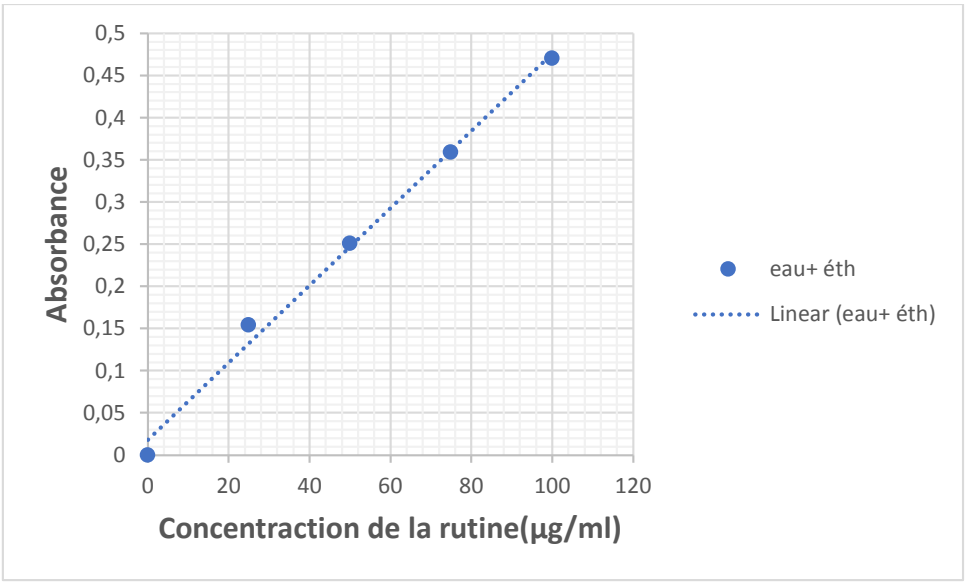


Figure IV.16. Protocol du dosage des flavonoïdes.





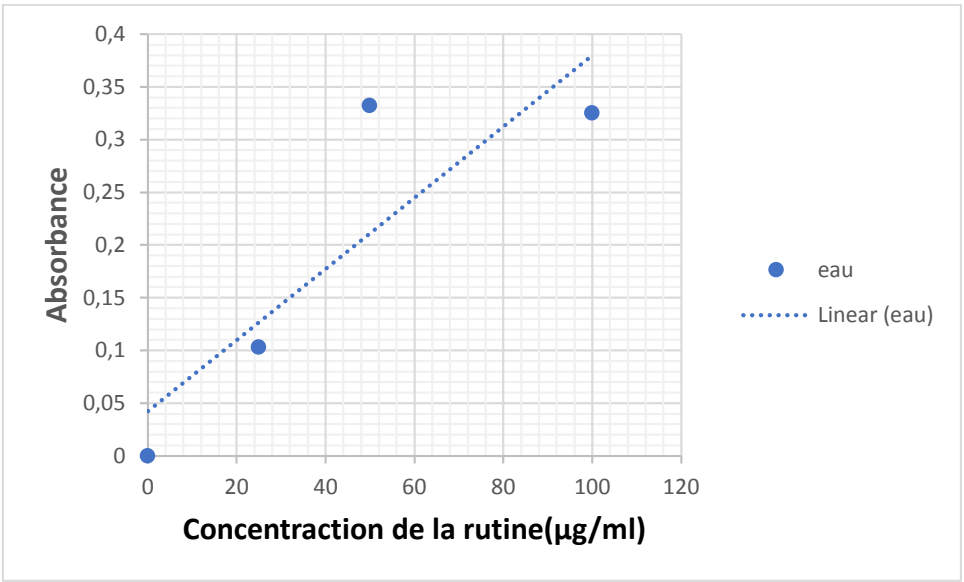


Figure.IV.17. Courbes d'étalonnage de la rutine avec les différents extraits à 430nm

La teneur des flavonoïdes totaux (TF), exprimée en milligramme équivalent de la rutine par gramme de matière sèche, est calculée par l'équation IV.3.

$$TF=\frac{Vs\times C\times K}{mp} \text{(IV.3.)}$$

TF : teneur en flavonoïde mg ERU/g

Vs : volume d'échantillon (ml)

C : concentration lue à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml)

K : Facteur de dilution

mp: Masse de l'échantillon (g)

D. Résultats et discussion

Suite aux résultats des teneurs en flavonoides obtenus pour les trois extraits (eau , eau/méthanol (50/50%) et eau/éthanol (50/50%)), nous pouvons conclure que la meilleur teneur en flavonoide (figure IV.18.) est obtenue dans l'extrait eau 100% (8.18mg ERU/g).

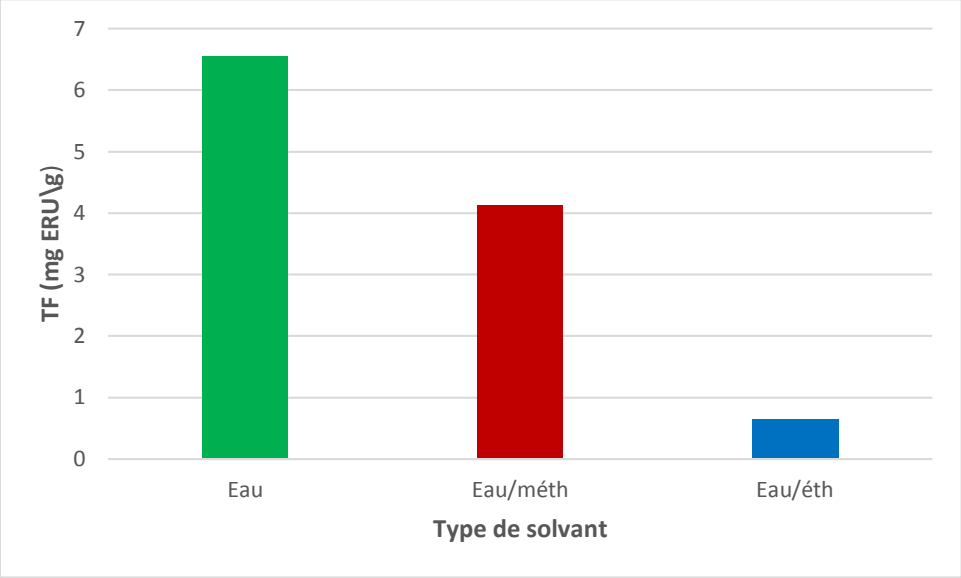


Figure.IV.18. Teneur en flavonoïdes en fonction de la nature du solvant

IV.6. Tension superficielle

IV.6.1.Principe et méthode

La tension superficielle (TS) est un paramètrephysicochimique important pour la caractérisationdes composés tensioactifs. Dans cette partie, nous avons mesuré les tensions

de surface des différents extraits obtenus en vue d'élucider l'effet des changements des conditions opératoires d'extraction (durée d'extraction, nature du solvant et température) sur leurs propriétés tesioactives.

Les mesures de la tension superficielle ont été effectuées à l'aided'un tensiomètre CSC(Type Du Nouy 70545) à température ambiante par la technique d'arrachement d'un anneau (FigureIV.19.). Le systéme est composéd'un mince anneau en platine suspendu horizontalement au bras d'une balance tarée.Pour effectuer une mesure, immerger l'anneau dans la solution àtester puisle remonter jusqu'à la limite où l'anneau ne peut être retenu que par les molécules présentes à la surface de la solution puis lire la valeur de la tension superficielle créée lorsque l'anneau est arraché de la surface de la solution. La valeur est affichée sur un disque gradué en dynes/cm correspondant à mN/m.



Figure IV.19.Mesure de la tension superficielle d'un extrait de DGL

IV.6.2.Résultats et discussion

Les résultats des mesures de la tension superficielle des extraits sont présentés dans les figures IV.20., IV.21. et IV.22.Les valeurs obtenues pour les extraits sont inférieurs à celles obtenues pour les solvants utilisés (eau : 62 mN/m, eau/éthanol : 36 mN/m et

eau/méthanol : 39 mN/m). Ceci indique la présence des molécules ayants un pouvoir tensioactif non négligeable qui a permis de diminuer la tension superficielle des extraits d'une manière différente selon les conditions d'extraction.

L'effet des différents paramètres d'extraction sur la tension superficielle est étudié dans ce qui suit :

- **Effet de la nature du solvant d'extraction**

La figure IV.20.représente les résultats de la tension superficielle des différents extraits obtenus en variant le solvant et en maintenant les autre paramètres constants (S/L =1/35 g/ml, T = 25°C, t=120 mn et dp=0.5mm). L'analyse de ces résultats montre que l'extrait eau/éthanol (50/50 %) possède la tension superficielle la plus faible (31.9 mN/m). Cependant, la diminution la plus élevée (31.6 %) a été obtenue avec l'eau comme solvant (passage de 62 mN/m à 42.4 mN/m). Ceci peut être justifié par l'affinité des composés à effet tensioactif (saponines) à l'eau.

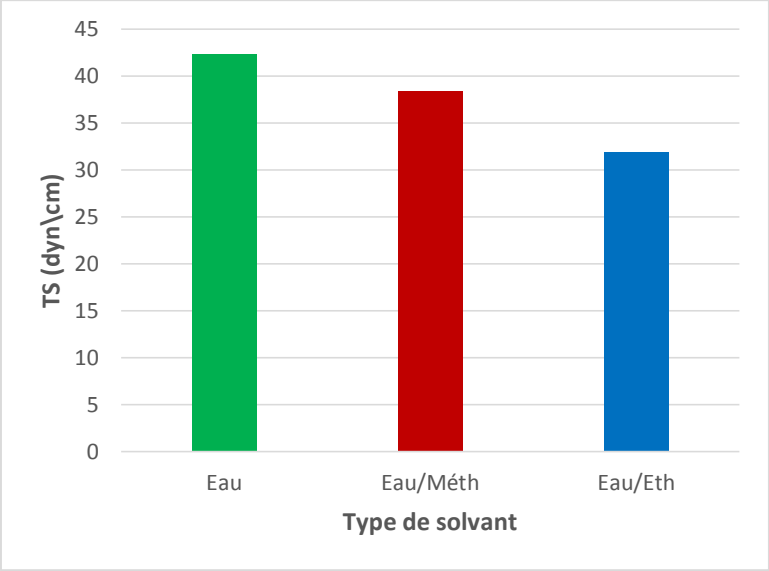


Figure IV.20. Effet de la nature du solvant sur la tension superficielle des extraits

- **Effet du la durée d'extraction**

L'étude de l'Effet de la durée d'extraction sur la variation de la tension superficielle des différents extraits a été effectuée en représentant la TS des extraits (obtenus sous les conditions suivantes : Solvant : eau/méthanol 50/50 %, S/L =1/35 g/ml, T = 25 °C et dp=0.5mm) en fonction de la durée de l'extraction (Figure IV.21.).

La plus faible valeur de TS a été obtenue à une durée d'extraction de 150 mn avec une diminution de 8.2 % par rapport à celle du solvant (passage de 39 mN/m à 35.8 mN/m).

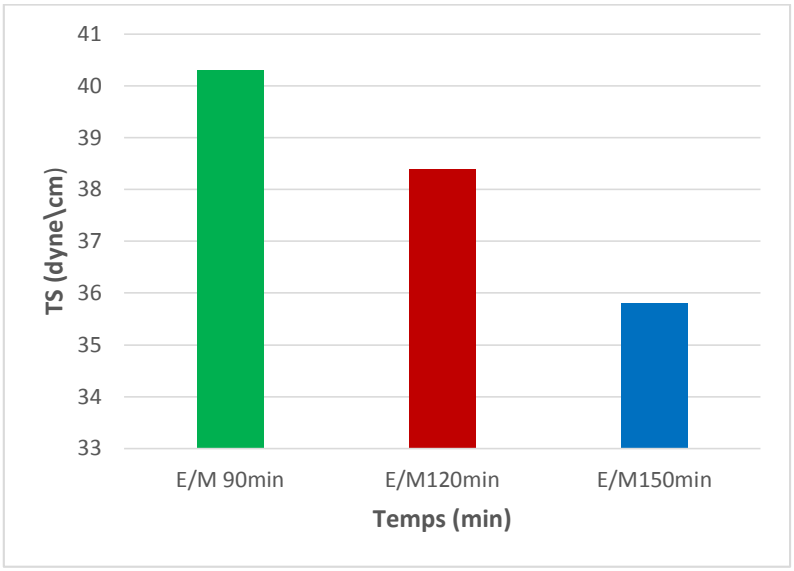


Figure IV.21. Effet de la durée d'extraction sur la tension superficielle des extraits

Effet de température

L'effet de la température sur la tension superficielle des différents extraits, obtenus en utilisant eau/méthanol (50/50 %) comme solvant, un rapport S/L= 1/35, une durée de 120min et un dp=0.5 mm, est illustré dans la figure IV.22.

L'observation de cette figure montre que la meilleur TS (35.9 mN/m) a été obtenue à une température de 35 °C.

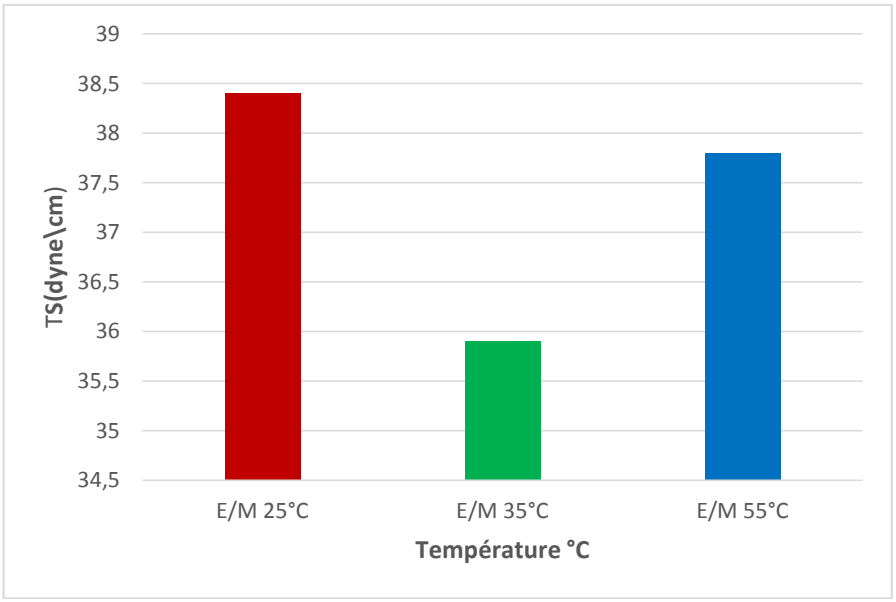


Figure IV.22 Effet de température sur la tension superficielle des extraits

IV.7.L'activité antioxydante

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par le test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH).

IV.7.1. Piégeage du radical libre DPPH

IV.7.1.1.Principe

L'activité anti radicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante**.**

Le DPPH est un radical libre stable possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation empêche la polymérisation du composé, qui reste sous forme monomère relativement stable à température ambiante. Ainsi, cet état induit l'apparition d'une couleur violet foncé bien caractéristique de la solution DPPH.

Cette couleur disparait en présence d'antioxydant lorsque le DPPH est réduit, passant au jaune pâle du groupe picryl, et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons**.** Le suivi de la délocalisation est réalisé par spectrophotométrie à 517nm. (Molyneux, 2004).

IV.7.2.Mode opératoire

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 0.004% de DPPH dans le solvant d'extraction. A partir de chaque extrait, 1.5 ml des solutions filles sont préparées dont les concentrations sont : 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.08 (mgEAG/ml). Par la suite, 1.5 ml de chaque extrait est ajouté à 0.8ml de DPPH. Le mélange est agité au vortex et laissé reposer à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30min. Les mesures d'absorbances sont effectuées à 517nm (figure IV.23.) contre un blanc préparé dans les mêmes conditions citées en remplaçant la solution d'extrait par le solvant.

L'activité antioxydante d'un extrait est caractérisée par la valeur de l'IC50 (concentration permettant d'obtenir 50% d'inhibition). Le pouvoir antioxydant est déterminé de façon à ce qu'une quantité de l'extrait d'une concentration bien déterminée neutralise 50% du radical.

Une faible valeur de l'IC50 correspond à une forte activité antioxydante. Cette valeur est calculée à partir des courbes de la variation du pourcentage d'inhibition I% en fonction de la concentration de chaque extrait.

Le pouvoir d'inhibition, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule IV.4.

$$\text{Inhibition}(\%)=\frac{(AbsControl-AbsExtrait)}{AbsControl}\times 100\% \qquad \text{(IV.4.)}$$

Abs control: absorbance de control

Abs extrait : absorbance de l'extrait

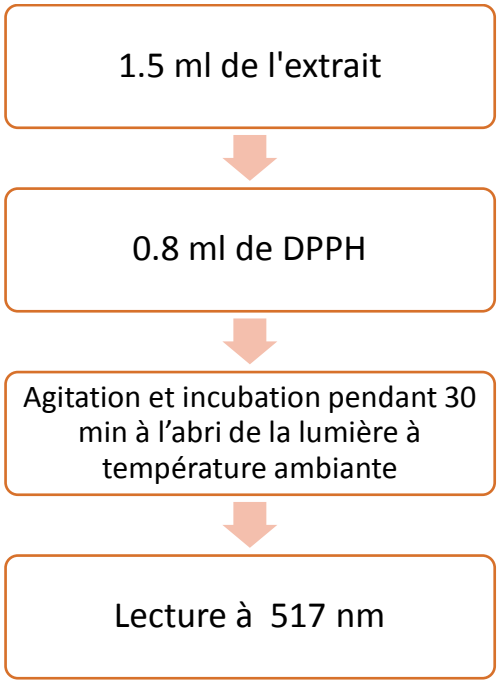


Figure IV.23 : Détermination de l'activité antioxydante.

IV.7.3.Résultats et discussion

L'activité antioxydante de l'extrait eau/méthanol 50% (exprimée en PI %) vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée en suivant la réduction de ce radical par spectrophotomètre UV visible.

Le profil de l'activité antiradicalaire obtenueest présenté sur la figure IV.24.

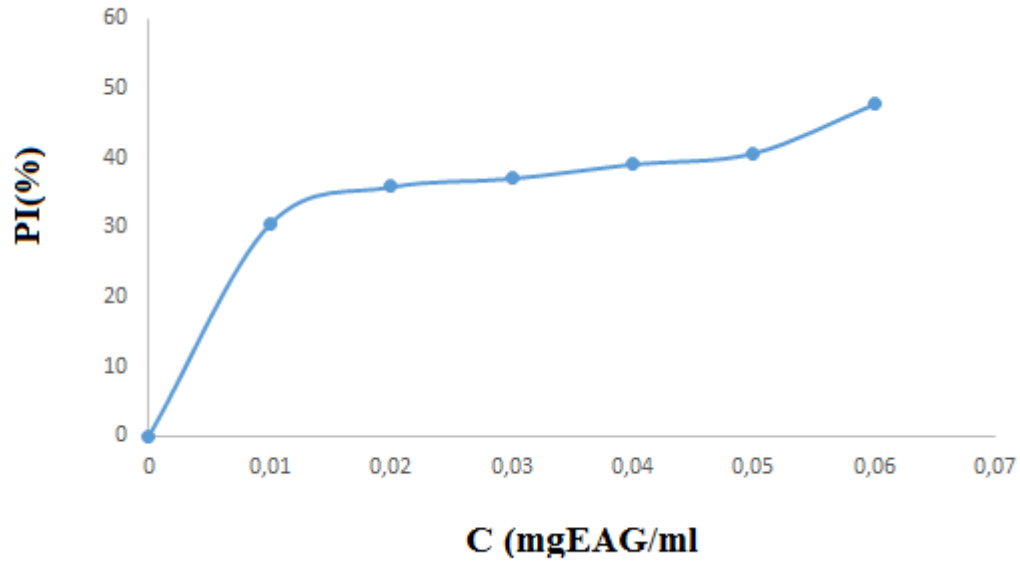


Figure IV.24. Activité antioxydante de l'extrait eau/méthanol (50/50 %)

A des fins comparatives, trois antioxydants standards sont utilises l'acide gallique, la Quercétine et la rutine (tableau IV.7.), ils ont montré une activité antiradicalaire puissante avec des CI50 de l'ordre de 0.0065 mg/ml et 0.0075 mg/ml, 0.0092 mg/ml respectivement. L'activité antioxydante de l'extrait testé eau/méthanol (50/50 %) est de l'ordre 0.07 mgEAG/ml ce qui confirme la richesse des extraits obtenus en composés phénoliques. Néanmoins, En comparaison avec les antioxydants standards, l'extrait testé s'avère moins actif.

Tableau.IV.7. Valeurs d'IC50 de l'extrait eau/méthanol (50/50 %) ainsi que celles des standards.

Extrait	**CI50 % (mg/ml)**
Eau/ méthanol 50%	0.07
Rutine	0.0092
Acide gallique	0.0065
Quercétine	0.0075

IV.8.Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de notre extrait polyphénolique est mise en évidence suivant le même principe que l'antibiogramme. L'effet du produit antimicrobien (l'extrait) sur la cible (microorganisme) est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du

diamètre d'inhibition, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Ainsi, dans cette méthode il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester (Broadasky ,1976). Les espèces microbiennes testées sont :

- *Escherichia coli*
- *Bacillus subtilis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Saccharomyces cerevisiae*

La taxonomie des différentes espèces microbiennes testées est donnée dans le tableau IV.8.

Tableau.IV.8. Taxonomie des espèces microbienne utilisées

Classification	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus subtilis*	*Saccharomyces cerevisiae*
Règne	Bactérie	Bactérie	Bactérie	Fungi
Emranchement	*Proteobacteria*	*Firmicutes*	*Frimicutes*	*Ascomycètes*
Classe	*Gammaproteobacteria*	*Bacilli*	*Bacilli*	*Saccharomycotina*
Ordre	*Enterobacteriales*	*Bacillales*	*Bacillales*	*Sacchromycetales*
Famille	*Enterobacteriaceae*	*Staphylococcaceae*	*Bacillaceae*	*Saccharomycetaceae*
Genre	*Escherichia*	*Staphylococcus*	*Bacillus*	*Saccharomyces*

IV.8.1. Activité antibactérienne

IV.8.1.1. Mode opératoire

Les différentes étapes réalisées pour l'activité antimicrobienne sont énumérées comme suit (figure IV.25.)

1- **Préparation de l'inoculum microbien :** 3 à 4 colonies bien isolées à partir de cultures pures ont été transférées dans des tubes contenant 10 ml d'eau physiologique. Le mélange est agité par vortex. La suspension microbienne doit

avoir une densité optique entre 0.08 et 0.01 lue à une longueur d'onde de 625nm**.**

2- **Ensemencement du milieu de culture :** 20 ml de milieu gélosé Mueller-Hinton sont coulés dans les boites de Pétri. Laisser refroidir et solidifier à température ambiante. A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne, la totalité de surface du milieu Mueller Hinton est ensemencée aseptiquement en stries serrées.
3- **Application des disques et incubation :** Tromper les disques de diamètre 9 mm avec chaque extrait à l'aide d'une pince fine et stérile, puis les déposer délicatement sur les boites. Incuber les boites dans l'étuve à 37 pendant 24 heures.
4- **Lecture :** Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle graduée.

L'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Mutai et al. (2009), ils ont classé les zones d'inhibition de la croissance en 05 classes :

- √ D≥30mm : très fortement inhibitrice.
- √ 21mm≤D≤29mm : Fortement inhibitrice.
- √ 17mm≤D≤20mm : Modérément inhibitrice.
- √ 11mm≤D≤16mm : Légèrement inhibitrice.
- √ D≤10mm : Non inhibitrice.



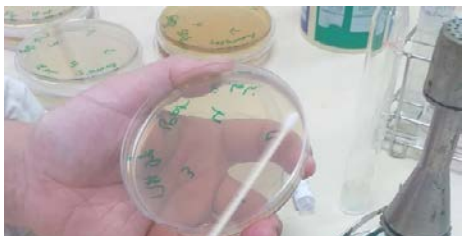


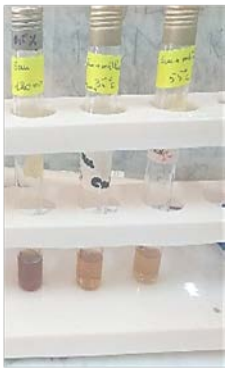
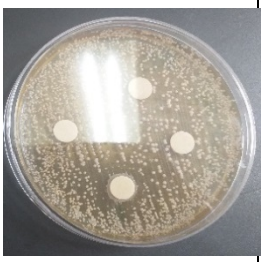
Figure IV.25. Différentes étapes du test d'antibiogramme

IV.8.1.2.Résultats et discussion

Le test antimicrobien a été effectué sur tous les extraits. Les résultats obtenus pour le DGL sont donnés dans le tableau IV.9.

Les résultats d'antibiogramme atteint à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton montrent que l'activité antibactérienne des extraits testés est en fonction de la bactérie cible. Ces résultats ont montré que les souches bactériennes marquent donnent une résistance dans certains milieux et une sensibilité dans d'autres. Ainsi, la *Staphylococcus aureus*résisteenvers tous les extraits testés et la bactérie *Bacillus subtilis*possède une faible sensibilité e avec un seul extrait (eau) avec zone d'inhibition de l'ordre 9.78 mm par contre l'*Escherichia coli*est sensible à la majorité des extraits de DGL avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 12.51 mm à 13.72 mm.

Tableau IV.9.Résultat de l'activité antibactérienne

Extrait	**Souches bactériennes**		
	*Escherichia coli* 	*Staphylococcus aureus* 	*Bacillus subtilis* 
	Diamètre des zones d'inhibitions (mm)		
Eau	R	R	9.78
Eau/ méthanol 50%	12.73	R	R
Eau/éthanol 50%	12.51	R	R
Eau/méthanol 50% 90 min	R	R	R
Eau/méthanol 50% 150 min	R	R	R
Eau/méthanol 50% 35°C	13.72	R	R
Eau/méthanol 50% 55°C	R	R	R

IV.8.2. Activité antifongique

L'activité antifongique de notre extrait polyphénolique est mise en évidence suivant le même principe que l'antibiogramme.

IV.8.2.1. Mode opératoire

Les différentes étapes réalisées pour l'activité antifongique sont les suivantes :

1- **Préparation l'inoculum fongique et l'ensemencement de milieu de culture :** Sur des boites de Pétri contenant le milieu culture Sabouraud, une colonie bien isolée à partir de culture pure (*Saccharomyces cerevisiae*) a été transférée dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique, le mélange est agité par vortex pour préparer l'inoculum fongique. Puis, à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension fongique la totalité de la surface de la boite Péri contenant le milieu Sabouraud a été ensemencé aseptiquement en stries serrées.

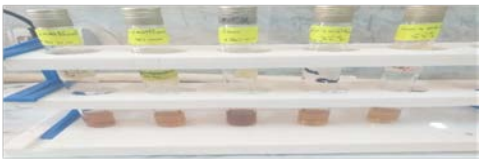
2- **Application des disques et incubation :** tromper les disques de diamètre 9 mm avec chaque extrait à l'aide d'une pince fine et stérile, puis les déposer délicatement sur les boites Pétri. Incuber les boites Pétri dans l'étuve à 20-25°C pendant 72 heures.

3- **Lecture :** Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle graduée.

IV.8.2.2.Résultats et discussion

Les résultats obtenus à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose Sabouraud montrent que sur tous les extraits testés, seul l'extrait de l'eau marque une activité antifongique légèrement inhibitrice avec une zone d'inhibition de l'ordre de 16.75 mm (Tableau IV.10.). Ces résultats révèlent que l'eau représente un solvant sélectif pour les composés responsables de l'effet antifongique comme.

Tableau IV.10.Résultat de l'activité antifongique

Extrait 	Saccharomyces cerevisiae 
	Diamètre des zones d'inhibitions (mm)
Eau	16.75
Eau/méthanol 50%	R

Eau/éthanol 50%	R
Eau/méthanol 50% 90 min	R
Eau/méthanol 50% 150 min	R
Eau/ méthanol 50% 35c^{o}	R
Eau/méthanol 50% 55c^{o}	R

IV.9. Activité anti-inflammatoire

La réponse inflammatoire est un processus physiologique de défense de l'organisme contre des agressions qui entraine une altération tissulaire ou une infection. Elle nécessite unerégulation fine, généralement bénéfique, qui conduit à l'élimination d'éventuels pathogèneset au retour à l'homéostasie du tissu lésé (Ashley *et al*, 2012).

La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèse du type anti-inflammatoire non stéroïdien ou stéroïdien (corticoïdes). Néanmoins ces molécules de synthèse présentent beaucoup d'effets indésirables raison pour laquelle la recherche actuelle vise la valorisation des substances naturelles à effet anti-inflammatoire. Dans ce qui suit, nous allons aborder l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de DGL.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la détermination de l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes médicinales. Parmi ces méthodes, quelques-unes sont représentées dans le tableau IV.11.

TableauIV.11. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire

Test in vivo	Référence	Test in vitro	Référence
Induction d'un œdème, chez des rats, par injection sous plantaire du carragénine	**Vadivu et Lakshmi, 2008.**	Test de stabilisation des membranes d'érythrocytes via l'induction d'hémolyse des globules rouges par hypotonie et chaleur	**Sakat et al., 2010 ; Chippada et al., 2011**
Induction d'œdème en appliquant	**Huang et al., 2011.**	Inhibition de l'activité des protéases	**Govindappa et Poojashri, 2011.**

l'huile de corton sur l'oreille de souris			

Parmi ces méthodes, nous avons choisi celle du test in vitro, test de stabilisation des membranes d'érythrocytes via l'induction d'hémolyse des globules rouges par hypotonie et chaleur.

Les érythrocytes ont été choisis comme modèle pour les tests de stabilité membranaire grâce à les membranes des érythrocytes sont similaires aux membranes lysosomales. De plus, les globules rouges ne contiennent pas d'organites et il n'y a qu'une membrane plasmique, riche en acides gras polyinsaturés et sensible aux radicaux libres, ce qui facilite la recherche sur les oxydants et les antioxydants et la relation entre les médicaments et les biofilms (Chen et Huestis, 1997; Reddy et al..2007)

IV.9.1. Protocole expérimental

IV.9.1.1.Préparation de suspension des globules rouges

Le sang utilisé a été récupéré au niveau du centre du transfusion sanguine à Blida (CTS) dans des tubes d'héparine par prélèvement à partir d'une personne saine qui n'était pas sous traitement anti-inflammatoire pendant deux semaines avant l'expérience.

Les échantillons de sang récupérés ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est, par la suite, éliminé et le culot de globules rouges a été lavé trois fois avec de l'eau physiologique. Le volume des globules rouges a été mesuré pour préparer une suspension de 20 % (v/v) de globules rouges humains, avec l'eau physiologique. Ce protocole est résumé par l'organigramme de la figure IV.26.

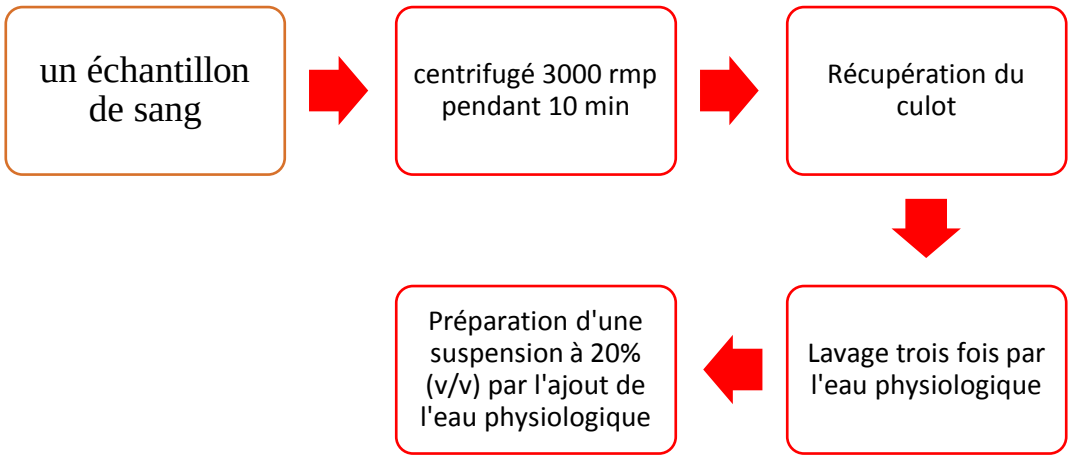


Figure IV.26 : Récupération des globules rouges.

IV.9.1.2.Evaluation de l'activité hémolytique

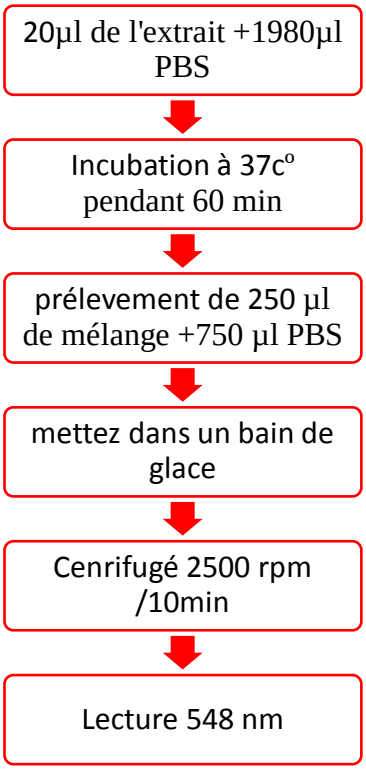
En parallèle avec l'activité anti-inflammatoire, il est nécessaire d'évaluer la toxicité des extraits des feuilles de DGL. En effet, même si une plante possède un pouvoir anti-inflammatoire puissant, son utilisation en médecine traditionnelle et dans les préparations pharmacologiques sera impossible en présence de leur effet hémolytique, qui est un indicateur de cytotoxicité. Pour cette raison, nous avons procédé à l'évaluation du pouvoir hémolytique de notre extrait.

Le pouvoir hémolytique de l'extrait (eau/ méthanol : 50/50 %) a été réalisé in vitro sur une suspension d'érythrocytes du sang humain dans le PBS (phosphate buffered saline).

L'évaluation de l'activité hémolytique de l'extrait (eau/ méthanol : 50/50 %) des feuilles de la plante Daphné garou a été réalisé selon la méthode de (Guo-Xiang et Zai-Qun).

Dans des tubes à hémolyse, 20 µl de l'extrait (115.38 µg/ml) ont été ajouté à 1 980 µl de la suspension des globules rouges préparée. Ce tube a été ensuite incubé à 37 °C pendant 60 minutes. Après l'incubation, un prélèvement de 250 µl a été réalisé puis repris dans 750 µl de PBS. Ce mélange a été mélangé délicatement et mis dans un bain de glace pour stopper la réaction, puis centrifugés à 2 500 rpm pendant 10 mn (figureIV.28.). La lecture de l'absorbance a été effectuée à 548 nm (figureIV.29.), à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS. (Figure IV.27.)

Un tube référence a été préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par l'acide gallique.



FigureIV.27. Dosage de l'activité hémolytique.

IV.9.1.3.Effet des extraits sur la stabilité des membranes des globules rouges (activité anti-inflammatoire)

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire est basée sur l'effet des extraits des feuilles de DGL sur la stabilisation des érythrocytes, après induction de l'hémolyse à une température élevée selon le protocole décrit par Ganesh Gadamsetty et al. (Ganesh Gadamsetty et al, 2013).

Dans d'un tube d'hémolyse, 0.5 ml d'extrait (eau/méthanol : 50/50 %), 1.5 ml du tampon phosphate (0.15 M, pH=7.4) et 2 ml de la solution hyposaline (NaCl à 0.36 %) ont été mélangés et incubés à 37ºC pendant 20 mn. Ensuite, un volume de 0.5 ml de la suspension des globules rouges (20%) a été rajouté. Le tube a été mis dans de l'eau froide pendant 20 mn. Puis la lecture l'absorbance a été faite à 560 nm.

Le blanc a été préparé par la même méthode en remplaçant l'extrait par le solvant (eau/méthanol : 50/50 %).

Le contrôle consiste en un mélange de 2 ml de la solution hyposaline, 1.5 ml de PBS, 0.5 ml de la suspension de globules rouges et 0.5 ml de l'eau physiologique.

Le Diclofénac a été utilisé comme principe actif anti-inflammatoire, avec les mêmes conditions que l'extrait.

Le pourcentage de l'hémolyse est calculé en utilisant l'équation IV.5.

$$Inhibition\ de\ l'hémolyse(\%) = \frac{100-Aext}{Ac} \text{(IV.5.)}$$

Aext : absorbance de l'extrait

Ac : absorbance de control

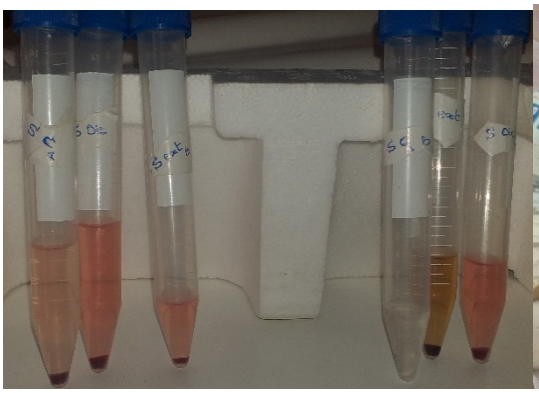




Figure IV. 28. Tubes après centrifugation **Figure IV.29**. Lecture à 548 nm

Dans les mêmes conditions et en utilisant la même démarche, un témoin positif a été préparé dans un tube d'hémolyse contenant 100 µl de la suspension érythrocytaire et 1 900 µl d'eau distillée,

Un tube témoin négatif est composé de 250 µl de suspension érythrocytaire et de 750 µl de la solution tampon PBS.

Le taux d'hémolyse de notre extrait a été calculé en pourcentage par rapport à l'hémolyse totale, après 60 minutes d'incubation, selon l'équation IV.6.

$$Tauxd'hémolyse(\%) = \frac{DO\text{ext}-\text{DOTN}}{DOTP} \times 100 \qquad \text{(IV.6.)}$$

DO_{ext} : densité optique de l'extrait

DO_{TN} : densité optique de témoin négatif

DO_{TP} : densité optique de témoin positif

IV.9.2.Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau IV.12. L'évaluation du pourcentage d'inhibition de l'hémolyse montre que l'extrait de daphné garou possède un effet anti-inflammatoire in vitro de 99% à la concentration 115.38 µg/ml. Dans les mêmes conditions, le même résultat (99 %) a été trouvé en utilisant Diclofénac (même concentration que l'extrait) comme anti-inflammatoire.

Le résultat du taux d'hémolyse obtenu montre que le pourcentage d'effet hémolytique est de 10.11% à la concentration 115.38µg/ml. Donc, on peut classer l'effet hémolytique de notre plante très faible.

Tableau IV.12. Résultats de l'activité anti-inflammatoire et hémolytique de l'extrait (eau/méthanol : 50/50 %)

Inhibition hémolytique (%)	99
Taux d'hémolyse (%)	10.11

IV.10.Formulation d'une crème antifongique à base des extraits de DGL

Dans cette partie nous avons opté pour l'application des extraits de DGL dans la préparation d'une formule pharmaceutique pour un éventuel traitement contre une infection fongique. Le but est d'utiliser cette préparation pharmaceutique pour traiter les infections de la peau causées par : *Saccharomyces cerevisiae* par exemple. Pour ce faire notre choix est tombé sur l'extrait possédant une activité antifongique qui est l'extrait d'eau.

IV.10.1. Protocole expérimental de la formulation

La formulation de la crème a été préparée selon un protocole bien défini utilisé pour la préparation de la crème antifongique (Phanazol) au niveau de laboratoire physicochimique de l'unité SAIDAL de Dar el Beida, Alger. La formulation préparée est une émulsion de type huile dans eau (H/E) dont la composition de chaque phase nous a été donné

agréablement par le personnel du laboratoire. Notre extrait eau a été ajouté dans la phase aqueuse. La crème obtenue est montrée dans la figure IV.30.



Figure.IV.30. Crème antifongique formulée

IV.10.2. Caractères organoleptiques de la crème

Les principaux résultats des différents tests de la caractérisation organoleptique de la crème formulée sont regroupés dans le tableau IV.13.

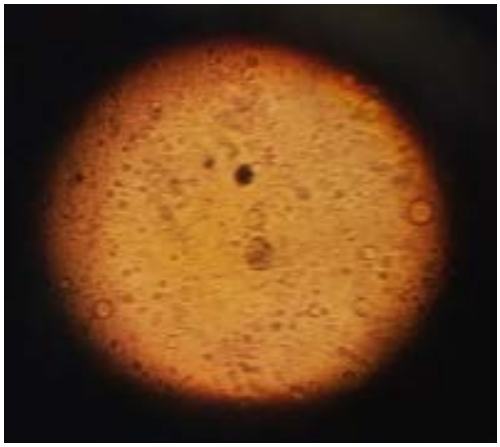
Tableau IV.13. Caractère organoleptique de la crème

Test	Résultat
Odeur	Faible
Couleur	Beige
Aspect	Onctueux

IV.10.3. Caractérisation physicochimique de la crème

Les principaux résultats relatifs aux différents tests physicochimiques réalisés sur la crème formulée sont groupés dans le tableau IV.14.

Tableau.IV.14. Résultats des tests physicochimiques de la crème

Type de test	**Résultats**
Observation sur microscope	
Centrifugation à 3000 rpm pendant 15 minutes	Emulsion stable : pas de séparation à la centrifugation. 
Sens d'émulsion avec la méthode de coloration au bleu de méthylène	La diffusion de la couleur du bleu de méthylène confirme que la dispersion est de type huile dans l'eau. 

Conductivité à 25.8 °C	21.52µS/cm

Les résultats de test de viscosité sont présentés dans la figure.IV.31

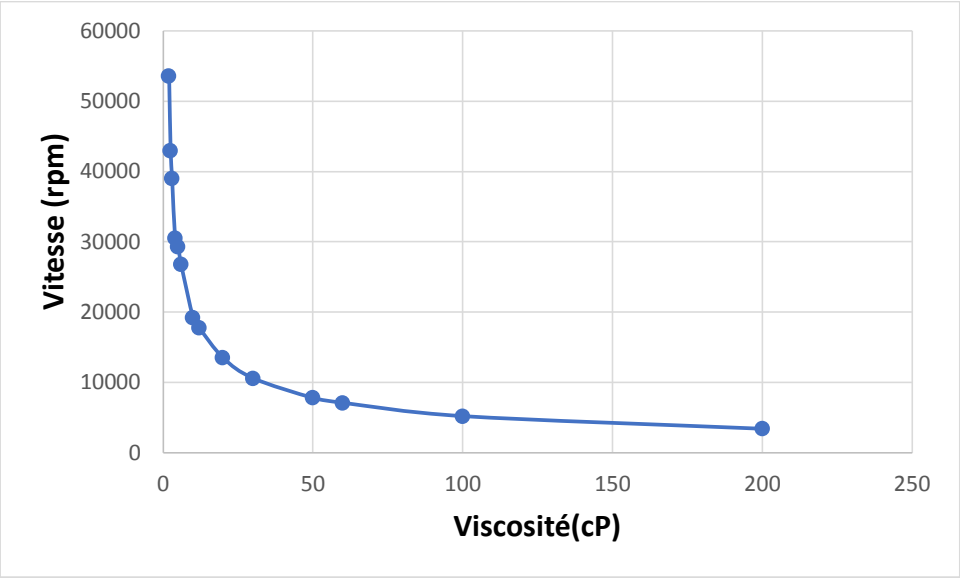


Figure.IV.31. Test de viscosité sur la crème antifongique formulée

D'après ce test, on peut voir que la viscosité diminue en fonction de la vitesse, montrant un comportement rhéofluidifiant ce qui va faciliter l'étalement de la crème.

Conclusion générale

Notre pays est doté d'une biodiversité végétale immense, qui reste à découvrir et une grande partie de cette flore est constitué par des espèces médicinales.Notre présente étude a porté sur l'espèce *Daphné gnidium L* qui appartient à la Famille des*Thymelaeaceae*, une des familles les plus importantes dans la flore Algérienne et la plus utilisée par les thérapeutes traditionnels.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons suivi une chronologie de travail comme suit :

En premier lieu, nous avons commencé l'extraction des substances actives contenues dans les feuilles de *Daphné gnidium L* en utilisant une extraction solide –liquide par macération en présence de l'eau distillée à 100 %, du mélange eau/éthanol (50/50 %) et du mélange eau/méthanol (50/50 %).

La caractérisation physique des extraits a monté qu'ils ont une couleur marron, un pH acide faible et une conductivité électrique élevée dans l'eau (100 %) que dans les solvants binaires utilisés. De plus la diminution de la TS la plus importante (31.6 %) a été notée pour l'extrait d'eau (100 %).

L'analyse qualitative des extraits a révélé la présence des polyphénols, des tanins galliques, des glycosides cardiaques et des saponosides.

L'analyse quantitative des extraits a montré un maximum en teneur en polyphénols totaux de 6.92 mgEA\g enregistré avec le solvant méthanol (50/50 %) à une température ambiante pendant 120 minutes. Concernant les flavonoïdes, la teneur maximale (8.18 mg ERU\g) a été enregistrée dans l'extrait aqueux (100 %).

La détermination de l'activité anti-oxydante a montré que la CI50 de l'extrait eau/méthanol (50/50 %) est de l'ordre 0.07mgEAG/ml. En comparaison avec les antioxydants standards (l'acide gallique, rutine et quercétine), l'extrait testés'avère moins actif.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits, par la méthode de diffusion sur gélose, a montré que cette dernière est en fonction de la bactérie cible. L'*Escherichia coli* est la souche la plus sensible envers les extraits hydro-alcooliques (12.51 mm à 13.72 mm) par comparaison avec les autres souches utilisées, la *Staphylococcus aureus* possède une résistance vis-à-vis tous les extraits testés et la bactérie *Bacillus subtilis*est très faiblement

sensiblepour l'extrait d'eau (100 %) avec un diamètre d'inhibition de 9.78 mm alors qu'elle résiste envers les autres extraits.

L'étude du pouvoir antifongique des différents extraits a permis de visualiser une inhibition intéressante de l'extrait d'eau des feuilles de DGL vis-à-vis *Saccharomyces cerevisiae*avec un diamètre d'inhibition de 16.75 mm.

Le résultat de l'activité anti-inflammatoire a été très intéressant, il a montré que notre extrait (eau/méthanol) de daphné garou possède un effet anti-inflammatoire in-vitro de 99% à la concentration 115.38 µg/ml avec un effet hémolytique très faible.

En deuxième lieu, nous avons opté pour l'application des extraits de DGL dans la formulation d'une crème antifongique destinée au traitement des infections de la peau dues aux champignons.

En perspectives, notre présente étude pourra servir à d'éventuelles études cliniques, (essais de tolérance locale) et la mise en forme définitive de la préparation. Par ailleurs, des essais d'isolation de substances biologiquement actives à partir des extraits du Daphné garou pourront constituer un créneau d'avenir très prometteur pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique en Algérie.

Glossaire

Pharmacognosie	C'est la science appliquée traitant des matières premières et des substances à potentialité médicamenteuse d'origine biologique ou minérale.
Apoptose	Est le processus par lequel des cellules déclanchent leur autodestruction en réponse à un signal .C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire, qui est physiologique , génétiquement programmée nécessaire à la survie des organismes multicellulaires.
Oligomères	Est une molécule constituée d'un petit nombre d'éléments identiques ou très semblables.
Mélanome	Est une tumeur maligne du système pigmentaire de la peau .
Apigénine	Est un composé chimique de la famille des flavones , une sous-classe des flavonoïdes qui a des proprités anti-inflammatoire.
Macrophages	Sont des cellules appartenant aux globules blancs , qui infiltrent les tissus. Ils constituent, avec les polynucléaires , le premier mécanisme de défense cellulaire contre les agents infectieux.
Allélopathique	Est un phénomène biologique par lequel un organisme produit une ou plusieurs substances biochimiques qui influencent la germination, la croissance , la survie et la reproduction d'autres organismes.
Insecticide	Sont des substances actives ou des préparations phytosanitaires ayant la propriété de tuer les insectes , leurs larves et ou leurs œufs.

Chrysomèles	Sont une famille de Coléoptères divisée en dix sous-familles. Presque chaque espèce est phytophage oligophage et se nourrit donc exclusivement sur des plantes appartenant à la même famille, voire au même genre.
Culex pipiens (L4)	Est l'espèce la plus commune des moustiques du genre Culex dans l'hémisphère nord.
Cryptogamiques	Est une maladie causée à une plante par un champignon ou un autre organisme filamenteux.
Antithrombotique	Rassemblent tous les traitements qui visent à empêcher la formation d'un caillot sanguin qui entraverait la circulation sanguine.
Glycosides cardiaques	Sont un groupe de produits chimiques qui se produisent naturellement seulement dans les plantes. Ils sont une classe thérapeutique de médicaments utilisée en cardiologie.

Références bibliographiques

- **A.Romani , P .Pinelli, C. Cantini, A .Cimato and D. Heimler. 2006**. Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italien variety of artichoke (Cynara scolymus L.). J. Food Chem. Vol. 95.pp.221-225.
- **Aya Khouchlaa, Naoual El Menyiy , Fatima-Ezzahrae Guaouguaou , Aicha El Baaboua , Saoulajan Charfi , Fatima Lakhdar , Nasreddine El Omari , Douae Taha , Mohammad Ali Shariati , Maksim Rebezov , Mohamed El-Shazly , Abdelhakim Bouyahya.(2021).** Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and toxicology of Daphne gnidium: A review. Journal of Ethnopharmacology.
- **Ashley T.N., Weil Z.M., Nelson R.J. (2012)**. Inflammation : mechanisms, costs and natural variation. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 43, 385-406.)
- **Ayoola G A.,Ipav S S et al. 2008.**Phytochemical screening and free radical scavenging activities of the fruits and leaves of Allanblackiafloribundaoliv (Guttiferae), International journal of health research, 1 (2):p 81-93.
- **BessasLa rutine A. (2008)**. Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le mielrécoltés dans le sud algérien, mémoire online, Université DjillaliLiabes -Sidi Bel Abbes
- **Boumediene, S. (2016).** Histoire des plantes médicinales du Nouveau monde, Les éditions du monde à faire.
- **Bourgaud.F.(2013)** : Les questions et travaux de recherche nécessaires au développement de la filière ; Exemple de l'apport des sciences cognitives à la production/valorisation des métabolites secondaires d'intérêt.
- **Broadasky T. F., Lewis C., Eble T. E. (1976).** Bioautographic thin layer chromatophic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal, I Clindamycin in the rat, J, Chromatogr, 123: p 33-44.
- **Bruneton J. (2008).** Acides phénols. In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc.
- **Catier, O., Roux, D.(2007)**. Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie : Cahiers du préparateur en pharmacie. 3ème ed. France : Wolters Kluwer.
- **Chen, J. Y., & Huestis, W. H. (1997).** Role of membrane lipid distribution in chlorpromazine-induced shape change of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1323*(2), 299-309.
- **Chira K., Such J., Saucier C., Teissèdre L. (2008)**. Les polyphénols du raisin. Ed :Springer. 6 :75-82.
- **Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R. , et Larondelle Y. (2007**). Optimization of extraction condition of antioxidant phenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavon) tubers. Separation and Purification Technology. 55:217-225.
- **Collin, S., & Crouzet, J. (2011).** Polyphénols et procédés. Edition Lavoisier TEC & DOC, p 5 , 13 , 16 , 235

Références bibliographiques

- **Crozier A . (2003).** Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In Plants" Diet and Health". Ed. Goldberg. pp: 27- 48.
- **Debuigne, G. (1974).** Larousse des plantes qui guérissent, Ed. Larousse.
- **El Fennouni (2012).** Les plantes reputees abortives dans les pratiques traditionnelles d'AVORTEMENT AU MAROC.
- **Ferrari, J. (2002).** Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles : Gnidia involucrata Steud.
- **Georges Dillemann. F. (1961).** Plantes médicinales et principes actifs. Lanotion de race chimique, Bulletin de la Société Botanique de France, 108:sup1, 30-38.
- **Ganesh, G., Saurabh, M. & Sarada, N.C. (2013).** Antioxidant and Antiinflammatory Activities of the Methanolic Leaf Extract of Traditionally Used Medicinal Plant Mimusops elengi L. *Pharm. Sci. & Res. Vol.5(6)*, 2013, 125 – 130.
- **Ghedira K. (2005).** Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôlesprophylactiques et emplois en thérapeutique. Phytothérapie. 04: 162-169.
- **Ghomari F; Bendi-Ouis A. 2007 – 2008.**science des materiaux de construction, UniversiteAboubekrBelkaid.
- **Guo-Xiang L, Zai-Qun L (2008).** The protective effects of ginsenosideson human erythrocytes against hemin-induced hemolysis. Food Chem Toxicol 46:886–92.
- **Govindappa, M., & Poojashri, M. N. (2011).** Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of ethanol extract and active phytochemical screening of Wedelia trilobata (L.) Hitchc. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, *3*(3), 43-51.
- **Hagerman, A.E., Butler, L.G., (2003).** Protein précipitation method for quantitative determination of tannins. J of Agriculture and Food chemistry, 26: 809-81 issus des alcools: formation de depsides.Thèse de doctorat, soutenue devant l'université de Limoges. Faculté de Pharmacie.
- **Hakkinen S.H., Karenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkanen H.M., Tor ronen A.R.. (1999).** Content of the flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in 25 edible berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47:2274-2279.
- **Havsteen B. H. 2002.** The biochemistry and medical significance of the f1avonoids. Pharmacol. Therapeutics, 96, 67-202.
- **Hennebelle.T. ;Sahpaz.S. ;Bailleul.F.(2004)** :Polyphénols végétaux ,sources ,utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif.Phytothérapie Numéro 1 :3-6
- **Hertog M.G.L., Hollman P.C.H, Van de Putte B. (1993).** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 41: 1242-1246.
- **Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Katan M.B. (1992)**. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40: 2379-2383.

- **Huang, M. H., Huang, S. S., Wang, B. S., Wu, C. H., Sheu, M. J., Hou, W. C., ... & Huang, G. J. (2011).** Antioxidant and anti-inflammatory properties of Cardiospermum halicacabum and its reference compounds ex vivo and in vivo. *Journal of ethnopharmacology*, *133*(2), 743-750.
- **Igor Passi L.B.; (2002).** Etude des activités biologiques de Fagara zanthoxylo des Lamiacées.
- **Kansole M.M.R., (2009).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkinafaso : cas de Leucas Martinicensis (Jacquin) R. Brown, HOSLUNDIA OPPOSITA Vahl ET ORTHOSIPHON PALLIDUS Royle ex Benth.
- **Khanbabaee, K. and Ree, T. V. (2001)**. Tannins: Classification and definition. Natural Product, 18: 641-649.
- **Macheix J.J., Fleuriet A et Sarni-Manchado P. (2006)**. Composés phénoliques dans la plante, structure, biosynthése, répartition et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaire.
- **Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004)**. Polyphenols: food sources and bioavailability. American Journal of Clinical Nutrition. 79: 727-747.
- **Mazari. K, Bendinerad. N, Benkhechi. C, .FernandezX. 2010**.Chemical Composition and Anti-microbial Activity of Essential Oil Isolated from Algerian Juniperus phoenicea L. and Cupressus sempervirens. Medicinal Plants Research, 4(10), p 959-964.
- **Menat.E.(2006)** : Les polyphénols de thé, du vin et du cacao, Phytothérapie, Numéro 1 :540-545.
- **Mohammedi,Z.(2013).** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie.
- **Molyneux, P., Songklanakarin, J.(2004).**The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for estimating antioxidant activity *SciencesTechnology*, 26(2) :211-219.
- **Moreau, B. (2003).** maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie.
- **Naczk M. et Shahidi F. (2006**). Phenolic in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41:1523-1542.
- **Naczka, M., and Shahidi F. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food. J of Chromatography A, 1054: 95
- **Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2005b).** Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 9911–9920.
- ***Pietta*, P.G. (*2000*)** Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products, 63, 1035-1042.
- **Raven.P.H ; Evert R.F ; Eichhorn.S.E(2003).**Biologie végétale, p32,527.
- **Reed, J. D. (1995).** Nutritional Toxicology of Tannins and Related Polyphenols in Forage Legumes. J Animal Science, 73:1516-1528.

Références bibliographiques

- **Regnault-Roger.C. ;Philogene.B.J.R. ;Vincent. CH.(2008):** Biopesticides d'origine végétale. Ed. Lavoisier,p259,280.
- **Richter G. (1993).** Composés phénoliques in Métabolisme des végétaux: physiologie etbiochimie. Ed Presse polytechnique et universitaire romande. pp: 317-339.
- **Sellal. A. (2019).** Méthodologie scientifique et techniques d'étude du vivant.
- **Sakat, S., Juvekar, A. R., & Gambhire, M. N. (2010).** In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of Oxalis corniculata Linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *2*(1), 146-155.
- **Singleton.V.L., Orthofer .R0, Lamuela-Raventos.R.M ;(1999).**Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxydants by mns of foli-ciacalteu ragent.In Methods in Enzymology, Academic Press pp 152-178.
- **Skerget M., Kotnik P., Hadolin B., Hras A.-R., Simonic M. et Knez Z. (2005).** Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry. 89: 191-198.
- **Sofowara, A. (1996).** Plantes médicinales et médecine traditionnelles d'Afrique, Edition Karthala. Pp : 13-157.
- **Vadivu, R. & Lakshmi, K.S. (2008).** In vitro and In vivo anti-inflammatory activity of leaves of Symplocos cochinchnensis (Lour) Moore ssp laurina. *Bangladesh Pharmacol* 2008; 3: 121-124
- **Vercauteren, J. (2011-2012).** Plan, formules et illustrations du cours de pharmacognosie Université Montpellier I Laboratoire de Pharmacognosie. Médicament à base de plantes.
- **Yam M.F., Ang L.F., Ameer O.Z., Salman I.M., Aziz H.A., Asmawi M.Z. 2009**.Anti- inflammatory and analgesic effects of Elephantopus tomentosus ethanolic extract. Journal of acupuncture and meridian studies, p 280-287.

SITES DE REFERENCES

- https://www.quelle-est-cette-fleur.com/Fiches-botaniques/Fiche-espece-daphne-gnidium.php
- https://www.preservons-la-nature.fr/flore/taxon/2185.html
- https://incisecret.it/coumarin/
- https://konopnysklep.com.pl/uk/smartblog/43_terpeni-flavonoyidi-cbd.html
- https://fr.wikipedia.org/wiki/Ph%C3%A9nol_%28groupe%29
- https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_salicylov%C3%A1
- https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Acide_hydroxybenzo%C3%AFque.svg
- https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_caf%C3%A9ique
- https://es.wikipedia.org/wiki/Malvina#/media/Archivo:Malvin.svg
- https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_gallique#/media/Fichier:Gallic_acid.svg
- https://fr.wikipedia.org/wiki/Tanin#/media/Fichier:Beta-penta-O-galloyl-glucose.svg
- https://en.wikipedia.org/wiki/Procyanidin_A2#/media/File:Proanthocyanidin_A2.svg
- https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/84/Naphthoquinone.png
- https://stringfixer.com/fr/Coumarins
- http://physique.buil.pagesperso-orange.fr/activ_5e/revis5/revis_filtr.htm
- https://www.maxicours.com/se/cours/les-differentes-techniques-d-extraction/

- https://www.researchgate.net/figure/Schema-de-lappareillage-dextraction-au-Soxhlet_fig9_337076695
- http://clemspcreims.free.fr/chimie-montage/Reflux.html
- https://ellasciences.jimdofree.com/m%C3%A9thodo/chimie/ampoule-%C3%A0-d%C3%A9canter/
- https://marocvegetal.wordpress.com/les-methodes-dextraction/lhydrodistillation/
- https://www.researchgate.net/figure/Extraction-sans-solvant-assistee-par-micro-ondes-SFME_fig8_278635494
- https://www.hielscher.com/fr/ultrasonic-extraction-of-cellular-matter.htm
- https://threefarmers.ca/extraction-par-pression-a-froid/